

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΟΥΣΕΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΚΡΗΤΗΣ

**Μοριακή Φυλογένεση και Φυλογεωγραφία  
της Υποομάδας Ειδών  
«*Podarcis tauricus*» (Sauria: Lacertidae)**

Διδακτορική Διατριβή

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΨΩΝΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2017



UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY  
NATURAL HISTORY MUSEUM OF CRETE

**Molecular Phylogeny and Phylogeography of the  
*“Podarcis tauricus”* (Sauria: Lacertidae) Species  
Subgroup**

PhD Thesis

NIKOLAOS PSONIS

IRAKLEIO

JANUARY 2017



Επιβλέπων Καθηγητής:

*Νίκος Πουλακάκης* (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

*Ευστράτιος Βαλάκος* (Καθηγητής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών)

*Μωσής Μυλωνάς* (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

*Νίκος Πουλακάκης* (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Εξεταστική Επιτροπή:

*Ευστράτιος Βαλάκος* (Καθηγητής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών)

*Μανώλης Λαδουκάκης* (Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

*Μωσής Μυλωνάς* (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

*Παύλος Παυλίδης* (Ερευνητής Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας)

*Νίκος Πουλακάκης* (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

*Αλέξανδρος Σταματάκης* (Professor, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, Germany)

*Σπύρος Σφενδουράκης* (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κύπρου)



*Στους γονείς μου Αριστέα και Ιπποκράτη...*

*Στα αδέρφια μου Δήμητρα και Τάσο...*

*Στη μνήμη του Σταύρου...*

*“Educating the mind  
without educating the ‘heart’  
is no education at all”*





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (Μ.Φ.Ι.Κ.) τη χρονική περίοδο 2012-2016 και υποβλήθηκε στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Είναι αναμενόμενο συμβολή στην ολοκλήρωσή της να έχει ένα πλήθος ανθρώπων και συνεπώς θα ήθελα να τους ευχαριστήσω.

Πρώτον από όλους ευχαριστώ τον υπεύθυνο καθηγητή μου, **Νίκο Πουλακάκη** (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης και Επικεφαλής εργαστηρίου Μοριακής Συστηματικής, Μ.Φ.Ι.Κ.). Όντας ο υπεύθυνος καθηγητής στις προπτυχιακές και μεταπτυχιακές σπουδές μου δεν είναι υπερβολή να πω ότι τον θεωρώ μέντορά μου και υπεύθυνο για τι ότι έχω αγαπήσει τον τομέα της Εξελικτικής Βιολογίας. Τον ευχαριστώ λοιπόν για την αμέριστη εμπιστοσύνη του όλα αυτά τα χρόνια όσον αφορά τη διαχείριση του εργαστηρίου και για τις συμβουλές του τόσο στο πειραματικό, εργαστηριακό, πληροφοριακό και συγγραφικό κομμάτι της διατριβής όσο και σε θέματα προσωπικής φύσης, κάτι που τον έκανε να τον θεωρώ, εκτός από εξαιρετικό ερευνητή και καθηγητή, αγαπητό μου φίλο.

Μαζί με τον Νίκο που μου υπέδειξε το θέμα της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον **Ευστράτιο Βαλάκο** (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών) και τον **Μωυσή Μυλωνά** (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης και Διευθυντής Μ.Φ.Ι.Κ.) για την άψογη συνεργασία τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, **Μανώλη Λαδουκάκη** (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης), **Παύλο Παυλίδη** (Ερευνητής, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας), **Αλέξανδρο Σταματάκη** (Professor, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, Germany) και **Σπύρο Σφενδουράκη** (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κύπρου) που με τις καλοπροαίρετες παρατηρήσεις τους συνέβαλαν στη διόρθωση και βελτίωση του παρόντος κειμένου. Τον

Αλέξανδρο τον ευχαριστώ και για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του ώστε να εκπαιδευτώ περαιτέρω στην ανάλυση δεδομένων ddRADseq.

Ευχαριστώ την **Αγλαΐα (Σίλια) Αντωνίου** (Μεταδιδάκτωρ, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών) αρχικά για την υπερπολύτιμη βοήθειά της στο κομμάτι των αναλύσεων της Πληθυσμιακής Γενετικής και της Γενωμικής και εν συνεχεία για την συμπαράσταση, τις συμβουλές, το χιούμορ και τις συζητήσεις που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Σημαντικό κομμάτι των διδακτορικών σπουδών και της καθημερινότητάς μου κατείχε τα τελευταία χρόνια όλος ο φορέας του Μ.Φ.Ι.Κ.. Ευχαριστώ την **Κατερίνα Βαρδινογιάννη** (έφορος τμήματος Ασπονδύλων εκτός Αρθροπόδων, Μ.Φ.Ι.Κ.) για την υποστήριξη σε καθημερινό επίπεδο και για τις συμβουλές της όλα αυτά τα χρόνια, τον **Πέτρο Λουπεράκη** (έφορος τμήματος Ερπετών και Αμφιβίων και μικρών Θηλαστικών, Μ.Φ.Ι.Κ.) για τη πολύτιμη βοήθειά του στο κομμάτι της Ερπετολογίας, για τις δειγματοληψίες, τις ευχάριστες συζητήσεις και την εμπιστοσύνη του και τέλος τον **Απόστολο Τριχά** (έφορος τμήματος Αρθροπόδων, Μ.Φ.Ι.Κ.) για τις εκπληκτικές φωτογραφίες των ερπετών της διατριβής και την παρέα του. Ευχαριστώ επίσης όλους τους εργαζόμενους του Μ.Φ.Ι.Κ. για την καθημερινή συνεργασία και ειδικότερα τον **Μανώλη Νικολακάκη** για την κατασκευή των χαρτών της διατριβής, τον **Μανώλη Παπαδημητράκη** για τη συνεργασία στην οργάνωση των δειγμάτων, τη **Βάσια Σπανέλη** για τη βοήθειά της με τα δεδομένα παρουσίας των ειδών και τη **Μίνα Τρικάλη** για τη βοήθειά της στην εύρεση βιβλιογραφίας.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στην **Adalgiza (Gisella) Caccione** (Senior Research Scientist and Lecturer, Department of Ecology & Evolutionary Biology, Yale University, Connecticut, U.S.A.) για τη φιλοξενία στο εργαστήριό της ώστε να εκπαιδευτώ στην προετοιμασία «βιβλιοθηκών» ddRADseq και στον **Αριστείδη Παρμακέλη** για τη φιλοξενία στο διαμέρισμά του στο New Haven.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη βοήθειά του τον **Δημήτρη Πουρσανίδη** (Υποψήφιος Διδάκτωρ, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών,

Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών), ο οποίος πραγματοποίησε τις αναλύσεις Μοντελοποίησης Χωρικής Κατανομής.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στη Γραμματεία του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και ιδιαίτερα στην **Ευφροσύνη Μπερβανάκη** που ήταν απόλυτα εξυπηρετική σε ό,τι της ζήτησα, όπως επίσης εκφράζω την υποχρέωσή μου στη **Μαρία Κουτράκη** (Διδάσκουσα Αγγλικής Γλώσσας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) για τις διορθώσεις των ξενόγλωσσων δημοσιεύσεών μου σε επιστημονικά περιοδικά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους ενεπλάκησαν στη συλλογή των δειγμάτων, είτε συμμετέχοντας μαζί μου στις δειγματοληψίες είτε στέλνοντάς μου δείγματα. Ιδιαίτερα, για την αποστολή δειγμάτων ιστών από απομακρυσμένες περιοχές, θα ήθελα να ευχαριστήσω, αλφαβητικά, τους: **Roman Alekseev** (Nikolaev, Ukraine), **Miguel A. Carretero** (Research Centre in Biodiversity and Genetic Resources, Universidade do Porto, Vila do Conde, Portugal), **Jelka Crnobrnja - Isailović** (Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš and Department of Evolutionary Biology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Beograd, Serbia), **Igor Doronin** (Institute of Zoology, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia), **Arkadyi Dovzhenko** (Khersonsky State Agrarian University, Kherson, Ukraine), **Iulian Gherghel** (Department of Integrative Biology, Oklahoma State University, Oklahoma and Department of Biology, Case Western Reserve University, Ohio, USA), **Daniel Gruľa** και **Ivan Stolárik** (Comenius University in Bratislava, Department of Zoology, Slovakia), **Václav Gvoždík** (Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic and National Museum of Prague), **Tomáš Husák** και **Daniel Koleska** (Czech University of Life Sciences, Department of Zoology and Fisheries, Prague, Czech Republic), **Daniel Jablonski** (Department of Zoology, Comenius University in Bratislava, Bratislava, Slovakia). **Oleg Kukushkin** (Department of Biodiversity Studies and Ecological Monitoring, T.I. Vyazemski Karadagh Scientific Station - Nature Reserve of RAS, Russian Federation), **Spartak Litvinchuk** (Institute of Cytology, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia), **Andrey Matvyeyev** (Danube Biosphaere Reserve, Ukrainian Academy of Science, Vilkovo, Ukraine), **Edvárd**

**Mizsei** (Aggtelek National Park Directorate, Hungary), **Anton Nadolnyi** (Crimean Republic Anti-Plague Station, Simferopol, Republic of Crimea), **Παναγιώτη Παφίλη** (National and Kapodistrian University of Athens, Department of Zoology - Marine Biology, Athens, Greece), **Boyan Petrov** (National Museum of Natural History, Sofia, Bulgaria), **Leonid Sokolov** (National Nature Park “Tuzlovskiye Limany”, Tatarbunary, Ukraine), **Ηλία Στραχίνη** (Aristotle University of Thessaloniki, School of Biology, Thessaloniki, Greece), **Κωνσταντίνος Σωτηρόπουλος** (Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece), **Georgi Popgeorgiev**, **Nikolay Tzankov** (both from National Museum of Natural History Sofia, Bulgaria), **Helen Sviridenko** (Institute of Zoology, Ukrainian Academy of Science, Kyiv, Ukraine), **Vladimir Tsurcanu** (Institute of Zoology, Academy of Sciences of the Republic of Moldova, Cishinau), και **Judit Vörös** (Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary). Επίσης εκφράζω την υποχρέωσή μου στο Λιμεναρχείο Κεραμωτής και το πλήρωμα της ψαρόβαρκας «Παρμενίδης» για τη μεταφορά μας στη νησίδα Θασοπούλα.

Πολλά ευχαριστώ στα μέλη της ομάδας Scientific Computing (SCO) του Heidelberg Institute of Theoretical Studies (HITS) (**Pierre Barbera**, **Lucas Czech**, **Diego Darriba**, **Tomas Flouris**, **Alexey Kozlov**, **Sarah Lutteropp** και **Benoit Morel**) που με έκαναν να αισθανθώ άνετα από την πρώτη στιγμή στο τρίμηνο που πέρασα εκεί.

Από τις ευχαριστίες δε θα μπορούσαν να λείψουν τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Συστηματικής. Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες μου στο πρόγραμμα EcoGenoDiv που ήταν ένα σημαντικό κομμάτι της διατριβής. Έτσι ευχαριστώ τους **Εμμανουέλα Καραμέτα**, **Παναγιώτα Κοτσακιώζη** και **Κωσταντίνο Σαγώνα** για το υπέροχο κλίμα που είχαμε κατά τη διάρκεια των αμέτρητων εργαστηριακών ωρών, αλλά και για την καθημερινή παρέα εκτός εργαστηρίου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στα δύο *minions* του εργαστηρίου **Κάτια Μπουγιούρη** και **Λουκία Σπιλάνη**, αλλά και στο αγαπητό *χαμμάιφρο* **Ελευθερία Ανταλουδάκη**. Για τους παραπάνω λόγους ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα παλαιά και νέα μέλη του εργαστηρίου (αλφαβητικά): **Άννα Βαβάκου**, **Αλέξης Βασιλικόπουλος**, **Νίκος Βλαχόπουλος**, **Ελευθερία Γεωργίου**, **Ιωάννης Γκόντας**, **Αντρέας Δημητρίου**, **Αγγελική Δημοπούλου**, **Παναγιώτης Ζωντός**,

Πασχαλιά Καπλή, Δανάη Καρακάση, Αφροδίτη Καρδαμάκη, Ολίνα Μπακάλη, Δήμητρα Μποτόνη, Έλλη Παλαιοθεοδώρου, Νεφέλη Πάσχου, Ειρήνη Σκουρτανιώτη, Μαρία Σμυρλή, Μάνος Στρατάκης, Σταυρινή Παπαδάκη, Στράτος Παπαντωνίου, Γαβριέλλα Παπαστεφάνου, Σοφία Παρασκευοπούλου, Ιωάννης Πατραμάνης και Αλκυόνη Σφενδουράκη-Μπασακάρου.

Ευχαριστώ όλους τους φίλους που λίγο ή πολύ ήταν μέρος της ζωής μου σε αυτή την περίοδο των διδακτορικών σπουδών. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους παιδικούς μου φίλους **Γρηγόρη Καμπύλη, Σπύρο Κουβέλη** και **Γιώργο Τσοπελογιάννη**.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη **Μαρία Κωστοπούλου** που μπήκε στη ζωή μου όταν την χρειαζόμουν και με κάνει με το μοναδικό της τρόπο, όχι μόνο καλύτερο επιστήμονα, αλλά και καλύτερο άνθρωπο.

Τέλος, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τους γονείς μου **Αριστέα** και **Ιπποκράτη** και τα αδέρφια μου **Δήμητρα** και **Τάσο** που με στηρίζουν στο να πραγματοποιώ τα όνειρά μου.



Η μελέτη αυτή εντάσσεται στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», Εθνικό Στρατηγικό Πλαίσιο Αναφοράς (ΕΣΠΑ) 2007-2013, Δράση «ΑΡΙΣΤΕΙΑ II» του Υπουργείου Παιδείας και Θρησκευμάτων και της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας και το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Εντός της Δράσης «ΑΡΙΣΤΕΙΑ II» η μελέτη αυτή εντάσσεται στο έργο με κωδικό «3160», ακρωνύμιο «EcoGenoDiv» και τίτλο «Η προσθήκη περισσότερης Οικολογίας και Γενετικής στην κατανόηση της Βιολογικής Ποικιλότητας: ο ρόλος των νησιών ως φυσικά εργαστήρια».







## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	ix
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	xvii
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xxii
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	xxv
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	xxxι
ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ABSTRACT.....	xxxiv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ .....	1
1. Μοριακή Συστηματική Βιολογία.....	2
2. Μοριακή Φυλογένεση: ορισμός, ορολογία και μέθοδοι.....	3
3. Το πεδίο μελέτης της Φυλογεωγραφίας.....	5
4. Βαλκανική χερσόνησος και νότια Βαλκάνια: γενικές πληροφορίες για την περιοχή μελέτης.....	6
5. Ταξινομική ομάδα μελέτης.....	9
5.1. Οι σαύρες ως οργανισμός μοντέλο στην επιστήμη της Εξελικτικής Βιολογίας.....	9
5.2. Η οικογένεια των σαυρών Lacertidae Oppel, 1811 .....	10
5.3. Το γένος των «τοιχόσαυρων» <i>Podarcis</i> Wagler, 1830 .....	11
5.3.1. Μια σημείωση για το φύλο (genre) του γένους <i>Podarcis</i> .....	13
5.4. Τα υπό εξέταση taxa.....	14
5.4.1. <i>Podarcis gaigeae</i> (Werner, 1930) .....	15
5.4.2. <i>Podarcis melisellensis</i> (Braun, 1877) .....	17
5.4.3. <i>Podarcis milensis</i> (Bedriaga, 1882) .....	19
5.4.4. <i>Podarcis tauricus</i> (Pallas, 1814).....	21
6. Γενικά κίνητρα και στόχοι της παρούσας διατριβής .....	24
7. Δείγματα και σύνολα δειγμάτων.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ .....	27
1. Περίληψη κεφαλαίου.....	28
2. Εισαγωγή.....	29
1. Μελέτες Μοριακής Φυλογένεσης βαλκανικών taxa .....	29
2. Μοριακή Φυλογένεση και Lacertidae.....	30
3. Φυλογενετικές σχέσεις του γένους <i>Podarcis</i> .....	33
4. Φυλογενετικές σχέσεις της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> ».....	35

5.	Στόχος του παρόντος κεφαλαίου .....	35
3.	Υλικά και μέθοδοι .....	36
1.	Δείγματα, εξαγωγή DNA, PCR και αλληλούχιση .....	36
2.	Στοιχισή αλληλουχιών .....	39
3.	Εκτίμησή του γονιδιακού δέντρου των δύο mtDNA γενετικών τύπων .....	40
4.	Εκτίμησή γονιδιακών δέντρων .....	42
5.	Εκτίμησή του δέντρου των ειδών .....	43
4.	Αποτελέσματα .....	44
1.	Το γονιδιακό δέντρο των δύο mtDNA γενετικών τύπων .....	44
2.	Το γονιδιακό δέντρο των τριών nDNA γενετικών τύπων .....	49
3.	Το γονιδιακό δέντρο των πέντε γενετικών τύπων (mtDNA και nDNA) .....	52
4.	Το δέντρο των ειδών .....	55
5.	Συζήτηση .....	57
1.	Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των βαλκανικών <i>Podarcis</i> .....	57
2.	Οι φυλογενετικές σχέσεις εντός της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » .....	59
6.	Συμπεράσματα .....	61
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ .....	62
1.	Περίληψη κεφαλαίου .....	63
2.	Εισαγωγή κεφαλαίου .....	64
2.1.	Νέας Γενιάς Αλληλούχιση (Next Generation Sequencing) .....	64
2.2.	Η ενσωμάτωση της Επόμενης Γενιάς Αλληλούχισης στη Φυλογένεση και τη Φυλογεωγραφία .....	65
2.3.	Η μέθοδος RADseq .....	67
2.3.1.	Η εναλλακτική μέθοδος ddRADseq .....	71
2.4.	Παραδείγματα ddRADseq φυλογενωμικών μελετών σε σαύρες .....	76
2.5.	Στόχος του παρόντος κεφαλαίου .....	77
3.	Υλικά και μέθοδοι .....	78
3.1.	Δείγματα και εξαγωγή DNA .....	78
3.2.	Προετοιμασία «βιβλιοθήκης» ddRADseq και αλληλούχιση Illumina .....	79
3.3.	Φιλτράρισμα, διαχωρισμός ατόμων, γονοτύπιση και στοιχισή θραυσμάτων ddRADseq .....	82
3.4.	Φυλογενωμικές αναλύσεις .....	85
4.	Αποτελέσματα .....	88

4.1. Αποτελέσματα αλληλούχισης Illumina και εφαρμογής παραμέτρων .....	88
4.2. Οι φυλογενωμικές σχέσεις εντός της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » .....	89
5. Συζήτηση.....	93
6. Συμπεράσματα.....	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ.....	97
1. Περίληψη κεφαλαίου.....	98
2. Εισαγωγή κεφαλαίου .....	99
2.1. Η χρήση των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων στην Εξελικτική Βιολογία.....	99
2.2. Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής εντός της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » με χρήση μικροδορυφόρων.....	101
2.3. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου .....	103
3. Υλικά και μέθοδοι.....	104
3.1. Δείγματα, Εξαγωγή DNA και PCR .....	104
3.2. Αναλύσεις Δεδομένων .....	107
3.2.1. Ισοροπία Hardy-Weinberg και γενετική ποικιλότητα.....	107
3.2.2. Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής .....	108
3.2.3. Διερεύνηση σχέσεων .....	110
4. Αποτελέσματα.....	111
4.1. Περιγραφικά στοιχεία Πληθυσμιακής Γενετικής.....	111
4.2. Πληθυσμιακή δομή.....	114
4.2.1. Ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE στο σύνολο των δεδομένων .....	114
4.2.2. Ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE ανά φυλογενετικό κλάδο .....	121
4.3. Διάκριση ομάδων βάσει της ανάλυσης DAPC .....	125
5. Συζήτηση.....	127
6. Συμπεράσματα.....	132
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΤΟ .....	133
1. Περίληψη κεφαλαίου.....	134
2. Εισαγωγή κεφαλαίου .....	135
2.1. Η έννοια του Είδους .....	135
2.2. Η ιδέα της οριοθέτησης ειδών και γνωστές μέθοδοι .....	136
2.2.1. Η μέθοδος BP&P.....	139
2.3. Παραδείγματα μελετών οριοθέτησης ειδών σε ερπετά και αμφίβια με χρήση του BP&P 140	

2.4.	Μοντελοποίηση χωρικών κατανομών .....	142
2.5.	Παραδείγματα μελετών μοντελοποίησης χωρικών κατανομών σε ερπετά και αμφίβια .....	144
2.6.	Στόχος του παρόντος κεφαλαίου .....	145
3.	Υλικά και μέθοδοι .....	146
3.1.	Οριοθέτηση ειδών .....	146
3.2.	Μοντελοποίηση χωρικών κατανομών .....	148
4.	Αποτελέσματα .....	151
4.1.	Εκτίμηση του αριθμού ειδών της υποομάδας « <i>P. tauricus</i> » .....	151
4.2.	Εκτίμηση πιθανών γεωγραφικών κατανομών των ειδών της υποομάδας « <i>P. tauricus</i> » .....	153
5.	Συζήτηση .....	172
6.	Συμπεράσματα .....	179
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ .....		180
1.	Περίληψη κεφαλαίου .....	181
2.	Εισαγωγή κεφαλαίου .....	182
2.1.	Παλαιογεωγραφία της περιοχής των Βαλκανίων .....	182
2.2.	Παλαιοκλιματολογία και παγετωνικά «καταφύγια» .....	188
2.3.	Φυλογεωγραφικό σενάριο της εξελικτικής ιστορίας των βαλκανικών <i>Podarcis</i> ...	193
2.4.	Στόχος του παρόντος κεφαλαίου .....	195
3.	Υλικά και μέθοδοι .....	196
3.1.	Εκτίμηση χρόνων απόκλισης .....	196
3.2.	Κατασκευή δικτύων μιτοχονδριακών απλοτύπων .....	198
3.3.	Εκτίμηση γενετικής ποικιλότητας και αναλύσεις ιστορικής δημογραφίας .....	198
4.	Αποτελέσματα .....	202
4.1.	Χρόνοι απόκλισης .....	202
4.2.	Δίκτυα μιτοχονδριακών απλοτύπων .....	204
4.3.	Γενετική ποικιλότητα και ιστορικά δημογραφικά στοιχεία .....	212
5.	Συζήτηση .....	220
5.1.	Ποικιλία εξελικτικών και δημογραφικών προτύπων εντός κάθε taxon .....	220
5.1.1.	Τα ενδημικά νησιωτικά είδη <i>Podarcis gaiageae</i> και <i>Podarcis milensis</i> .....	220
5.1.2.	Το δαλματικό <i>Podarcis melisellensis</i> .....	223

5.1.3. Το ευρέως εξαπλωμένο taxon <i>Podarcis tauricus tauricus</i> / <i>Podarcis tauricus thasopulae</i> .....	224
5.1.4. Το ποικιλόμορφο <i>Podarcis tauricus ionicus</i> .....	226
5.2. Φυλογεωγραφικά Πρότυπα .....	230
6. Συμπεράσματα.....	245
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ.....	246
1. Τελικά, πόσα είδη; Μια προτεινόμενη Ταξινόμηση της υποομάδας ειδών « <i>Podarcis tauricus</i> ».....	247
2. Το εναλλακτικό φυλογεωγραφικό σενάριο βάσει απουσίας προγονικού ανταγωνισμού, σχηματικά.....	249
3. Κατανομές των taxa της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » .....	253
4. Προτάσεις μελλοντικών δειγματοληψιών.....	261
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	263
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	299
Παράρτημα I.....	300
Παράρτημα II .....	352
Παράρτημα III.....	364
Παράρτημα IV.....	374
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ.....	387

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

1.1. Τα είδη του γένους <i>Podarcis</i> σε αλφαβητική κατάταξη, ο συγγραφέας και η ευρύτερη περιοχή εξάπλωσής τους_____	12
2.1. Η τρέχουσα ταξινόμική κατάσταση του γένους <i>Podarcis</i> _____	34
2.2. Εκκινητές και συνθήκες πολλαπλασιασμού της τεχνικής PCR <sup>a</sup> και της νουκλεοτιδικής αλληλούχισης_____	38
2.3. Γενετικές αποστάσεις των γενετικών τόπων <i>cyt b</i> και <i>16S rRNA</i> μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων_____	45
2.4. Γενετικές αποστάσεις των γενετικών τόπων <i>Pod55</i> , <i>Pod15b</i> και <i>MC1R</i> μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων_____	50
2.5. Γενετικές αποστάσεις των μιτοχονδριακών και των πυρηνικών γενετικών τόπων μεταξύ των κύριων φυλογενετικών υποκλάδων του taxon <i>Podarcis tauricus ionicus</i> _____	53
3.1. Αποτελέσματα της εφαρμογής του φίλτρου <i>min_taxa</i> και σύγκριση των δέντρων ( <i>starting / best scoring</i> )_____	88
4.1. Εκκινητές και συνθήκες πολλαπλασιασμού της τεχνικής PCR_____	105
4.2. Περιγραφικά στοιχεία πληθυσμιακής γενετικής για όλα τα δεδομένα και ανά κύριο φυλογενετικό κλάδο της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »_____	112
4.3. Περιγραφικά στοιχεία πληθυσμιακής γενετικής για πέντε από τις τελικές συναθροίσεις της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE_____	117
4.4. Περιγραφικά στοιχεία πληθυσμιακής γενετικής για τέσσερις από τις τελικές συναθροίσεις της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE_____	118
4.5. Συντελεστής ομομιξίας <i>Fst</i> ανά ζεύγος τελικών ομαδοποιήσεων της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE για το σύνολο των δεδομένων_____	119
4.6. Συντελεστής ομομιξίας <i>Fst</i> ανά ζεύγος τελικών ομαδοποιήσεων της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE για το taxon <i>P. t. ionicus</i> _____	124
5.1. Δεδομένα θέσεων παρουσίας ανά είδος ή ομάδα που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις μοντελοποίησης χωρικών κατανομών_____	146
5.2. Αποτελέσματα οριοθέτησης ειδών βάσει της μεθόδου BP&P υποθέτοντας εννέα «πληθυσμούς» και εφαρμόζοντας διαφορετικούς συνδυασμούς παραμέτρων_____	150

5.3. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για την υποομάδα ειδών <i>P. erhardii</i>	152
5.4. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος <i>P. gaiageae</i>	153
5.5. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το taxon <i>P. tauricus ionicus</i>	154
5.6. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος <i>P. melisellensis</i>	155
5.7. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος <i>P. milensis</i>	156
5.8. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος <i>P. muralis</i>	157
5.9. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για την ομαδοποίηση των taxa <i>P. t. tauricus</i> και <i>P. t. thasopulae</i>	158
5.10. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για την υποομάδα ειδών « <i>P. tauricus</i> »	159
5.11. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο <i>a</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	160
5.12. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο <i>b</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	161
5.13. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο <i>c</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	162
5.14. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο <i>d</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	163
5.15. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο <i>e</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	164
6.1. Σύνοψη των δεικτών γενετικού πολυμορφισμού για κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο και υποκλάδο της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »	210

6.2. Οι τιμές των παραμέτρων (Harpending's raggedness index $r$ , Fu's $F_s$ , Ramos-Onsins & Rozas' $R_2$ , Tajima's $D$ ) των δημογραφικών αναλύσεων για κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο και υποκλάδο της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »	211
Παράρτημα Ι. Κατάλογος δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και κατάλογος αλληλουχιών που ελήφθησαν από τη διαδικτυακή βάση δεδομένων GenBank	292
Παράρτημα ΙΙ. Κατάλογος δειγμάτων / αλληλουχιών / παρουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή και αντιστοίχισή τους στα ακόλουθα Σύνολα Δειγμάτων	343
Σ1. Οι ανά ζεύγος mtDNA γενετικές αποστάσεις μεταξύ και εντός των κύριων φυλογενετικών κλάδων της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »	363
Σ2. Οι ανά ζεύγος nDNA γενετικές μεταξύ και εντός των κύριων φυλογενετικών κλάδων της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »	363



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

1.1.	Γεωμορφολογικός χάρτης των Βαλκανίων	6
1.2.	Κατανομή του γένους <i>Podarcis</i>	11
1.3.	Κατανομή του είδους <i>Podarcis gaigeae</i>	16
1.4.	Ενήλικο άτομο του είδους <i>Podarcis gaigeae</i>	16
1.5.	Κατανομή του είδους <i>Podarcis melisellensis</i>	18
1.6.	Ενήλικο άτομο του είδους <i>Podarcis melisellensis</i>	18
1.7.	Κατανομή του είδους <i>Podarcis milensis</i>	20
1.8.	Ενήλικο άτομο του είδους <i>Podarcis milensis</i>	20
1.9.	Κατανομή του είδους <i>Podarcis tauricus</i>	22
1.10.	Ενήλικο άτομο του υποείδους <i>Podarcis tauricus thasopulae</i>	23
1.11.	Ενήλικο άτομο του υποείδους <i>Podarcis tauricus ionicus</i>	23
2.1.	Χάρτες με τις τοποθεσίες συλλογής των δειγμάτων και τις γεωγραφικές κατανομές των taxa της υποομάδας ειδών « <i>Podarcis tauricus</i> »	37
2.2.	Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο γενετικών τόπων mtDNA όσον αφορά τους κύριους φυλογενετικούς κλάδους	46
2.3.	Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των τριών γενετικών τόπων nDNA	51
2.4.	Η τοπολογία του Bayesian Inference φυλογενετικού δέντρου βάσει των πέντε γενετικών τόπων	54
2.5.	Η σύμφωνη τοπολογία του coalescent δέντρου των ειδών της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » και των συγγενικών της ειδών	55
2.6.	Το σύνολο όλων των πιθανών coalescent δέντρων των ειδών σε προβολή διάταξης αστεριού, για την υποομάδα ειδών « <i>P. tauricus</i> » και των συγγενικών της ειδών	56
3.1	Η διαδικασία της μεθόδου RADseq	67
3.2.	Σχηματική αναπαράσταση του εύρους γενετικών τόπων που μπορεί να χρησιμοποιήσουν κάποιες από τις διαθέσιμες μεθόδους αλληλούχισης	70

3.3. Διαγραμματική απεικόνιση των κύριων στοιχείων δημιουργίας μιας «βιβλιοθήκης» ddRADseq και η τελική μορφή της έτοιμη για αλληλούχιση Illumin_____	73
3.4. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ των μεθόδων RADseq και ddRADseq_____	74
3.5. Το φυλογενωμικό (ddRADseq) δέντρο της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »_____	89
3.6. Το δέντρο των ειδών της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » όπως εκτιμήθηκε από την ανάλυση SVDQuartets_____	90
3.7. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC με βάση Α. την πρώτη και τη δεύτερη σημαντικότερη συνάρτηση διάκρισης στην περιγραφή της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας και Β. την πρώτη και την τρίτη σημαντικότερη συνάρτηση διάκρισης_____	91
4.1. Η εκτιμώμενη πληθυσμιακή δομή για το σύνολο των δεδομένων της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » μετά από τέσσερα βήματα ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE_____	116
4.2. Η εκτιμώμενη πληθυσμιακή δομή για τα είδη της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » μετά από τέσσερα βήματα ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE_____	123
4.3. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC με βάση τον πρώτο και το δεύτερο σημαντικότερο παράγοντα επίδρασης_____	125
4.4. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC με βάση τον πρώτο και τον τρίτο σημαντικότερο παράγοντα επίδρασης_____	125
5.1. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για την υποομάδα ειδών <i>P. erhardii</i> _____	152
5.2. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος <i>P. gaiageae</i> _____	153
5.3. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το taxon <i>P. t. ionicus</i> _____	154
5.4. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος <i>P. melisellensis</i> _____	155
5.5. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος <i>P. milensis</i> _____	156

5.6. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος <i>P. muralis</i>	157
5.7. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για την ομαδοποίηση των taxa <i>P. t. tauricus</i> και <i>P. t. thasopulae</i>	158
5.8. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για την υποομάδα ειδών « <i>P. tauricus</i> »	159
5.9. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο <i>a</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	160
5.10. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο <i>b</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	161
5.11. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο <i>c</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	162
5.12. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο <i>d</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	163
5.13. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο <i>e</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	164
5.14. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για το είδος <i>P. melisellensis</i> , το taxon <i>P. t. ionicus</i> και την ομαδοποίηση <i>P. t. tauricus</i> & <i>P. t. thasopulae</i>	166
5.15. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για τα είδη <i>P. gaigeae</i> και <i>P. milensis</i>	167
5.16. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για τους πέντε φυλογενετικούς υποκλάδους ( <i>a</i> – <i>e</i> ) του taxon <i>P. t. ionicus</i>	168
5.17. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για το είδος <i>P. muralis</i> και για τις υποομάδες ειδών « <i>P. erhardii</i> » και « <i>P. tauricus</i> »	169
6.1. Αναπαράσταση των γεωτεκτονικών διεργασιών και ανακατατάξεων επιλεγμένων τμημάτων του φλοιού της Γης στη νότια Ευρώπη από το Ανώτερο Ηώκαινο έως το Κατώτερο Μειόκαινο	180
6.2. Παλαιογεωγραφικός χάρτης του Μέσου Μειοκαινού βάσει παλινολογικών δεδομένων	181

6.3. Παλαιογεωγραφικός χάρτης του Ανώτερου Μειόκαινου βάσει παλυνολογικών δεδομένων_____	181
6.4. Παλαιογεωγραφικός χάρτης του Πλειοκαίνου βάσει παλυνολογικών δεδομένων_____	182
6.5. Η περιοχή του Αιγαίου από το Μέσο Μειόκαινο έως σήμερα_____	183
6.6. Σχηματική απεικόνιση της κίνησης και των διαδοχικών θέσεων του Ελληνικού τόξου_____	184
6.7. Η εξέλιξη του κλίματος της Γης σε συνδυασμό με τα κύρια γεωλογικά γεγονότα κατά τον Καινοζωικό Αιώνα_____	186
6.8. Υποθετικό βιογεωγραφικό σενάριο για την προέλευση των <i>Podarcis</i> στο χώρο της Βαλκανικής χερσονήσου_____	190
6.9 Το παραγόμενο βαθμονομημένο Bayesian δέντρο της χρονοφυλογενετικής ανάλυσης βάσει του Συνόλου Δειγμάτων VI_____	199
6.10. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων του είδους <i>P. gaiageae</i> και η αντιστοίχιση του κάθε απλότυπου στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη_____	202
6.11. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων του είδους <i>P. milensis</i> και η αντιστοίχιση της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη_____	203
6.12. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων των taxa <i>P. t. tauricus</i> και <i>P. t. thasopulae</i> και η αντιστοίχιση της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη_____	204
6.13. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων των φυλογενετικών υποκλάδων <i>a</i> και <i>b</i> του taxon <i>Podarcis tauricus ionicus</i> και η αντιστοίχιση της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη_____	205
6.14. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων των φυλογενετικών υποκλάδων <i>c</i> και <i>d</i> του taxon <i>Podarcis tauricus ionicus</i> και η αντιστοίχιση της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη_____	206

6.15. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων του φυλογενετικού υποκλάδου <i>e</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i> και η αντιστοίχιση της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη	207
6.16. Δημογραφική mismatch distribution ανάλυση για τα υπό εξέταση taxa	212
6.17. Δημογραφική mismatch distribution ανάλυση για τους φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon <i>P. t. ionicus</i>	213
6.18. Αποτελέσματα ανάλυσης τύπου «Bayesian Skyline Plots» για τα υπό εξέταση taxa	214
6.19. Αποτελέσματα ανάλυσης τύπου «Bayesian Skyline Plots» για τους φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon <i>P. t. ionicus</i>	215
6.20. Παλαιογεωγραφικός χάρτης της κεντρικής νότιας Ευρώπης και των δυτικών Βαλκανίων κατά την περίοδο του Ανώτερου Μειόκαινου	230
7.1. Σύνοψη των σχέσεων εντός της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> » σύμφωνα με τις φυλογενετικές και φυλογενωμικές αναλύσεις	241
7.2. Αποίκιση των Βαλκανίων στα ~14-9 εκατομμύρια χρόνια πριν από τον πρόγονο της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »	242
7.3. Εξάπλωση σε Πελοπόννησο, Στερεά Ελλάδα, περιοχή Σκόρου και περιοχή Μήλου πριν από ~7-6 εκατομμύρια χρόνια	243
7.4. Απομόνωση και διαφοροποίηση των ειδών <i>P. gaiageae</i> , <i>P. milesnsis</i> , <i>P. tauricus</i> και <i>P. ionicus</i> πριν από 5-4 εκατομμύρια έτη	243
7.5. Διαφοροποίηση των ειδών <i>P. ionicus</i> και <i>P. melisellensis</i> στους υποκλάδους τους πριν από 4-3 εκατομμύρια χρόνια	244
7.6. Εξάπλωση και διαφοροποίηση των taxa της υποομάδας ειδών <i>P. tauricus</i> στο διάστημα 2.5 - 0,4 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα	244
7.7. Εξάπλωση προς τα βόρεια μετά το τέλος της τελευταίας παγετώδους περιόδου	245
7.8. Σημερινή γενική εξάπλωση των taxa της υποομάδας ειδών « <i>P. tauricus</i> »	245
7.9. Χάρτης δεδομένων παρουσίας των ειδών της υποομάδας « <i>P. tauricus</i> »	247
7.10. Δυνητική κατανομή του υποκλάδου <i>a</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	251
7.11. Δυνητική κατανομή του υποκλάδου <i>b</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	251

7.12.	Δυνητική κατανομή του υποκλάδου <i>c</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	252
7.13.	Δυνητική κατανομή του υποκλάδου <i>d</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	252
7.14.	Δυνητική κατανομή του υποκλάδου <i>e</i> του taxon <i>P. t. ionicus</i>	253
Σ1.	Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο γενετικών τόπων mtDNA ( <i>cyt b</i> και <i>16S rRNA</i> ) όσον αφορά τον φυλογενετικό κλάδο που αντιστοιχεί στα taxa <i>Podarcis tauricus tauricus</i> και <i>P. t. thasopulae</i>	355
Σ2.	Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο γενετικών τόπων mtDNA ( <i>cyt b</i> και <i>16S rRNA</i> ) όσον αφορά τον φυλογενετικό κλάδο που αντιστοιχεί στο taxon <i>Podarcis tauricus ionicus</i>	356
Σ3.	Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο γενετικών τόπων mtDNA ( <i>cyt b</i> και <i>16S rRNA</i> ) όσον αφορά τους φυλογενετικούς κλάδους που αντιστοιχούν στα είδη <i>Podarcis gaigeae</i> , <i>P. milensis</i> και <i>P. melisellensis</i>	357
Σ4.	Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο γενετικών τόπων mtDNA ( <i>cyt b</i> και <i>16S rRNA</i> ) όσον αφορά τους φυλογενετικούς κλάδους που αντιστοιχεί στα taxa που δεν ανήκουν στην υποομάδα ειδών « <i>Podarcis tauricus</i> »	358
Σ5.	Φυλογενετικό δέντρο βάσει της μεθόδου NJ με χρήση των phased data του γενετικού τόπου MC1R	359
Σ6.	Φυλογενετικό δέντρο βάσει της μεθόδου NJ με χρήση των phased data του γενετικού τόπου Pod55	360
Σ7.	Φυλογενετικό δέντρο βάσει της μεθόδου NJ με χρήση των phased data του γενετικού τόπου Pod15b	361
Σ8.	Το παραγόμενο βαθμονομημένο Bayesian δέντρο της χρονοφυλογενετικής ανάλυσης βάσει του Συνόλου Δειγμάτων VI, αλλά μόνο για τους δύο mtDNA τόπους	362

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι «τοιχόσαυρες» του γένους *Podarcis* φυλογενετικά συμπεριλαμβάνονται στη «Βαλκανική» ομάδα ειδών και στην υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» που περιλαμβάνει τα είδη *P. gaigeae*, *P. melisellensis*, *P. milensis* και *P. tauricus*. Η υποομάδα αυτή κατανέμεται στα δυτικά και νότια Βαλκάνια, μια περιοχή η οποία θεωρείται κέντρο υψηλής βιοποικιλότητας (biodiversity hotspot) ερπετοπανίδας. Πληθώρα ενδημικών ειδών συναντάται κοντά στις Εξωτερικές Ελληνίδες της ηπειρωτικής Ελλάδας (οροσειρά Πίνδου), οι οποίες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους βιογεωγραφικούς φραγμούς στη βαλκανική χερσόνησο. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των τεσσάρων υπό εξέταση ειδών, αλλά και μεταξύ των πληθυσμών εντός των ειδών δεν έχουν μέχρι στιγμής επιλυθεί. Στην παρούσα διατριβή γενικός στόχος ήταν η διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» κάνοντας χρήση ενός συνόλου δειγμάτων που περιλαμβάνει άτομα από το μεγαλύτερο μέρος της κατανομής των ειδών μελέτης και παράγοντας γενετικά και γενωμικά δεδομένα διαφορετικού τύπου (αλληλούχιση Sanger, Νέα Γενιά Αλληλούχισης, Μικροδορυφορικά). Για την επίτευξη του ανωτέρου στόχου πραγματοποιήθηκε μια μεγάλη ποικιλία αναλύσεων η οποία περιλαμβάνει φυλογενετικές αναλύσεις (Δεύτερο Κεφάλαιο), φυλογενωμικές αναλύσεις (Τρίτο Κεφάλαιο), εκτιμήσεις πληθυσμιακής δομής (Τέταρτο Κεφάλαιο), οριοθέτηση ειδών (Πέμπτο Κεφάλαιο), μοντελοποίηση χωρικών κατανομών (Πέμπτο Κεφάλαιο), εκτίμηση χρόνων απόκλισης (Έκτο Κεφάλαιο), κατασκευή δικτύων μιτοχονδριακών απλοτύπων (Έκτο Κεφάλαιο) και δημογραφικές αναλύσεις (Έκτο Κεφάλαιο). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των φυλογενετικών και φυλογενωμικών αναλύσεων, η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» εμπεριέχει πέντε κύριους φυλογενετικούς κλάδους οι οποίοι ταυτίζονται με τα taxa (κατά σειρά εξελικτικής διαφοροποίησης) *P. melisellensis*, *P. milensis*, *P. gaigeae*, *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus/P. t. thasopulae*. Το taxon *P. t. ionicus* εμφανίζει κρυμμένη γενετική ποικιλότητα, αποτελούμενο από πέντε, γεωγραφικά διακριτούς, φυλογενετικούς υποκλάδους με τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους να φτάνουν σε διαειδικά επίπεδα. Στο πλαίσιο της ταξινομικής αναθεώρησης της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των αναλύσεων της

οριοθέτησης ειδών προτείνεται η συνωνυμία κάποιων αναγνωρισμένων υποειδών της υποομάδας και η ύπαρξη ενός διακριτού ελληνοαλβανικού φυλογενετικού είδους ονόματι, προσωρινά, σύμπλεγμα ειδών (species complex) «*P. ionicus*». Οι σχέσεις μεταξύ των υποκλάδων (*a - e*) του taxon *P. ionicus* επιλύονται με τη βοήθεια των γενωμικών δεδομένων με τη σειρά διαφοροποίησης να έχει ως εξής: υποκλάδος *a* (νότια Επτάνησα), υποκλάδος *e* (νοτιοδυτική Αλβανία, βορειοδυτική Ελλάδα και δυτική Πελοπόννησος), υποκλάδος *c* (βορειοανατολική Πελοπόννησος) και υποκλάδος *d* (κεντρική και νοτιοανατολική Πελοπόννησος). Ο υποκλάδος *b* (δυτική Στερεά Ελλάδα) εμφανίζεται είτε ως αδελφό taxon με τον υποκλάδο *a* (δεδομένα Sanger), είτε ως συγγενικό με τον υποκλάδο *d* (δεδομένα ddRADseq). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων ανίχνευσης πληθυσμιακής δομής έδειξαν ότι σε γενικές γραμμές οι ομαδοποιήσεις (clusters) που αναγνωρίστηκαν αντιστοιχούν στους κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους (ή ομάδες αυτών). Οι ομαδοποιήσεις αυτές στην πλειονότητά τους αποτελούνταν από αμιγή άτομα (>90% πιθανότητα σωστής αντιστοίχισης), ωστόσο παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου οι θυγατρικές ομαδοποιήσεις μιας πατρικής ομαδοποίησης (π.χ., η περίπτωση του taxon *P. t. tauricus*) αποτελούνταν από ένα μικρό ποσοστό μη αμιγών ατόμων που προέρχονταν από διαφορετική γεωγραφική περιοχή. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν και περιπτώσεις στις οποίες άτομα ίδιας γεωγραφικής προέλευσης να ομαδοποιούνται σε διαφορετικές συναθροίσεις. Οι αναλύσεις χωρικής κατανομής έδειξαν ότι, ως ένα βαθμό, υπάρχουν διακριτές δυνητικές κατανομές βάσει περιβαλλοντικών συνθηκών μεταξύ των taxa της παραπάνω υποομάδας, παρατήρηση που ενισχύει την υπόθεση διάκρισης του taxon *P. t. ionicus* ως είδος ή ομάδα ειδών. Τέλος, βάσει όλων των παραπάνω δεδομένων και αναλύσεων και βάσει της υπάρχουσας γνώσης για την παλαιογεωγραφία και παλαιοκλιματολογία των Βαλκανίων, το φυλογεωγραφικό σενάριο που προτείνεται μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά σε μια σειρά σταδίων. Πριν από ~14-9 εκατομμύρια χρόνια γίνεται η αποίκηση των Βαλκανίων από την προγονική μορφή της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης συμβαίνει πριν από ~8-7 εκατομμύρια χρόνια όταν νότια των Διναρίδων απομονώνεται ο πρόγονος του είδους *P. melisellensis*. Την περίοδο πριν από



~7-6 εκατομμύρια χρόνια η κατανομή του προγόνου των υπολοίπων ειδών της υποομάδας περιλαμβάνει τις περιοχές ανατολικά και δυτικά των Εξωτερικών Ελληνίδων, την Πελοπόννησο, την περιοχή της Σκύρου και την περιοχή της Μήλου. Στα ~5-4 εκατομμύρια χρόνια, λόγω του τέλους της κρίσης της αλατότητας του Μεσσηνίου, συμβαίνει η απομόνωση των ανωτέρω περιοχών και η επακόλουθη διαφοροποίηση των απομονωμένων πληθυσμών στα taxa *P. milensis*, *P. gaiageae*, *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae*. Ακολουθεί η διαφοροποίηση του είδους *P. melisellensis* και του taxon *P. t. ionicus* στους υποκλάδους τους πριν από ~4-3 εκατομμύρια χρόνια. Στο διάστημα ~2,5-0,018 εκατομμύρια χρόνια πριν η επίδραση των πλειστοκαινικών παγετωδών και μεσοπαγετωδών περιόδων είναι έντονη διαμορφώνοντας σε μεγάλο βαθμό τη σημερινή γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών. Μετά το τέλος της τελευταίας παγετώδους περιόδου (~18.000 χρόνια πριν) και μέχρι σήμερα οι πληθυσμοί αρχίζουν και εξαπλώνονται σταδιακά, ιδιαίτερα προς τα βόρεια των κατανομών τους.

**Λέξεις κλειδιά:** Βαλκανική χερσόνησος, Οριοθέτηση ειδών, Παγετωνικά καταφύγια, Πληθυσμιακή δομή, Σύμπλεγμα ειδών, Φυλογενωμική

## ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ABSTRACT

*Podarcis* wall-lizards are included phylogenetically into the Balkan species group and into the “*P. tauricus*” species subgroup that consists of *P. gaigeae*, *P. melisellensis*, *P. milensis* and *P. tauricus*. This subgroup is distributed in the western and south Balkans, an area that is considered as an herpetofauna biodiversity hotspot. A plethora of endemic species can be found closely to the external Hellenides (Pindos mountain range) that comprise one of the most important biogeographic barriers in the Balkan Peninsula. The four focal species are characterized by obscure phylogenetic relationships among them, as well as among their populations. The general scope of the present thesis is to investigate the evolutionary history of the “*P. tauricus*” species subgroup by using a dataset containing samples from the entire species distribution and by producing different types of genetic and genomic data (Sanger sequencing, Next Generation Sequencing, Microsatellites). In order to achieve the above goal a large variety of analyses were performed that includes phylogenetic analyses (Second Chapter), phylogenomic analyses (Third Chapter), population structure analyses (Forth Chapter), species delimitation (Fifth Chapter), species distribution modelling (Fifth Chapter), divergence time estimations (Sixth Chapter), construction of mitochondrial haplotype networks (Sixth Chapter), and demographic analyses (Sixth Chapter). According to the results of the phylogenetic and phylogenomic analyses the “*P. tauricus*” species subgroup consists of five major phylogenetic clades that correspond to the taxa (in an order of evolutionary diversification) *P. melisellensis*, *P. milensis*, *P. gaigeae*, *P. t. ionicus* and *P. t. tauricus*/*P. t. thasopulae*. The taxon of *P. t. ionicus* displays hidden genetic diversity, comprising of five geographically isolated phylogenetic subclades with genetic distances of species level among them. In the context of taxonomical revision within the “*P. tauricus*” species subgroup and in congruence with the results of the species delimitation we propose the synonymy between some of the subspecies and the existence of a distinct Greek-Albanian species (or species complex) with the provisional name *P. ionicus*. The relationships among the subclades (*a - e*) of *P. ionicus* are resolved with the help of the genomic data in the following order of evolutionary diversification: subclade *a* (south Ionian islands),

subclade *e* (southwestern Albania, northwestern Greece and western Peloponnisos), subclade *c* (northeastern Peloponnisos) and subclade *d* (central and southeastern Peloponnisos). Subclade *b* (western central Greece) is either a sister subclade to subclade *a* (Sanger sequencing), or closely related to subclade *d* (ddRADseq data). The results of population structure analyses shown that there is a general concordance between the revealed clusters and the phylogenetic clades and subclades (or group of them). Most of the resulted clusters consisted of pure individuals (>90% assignment probability), however in some cases it was observed that the daughter clusters of a parental one (e.g. the case of *P. t. tauricus*) contained also a small percentage of non-pure individuals originated from a different geographic area. Furthermore, there were cases in which individuals originated from the same geographic locality were grouping within different clusters. The species distribution analyses revealed that, in general, there are distinct putative distributions based on the environmental data among the taxa of the focal species subgroup. Finally, taking into account all the above data and analyses and in combination with the existing knowledge on the Paleogeography and the Paleoclimatology of the Balkans a phylogeographic scenario is proposed, which is taking place in several main stages. Before ~14-9 my the ancestral of “*P. tauricus*” species subgroup started to colonize the Balkan peninsula. The first divergence event happened at ~8-7 with the ancestor of *P. melisellensis* being isolated south of the Dinarides. Before ~7-6 my ago the distribution of the ancestor of the rest of the species includes the eastern and western to the External Hellenides continental Greece, Peloponnisos, central Greece, Skyros area, and Milos area. At ~5-4 mya the end of the Messinian salinity crisis caused the isolation of the aforementioned areas and the diversification of the isolated populations inhabiting these areas led to the forming of *P. milensis*, *P. gaigeae*, *P. t. ionicus* and *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae*. Before ~4-3 my the diversification of *P. melisellensis* and *P. ionicus* into their subclades is happening and during the time period of ~2,5-0,018 mya the populations were experienced the affection of the glacial and inter-glacial cycles of Pleistocene that formed in a great manner the current genetic diversity of the species.

After the end of the last glacial period (~18.000 years ago) and until today the populations started to expand gradually, especially at their northern distribution limits.

**Keywords:** Balkan peninsula, Glacial refugia, Phylogenomics, Population structure, Species complex, Species delimitation

*«Η επιστήμη δεν είναι τίποτα άλλο  
από εκπαιδευμένος και οργανωμένος κοινός νους»*

*Thomas Huxley, 1825-1895, Βρετανός Βιολόγος*



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

---

### Γενικά εισαγωγικά στοιχεία

## 1. Μοριακή Συστηματική Βιολογία

Σύμφωνα με τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ορισμό, η Συστηματική Βιολογία (Systematic Biology or Systematics) αποτελεί την επιστημονική μελέτη της οργανικής ποικιλότητας, εφόσον υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτής και του προτύπου εξελικτικών σχέσεων των υπό μελέτη taxa (Wiley and Lieberman, 2011). Η εκτίμηση και μελέτη των παραπάνω προτύπων αποτελεί αντικείμενο έρευνας της Συγκριτικής Βιολογίας (Comparative Biology, Nelson, 1970), ενός πιο γενικού όρου μέσα στην οποία εμπεριέχεται η Συστηματική Βιολογία. Ο όρος Ταξινομία (Taxonomy), ο οποίος αναφέρεται στην κατηγοριοποίηση των οργανισμών σε βαθμίδες και στην ονοματολογία τους βάσει των διαφορετικών τους χαρακτηριστικών, ουσιαστικά υπάγεται στην Συστηματική Βιολογία και δε θα πρέπει να ταυτίζεται με αυτήν. Στη Μοριακή Συστηματική Βιολογία (Molecular Systematics) η μελέτη της οργανικής ποικιλότητας γίνεται σε γενετικό επίπεδο κάνοντας χρήση γενετικών δεικτών με σκοπό την εκτίμηση των πληθυσμιακών διεργασιών και των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των taxa. Η επιστήμη της Μοριακής Συστηματικής Βιολογίας σχετίζεται πολύ με την επιστήμη της Μοριακής Εξέλιξης (Molecular Evolution) όπου γίνεται μελέτη των διαδικασιών, του ρυθμού και των περιορισμών της μοριακής αλλαγής στο χρόνο (Moritz and Hillis, 1996). Η πρώτη επιστήμη παρέχει μια αξιοσημείωτη βάση δεδομένων για την μελέτη των παραπάνω, ενώ τα αποτελέσματα της δεύτερης παρέχουν τη γνώση για την πιο ορθή και πληροφοριακή χρήση των γενετικών δεικτών στην Πληθυσμιακή Γενετική (Population Genetics), όπου μελετάται η γενετική δομή και η εξέλιξη των πληθυσμών, και στη Μοριακή Φυλογένεση (Molecular Phylogenetics) για την οποία γίνεται συζήτηση παρακάτω. Η παραπάνω συνεργιστική σχέση είναι εμφανής στη μελέτη της ποικιλότητας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Swofford et al., 1996) και στην ανάλυση μικρών θραυσμάτων DNA όπως είναι οι μικροδορυφορικοί γενετικοί τόποι (Dowling et al., 1996).



## 2. Μοριακή Φυλογένεση: ορισμός, ορολογία και μέθοδοι

Ο όρος Φυλογενετική ή Φυλογένεση (από τα *φυλή*, *φύλλον* και *γεννώ*, *γένεση*, *γενετικός*, δηλαδή η προέλευση/γέννηση της φυλής) αναφέρεται στη μελέτη της εξελικτικής ιστορίας και στην ανασύσταση των εξελικτικών σχέσεων – ή αλλιώς της συγγένειας – μεταξύ διαφορετικών ομάδων οργανισμών (π.χ. είδη ή πληθυσμοί). Βασική (δαρβινική) αρχή αυτής της διαδικασίας είναι ότι όλοι οι οργανισμοί έχουν προέλθει από έναν κοινό πρόγονο που ήταν η πρώτη μορφή ζωής που εμφανίστηκε στη Γη. Η διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων γίνεται μέσω φυλογενετικών μεθόδων συμπερασματολογίας (phylogenetic inference) που αξιολογούν παρατηρούμενα κληρονομικά χαρακτηριστικά όπως είναι οι μορφολογικοί χαρακτήρες ή οι αλληλουχίες DNA. Το αποτέλεσμα των παραπάνω αναλύσεων είναι η φυλογένεση (ή το φυλογενετικό δέντρο, αφού η αναπαράσταση των εξελικτικών σχέσεων έχει δενδροειδή μορφή όπου τα «φύλλα» του δέντρου αντιπροσωπεύουν σύγχρονα είδη ή εξαφανισμένους προγόνους τους), η οποία αποτελεί μια υπόθεση της πραγματικής ιστορίας των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών.

Βασική προϋπόθεση στη Φυλογένεση είναι η ομολογία των χαρακτήρων, δηλαδή η χρήση βιολογικών χαρακτηριστικών που έχουν προέλθει μέσω κοινής καταγωγής, έτσι ώστε να είναι εφικτή η διαπίστωση της τελευταίας. Οι χαρακτήρες αυτοί μπορεί να είναι τροποποιημένοι ή όχι, χωρίς να είναι απαραίτητο ότι έχουν την ίδια λειτουργία μεταξύ των απογόνων. Αντίθετο της ομολογίας είναι η αναλογία χαρακτήρων, στην περίπτωση της οποίας διαφορετικής καταγωγής χαρακτήρες έχουν την ίδια λειτουργία στους απογόνους (π.χ. λόγω εξελικτικής σύγκλισης). Η αναλογία αποτελεί βασικό πρόβλημα στη Φυλογένεση διότι μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα φυλογενετικά δέντρα. Το πρόβλημα αυτό είναι συχνό σε φυλογενετικές μελέτες που χρησιμοποιούν μορφολογικούς χαρακτήρες διότι η διάκριση μεταξύ ομολογίας και αναλογίας είναι δύσκολη.

Υπάρχουν τρία βασικά πρότυπα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ δύο ζευγών taxa (Avice, 2000): (α) η αμοιβαία μονοφυλετικότητα, (β) η παραφυλετικότητα και (γ) η πολυφυλετικότητα. Στην αμοιβαία μονοφυλετικότητα όλα τα άτομα μιας ομάδας

προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο, δηλαδή μεταξύ δύο ομάδων τα άτομα της κάθε ομάδας είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους παρά με τα άτομα της άλλης ομάδας. Στην παραφυλετικότητα, μια ομάδα δεν περιλαμβάνει όλους τους απογόνους ενός κοινού προγόνου, δηλαδή μεταξύ δύο ομάδων η μία από τις ομάδες μπορεί να είναι παραφυλετική αν η πρώτη περιλαμβάνει όλα τα άτομα ενός κοινού προγόνου, εκτός από κάποια που ανήκουν στη δεύτερη ομάδα. Τέλος, στην πολυφυλετικότητα, μια ομάδα αποτελείται από άτομα που δεν έχουν όλα τον ίδιο κοινό πρόγονο, δηλαδή στη παραπάνω περίπτωση η δεύτερη ομάδα είναι πολυφυλετική αφού περιλαμβάνει άτομα που είναι πιο συγγενικά με άτομα από την πρώτη ομάδα παρά με τα υπόλοιπα άτομα της δεύτερης ομάδας. Ιδανική κατάσταση στη Φυλογένεση είναι οι ομάδες να είναι μονοφυλετικές.

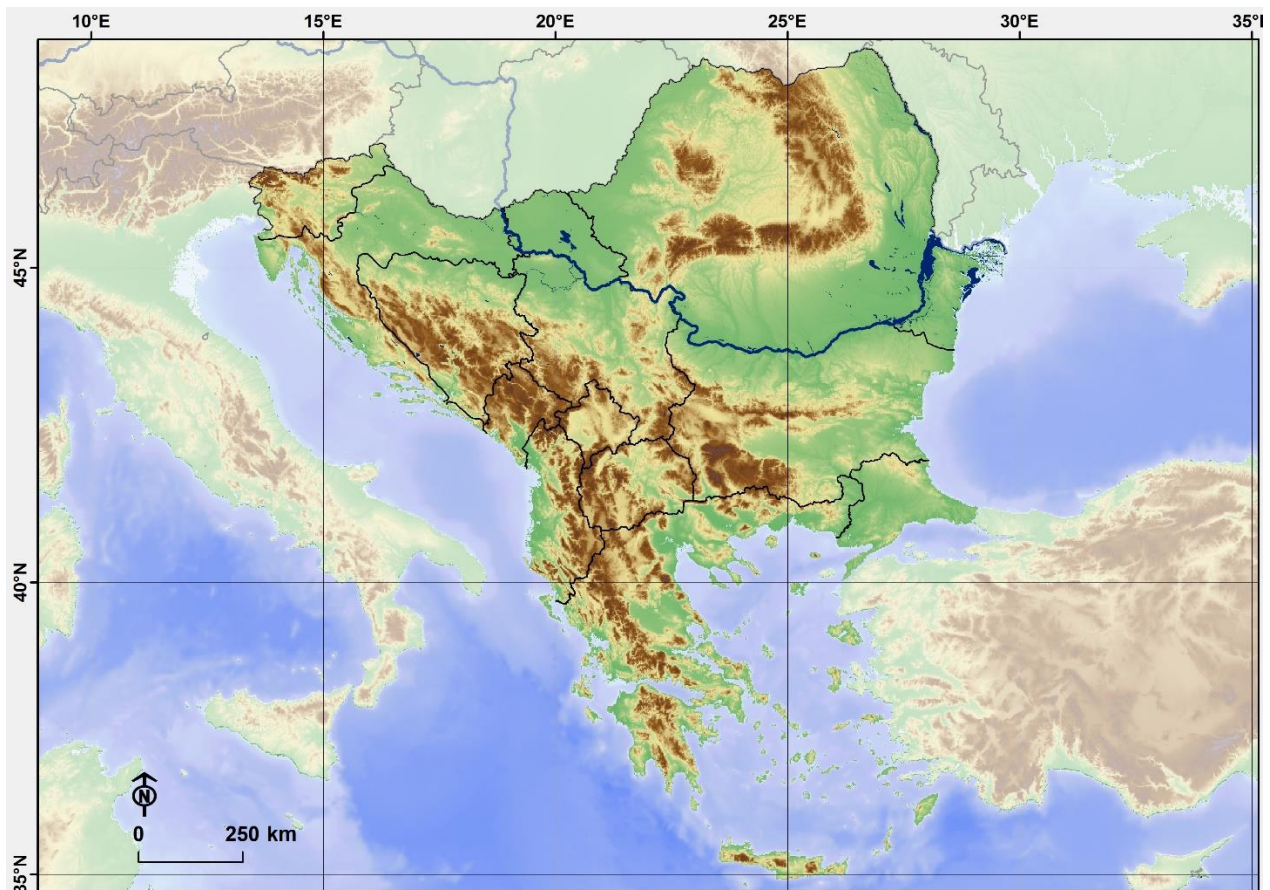
Η Μοριακή Φυλογένεση βασίζεται στη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες (συνήθως αλληλουχίες DNA) και πιο συγκεκριμένα τις μοναδικές παράγωγες καταστάσεις χαρακτήρων (συναπωμορφίες), δηλαδή τα χαρακτηριστικά εκείνα που καθιστούν μια ομάδα μονοφυλετική μιας και τα μοιράζονται μόνο τα άτομα αυτής. Μεταξύ άλλων, στα πλεονεκτήματα των μοριακών μεθόδων Φυλογένεσης έναντι των μορφολογικών συμπεριλαμβάνονται η κληρονομησιμότητα του DNA, η έλλειψη υποκειμενικότητας στην περιγραφή των χαρακτήρων, η (σχεδόν) καθολικότητα του γενετικού κώδικα και η ευκολία παραγωγής (άρα και αφθονία) δεδομένων. Το βασικότερο μειονεκτήμα τους, ωστόσο, είναι ότι ένα φυλογενετικό δέντρο που βασίζεται σε έναν γενετικό τόπο (γονιδιακό δέντρο) μπορεί να μην ταυτίζεται απαραίτητα με το δέντρο του είδους, είτε λόγω απόκλισης του γενετικού τόπου πριν από την απόκλιση του είδους είτε λόγω διαφορετικής διακλάδωσης του γενετικού τόπου στο χρόνο σε σχέση με το είδος. Αυτό μπορεί να έχει επίσης ως αποτέλεσμα την πιθανή ασυμφωνία τοπολογίας μεταξύ γονιδιακών δέντρων (Graur and Li, 2000). Για τον λόγο αυτόν απαιτείται η χρήση γενετικών δεδομένων από πολλαπλούς ανεξάρτητους γενετικούς τόπους ελπίζοντας στο ίδιο παραγόμενο δέντρο μεταξύ τόπων.

### 3. Το πεδίο μελέτης της Φυλογεωγραφίας

Το πεδίο μελέτης της Ιστορικής Βιογεωγραφίας (π.χ. Wiley, 1988) ασχολείται με την τεκμηρίωση και κατανόηση των χωρικών προτύπων της βιοποικιλότητας και της διαφοροποίησής τους, καθώς και του ρόλου των σύγχρονων οικολογικών πιέσεων στον σχηματισμό αυτών των προτύπων. Παρακλάδι της Βιογεωγραφίας αποτελεί η Φυλογεωγραφία (Avise et al., 1987), στην οποία γίνεται προσπάθεια κατανόησης των αιτιών δημιουργίας γεωγραφικών προτύπων των εξελικτικών γραμμών ενός είδους ή στενά συγγενικών ειδών. Από τον παραπάνω ορισμό είναι εμφανές ότι το βασικό υπόβαθρο μελέτης στη Φυλογεωγραφία διαμορφώνεται τόσο από τον χώρο όσο και από τον χρόνο (Avise, 2000). Η ανάλυση και η επεξήγηση της κατανομής των εξελικτικών γραμμών συνήθως απαιτεί δεδομένα από πληθώρα βασικών τομέων της Βιολογίας, όπως η Μοριακή Βιολογία, η Πληθυσμιακή Γενετική, η Ηθολογία, η Φυλογένεση, η Δημογραφία και η Παλαιοντολογία, αλλά και από άλλες επιστήμες όπως η Γεωλογία και η Ιστορική Γεωγραφία. Συνεπώς, η Φυλογεωγραφία είναι μια προσπάθεια συνδυασμού δεδομένων διαφορετικής φύσης και προέλευσης που επηρεάζονται από μικρο- και μακροεξελικτικές συνιστώσες.

#### 4. Βαλκανική χερσόνησος και νότια Βαλκάνια: γενικές πληροφορίες για την περιοχή μελέτης

Η βαλκανική χερσόνησος αποτελεί το κομμάτι της Ευρώπης που, έχοντας σχήμα ανεστραμμένου τριγώνου, επεκτείνεται από την κεντρική Ευρώπη στο βορρά, στην ανατολική Μεσόγειο στον νότο και περιορίζεται δυτικά από την Αδριατική Θάλασσα και το Ιόνιο Πέλαγος, και ανατολικά από το Αιγαίο Πέλαγος και τη Μαύρη Θάλασσα. Αν και τα γεωγραφικά όρια των Βαλκανίων σχετίζονται εμφανώς με τα πολιτικά όρια των χωρών της πρώην Γιουγκοσλαβίας, της Βουλγαρίας, της Αλβανίας και της Ελλάδας, συχνά βάσει βιογεωγραφίας στα Βαλκάνια περιλαμβάνονται και οι περιοχές της ευρωπαϊκής Τουρκίας, καθώς και περιοχές ή ολόκληρη η Ρουμανία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1 (Reed et al., 2004).



Εικόνα 1.1. Γεωμορφολογικός χάρτης των Βαλκανίων. Με μαύρη γραμμή τα πολιτικά σύνορα, με μπλε ο ποταμός Δούναβης.

Η γεωλογική ιστορία της μικροπλάκας της Βαλκανικής Χερσονήσου είναι μοναδική και διαφέρει ποικιλοτρόπως από την ιστορία άλλων περιοχών, ειδικά αυτών της Βόρειας Ευρώπης. Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι το ότι ανήκει στις νεότερες, ηλικιακά, γεωλογικές περιοχές της Ευρώπης (Νεο-Ευρώπη), οι οποίες ενώθηκαν σε μια οντότητα μόλις πριν από λίγες δεκάδες εκατομμύρια χρόνια λόγω της επέκτασης της Τηθύος θάλασσας (πρόδρομος της Μεσογείου) και οι οποίες προηγουμένως ήταν διασκορπισμένες σε μια πολύ ευρύτερη περιοχή μέχρις ότου ενωθούν και προστεθούν στα παλαιότερα μέρη της Ευρώπης. Αυτό σημαίνει ότι οι παραπάνω περιοχές πέρασαν από αρκετά στάδια μεγέθυνσης. Η Βαλκανική Χερσόνησος μπορεί να διαχωριστεί σε αρκετές μεγάλες περιοχές με βάση συγκεκριμένα γεωλογικά και γεωμορφολογικά χαρακτηριστικά (π.χ. μάζα Ροδόπης), τα οποία διαμορφώθηκαν σε μεγάλο βαθμό κατά την Αλπική Ορογένεση του Παλαιογενούς (Παλαιόκαινο, Μειόκαινο και Ολιγόκαινο\*) (λεπτομέρειες στο Έκτο Κεφάλαιο). Το κυριότερο ωστόσο χαρακτηριστικό είναι ότι η Αλπική Ορογένεση παρουσιάζει μια τυπική «διχαλωτή» ορογενετική δομή με δύο επεκτάσεις: τη Βαλκανική στα βόρεια και τη Δυναρική - Ελληνική στα νότια (Savić, 2008). Μια τέτοια συγκεκριμένη τεκτονική ιστορία, σε συνδυασμό με τη δράση όλων των σχετικών φυσικών συστημάτων στη διάρκεια του γεωλογικού χρόνου είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύ πλούσιας γεωποικιλότητας στην ευρύτερη περιοχή των Βαλκανίων.

Αναφορικά με τη βιοποικιλότητά της, η Βαλκανική Χερσόνησος τοποθετείται ανάμεσα στις πιο σημαντικές περιοχές σε παγκόσμιο επίπεδο αφού χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά πλούσια και πολυποίκιλη χλωρίδα και πανίδα. Μεγάλος αριθμός ειδών ζώων και φυτών έχει περιγραφεί με πολλά από αυτά να είναι ενδημικά ή υπολειμματικά. Αυτό οφείλεται στη γεωλογική ιστορία της περιοχής των Βαλκανίων, στη γεωμορφολογία της, στην εξέλιξη του κλίματος ειδικά κατά τη διάρκεια των πλειστοκαινικών παγετώνων (περισσότερα για την εξέλιξη του κλίματος στο Έκτο Κεφάλαιο) και στη γεωγραφική της θέση ανάμεσα σε τρεις ηπείρους (Ευρώπη, Ασία και Αφρική) που ως τελικό αποτέλεσμα είχαν τη δημιουργία τεράστιας ποικιλίας βιοτόπων (Savić, 2008).

---

\* Σε όλο το κείμενο της διατριβής ακολουθείται η γεωλογική χρονολόγηση όπως προτείνεται από τα η Διεθνή Επιτροπή Στρωματογραφίας (v2015/01, International Commission on Stratigraphy).

Βιογεωγραφικά, η Βαλκανική Χερσόνησος έχει διαχωριστεί σε εννιά ζώνες οικοσυστημάτων (Loratin et al., 1995): (1) παραθαλάσσια μεσογειακά δάση και μακί, (2) μεσογειακές ημι-έρημοι, (3) στέπες Πόντου-Κασπίας Θάλασσας, (4) υπο-μεσογειακά - βαλκανικά δάση, (5) βαλκανικά - κεντροευρωπαϊκά δάση, (6) ευρωπαϊκά δάση τύπου τάιγκα, (7) ευρωπαϊκά αλπικά βραχώδη οικοσυστήματα και υγρά αλπικά λιβάδια, (8) μεσογειακά βραχώδη δάση και (9) βραχώδη οικοσυστήματα και ξηρά λιβάδια νοτίων Βαλκανίων. Οι παραπάνω ζώνες οικοσυστημάτων ξεχωρίζουν με βάση μεγάλο αριθμό τύπων βιοτόπων (250 στο σύνολο), περίπου 35 τύποι βιοτόπων ανά ζώνη. Αυτή η ποικιλία βιοτόπων αποτελεί και την εξήγηση του μεγάλου αριθμού ειδών αλλά και του μεγάλου ποσοστού ενδημισμού (Savić, 2008).

Η περιοχή των νοτίων Βαλκανίων, στην οποία και επικεντρώνεται κυρίως η συγκεκριμένη διατριβή, αποτελεί σημείο υψηλής βιοποικιλότητας (biodiversity hotspot) δρώντας ως σημαντικό πανιδικό «καταφύγιο» κατά τη διάρκεια των πλειστοκαινικών παγετωνικών επεισοδίων. Εκτός των παραπάνω χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν για όλη τη χερσόνησο, η περιοχή αυτή ξεχωρίζει για τις μεγάλες οροσειρές που διασχίζουν κατά μήκος το ηπειρωτικό κομμάτι δημιουργώντας διακριτές βιογεωγραφικές περιοχές, καθώς και για τον μεγάλο αριθμό νησιωτικών συγκροτημάτων. Τα βουνά των νότιων Διναρίδων και Ελληνίδων (Οροσειρά Πίνδου) αποτελούν την περιοχή των Βαλκανίων με τη μεγαλύτερη ποικιλότητα αμφιβίων και ερπετών (Džukić and Kalezić, 2004; Sillero et al., 2014). Η οροσειρά της Πίνδου αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά βιογεωγραφικά φράγματα των νοτίων Βαλκανίων επηρεάζοντας σε μεγάλο βαθμό τα πρότυπα κατανομών πολλών ειδών με το να εμποδίζει την εξάπλωση πολλών ειδών από τα δυτικά στα ανατολικά και αντιστρόφως. Υπάρχουν αρκετά χαρακτηριστικά παραδείγματα ερπετών και αμφιβίων, των οποίων η κατανομή έχει επηρεαστεί από τις εξωτερικές Ελληνίδες της ηπειρωτικής Ελλάδας, συμπεριλαμβανομένων των σαυρών *Anguis graeca*, *Podarcis tauricus ionicus*, *Algyroides nigropunctatus*, *Lacerta viridis* και υποειδών του είδους *Lacerta trilineata* (Valakos et al., 2008; Gvoždík et al., 2010; Sagonas et al., 2014; Marzahn et al., 2016), των άνυρων αμφιβίων *Pelophylax epeiroticus* και *P. shqipericus* (Džukić and Kalezić, 2004; Valakos et al., 2008) και των φιδιών *Vipera ammodytes*, *V. ursinii graeca*, *Zamenis longissimus* και *Natrix tessellata* (Ursenbacher et al., 2008; Guicking et al., 2009;

Musilová et al., 2010; Ferchaud et al., 2012). Η Πελοπόννησος, μια γειτνιαζούσα βιογεωγραφική περιοχή, έχει επίσης επηρεαστεί από το φαινόμενο «φιλτραρίσματος» των ειδών από τις εξωτερικές Ελληνίδες της ηπειρωτικής Ελλάδας. Σε συνδυασμό με τη μοναδική γεωλογική απομόνωσή της, το παραπάνω είχε ως αποτέλεσμα η Πελοπόννησος να φιλοξενεί πλήθος ενδημικών ειδών με χαρακτηριστικά παραδείγματα ερπετοπανίδας να αποτελούν τα είδη *A. moreoticus*, *Hellenolacerta graeca*, *P. peloponnesiacus* και *A. cephalonnica* (Valakos et al., 2008)].

## 5. Ταξινόμική ομάδα μελέτης

### 5.1. Οι σαύρες ως οργανισμός μοντέλο στην επιστήμη της Εξελικτικής Βιολογίας

Είναι πλέον αποδεκτό από τον επιστημονικό κόσμο ότι οι σαύρες αποτελούν οργανισμούς μοντέλα στη Βιολογία, με την επιστήμη της Εξελικτικής Βιολογίας να μην αποτελεί εξαίρεση (Huey et al., 1983; Pianka and Vitt, 2003; Losos, 2009; Camargo et al., 2010). Αυτό οφείλεται σε μια σειρά χαρακτηριστικών που τις καθιστά ιδανικούς οργανισμούς για τη μελέτη εξελικτικών διαδικασιών και φαινομένων που εμπίπτουν στους κλάδους της Φυλογένεσης και της Φυλογεωγραφίας και για την απάντηση ερωτημάτων ειδογένεσης και προσαρμοστικής διαφοροποίησης (Camargo et al., 2010). Τα χαρακτηριστικά αυτά, εκτός των άλλων, περιλαμβάνουν: (α) την ευκολία προσέγγισης και συλλογής από τους ερευνητές λόγω της ημερήσιας δραστηριότητάς τους και των σταθερών σχετικά πληθυσμιακών μεγεθών, (β) τη μικρή ικανότητα εποίκισης τους σε νέες περιοχές, (γ) το μεγάλο εύρος κατανομής τους από άποψη γεωγραφίας, αλλά και ποικιλίας τύπων, (δ) τη σχετικά υψηλή ποικιλομορφία τους σε μέγεθος, μορφολογία και οικολογία, και (ε) τη συσσώρευση γνώσης για τη φυσική τους ιστορία μέσω των εκτεταμένων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί (Pianka and Vitt, 2003; Camargo et al., 2010).

## 5.2. Η οικογένεια των σαυρών *Lacertidae* Oppel, 1811

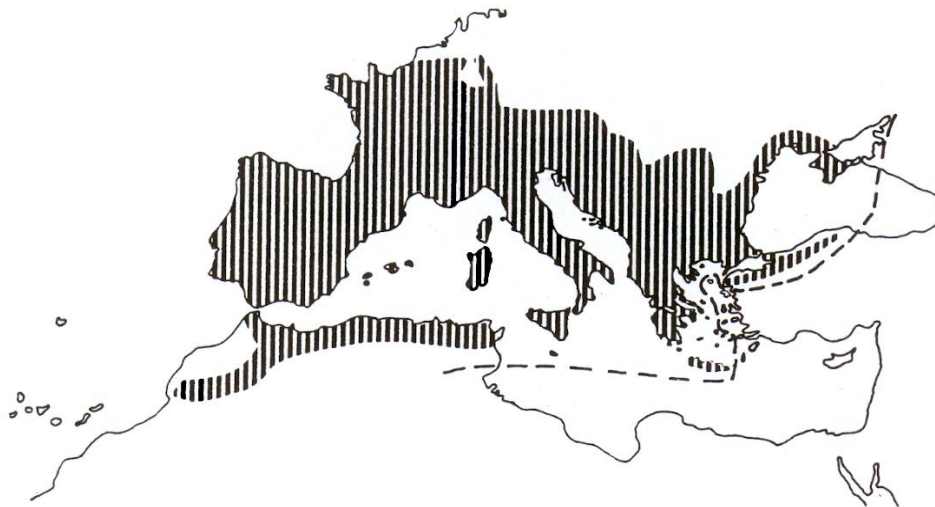
Σε παγκόσμιο επίπεδο η οικογένεια *Lacertidae* περιλαμβάνει 322 είδη που αντιστοιχούν σε 42 γένη (Uetz and Hošek, 2016) και τα οποία κατανέμονται στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, της Ασίας και της Αφρικής και απαντώνται σε πλήθος ενδιαίτημάτων, από δάση και θαμνότοπους μέχρι αλπικές και θερμές ερήμους (Bauer et al., 1998). Οι σαύρες της οικογένειας *Lacertidae*, αποκαλούμενες κοινώς και «αληθινές σαύρες», αποτελούν την επικρατέστερη, σε αφθονία taxa, ομάδα σαυρών στον χώρο της Ευρώπης, με τα γένη *Lacerta* και *Podarcis* να είναι τα πλέον διαφοροποιημένα και ευρύτερα κατανεμημένα (Uetz and Hošek, 2016).

Τα *Lacertidae* περιλαμβάνουν μικρού προς μεσαίου μεγέθους σαύρες. Τα περισσότερα είδη έχουν μήκος μικρότερο από 9 εκ., χωρίς να περιλαμβάνεται η ουρά, αν και το μεγαλύτερο σε μέγεθος είδος της οικογένειας, το *Gallotia stehlini*, φτάνει τα 46 εκ., ενώ κάποιες εξαφανισμένες μορφές ήταν ακόμα μεγαλύτερες (Bauer et al., 1998). Μορφολογικά τα μέλη της οικογένειας *Lacertidae* είναι παρόμοιας μορφής, με μακρόστενο σώμα και μακριά ουρά, ωστόσο παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία σε χρωματικά πρότυπα ακόμα και εντός του ίδιου είδους. Τα περισσότερα είδη εμφανίζουν φυλετικό διμορφισμό, με τα αρσενικά και τα θηλυκά να έχουν διαφορετικά χρωματικά πρότυπα (Bauer et al., 1998). Οι φολίδες είναι μεγάλου μεγέθους στο κρανίο, μικρές και κοκκώδεις στη ράχη και ορθογώνιου σχήματος στην κοιλία. Όσον αφορά τη διατροφή τους, είναι κατά κύριο λόγο εντομοφάγα, αν και μέρος της διαίτας τους μπορεί να περιλαμβάνει και άλλα ασπόνδυλα ή, πιο σπάνια, φυτά (Arnold, 1987). Η θερμοκρασία του σώματός τους βρίσκεται μεταξύ 30 και 39 °C και είναι συνήθως λίγο μεγαλύτερη από αυτήν του περιβάλλοντος και ρυθμίζεται μέσω της έκθεσής τους στον ήλιο (Arnold, 1987). Όλα τα είδη της οικογένειας είναι ωτόκα εξαιρουμένου του είδους *Zootoca vivipara* που είναι ζωοτόκο, ενώ η αναπαραγωγή είναι αμφιγονική με εξαίρεση ορισμένα είδη του γένους *Darevskia*, τα οποία είναι παρθενογενετικά (Arnold et al., 2007).



### 5.3. Το γένος των «τοιχόσαυρων» *Podarcis* Wagler, 1830

Οι σαύρες του γένους *Podarcis*, γνωστές με την κοινή ονομασία «τοιχόσαυρες» ανήκουν στην οικογένεια Lacertidae και διαχωρίζονται, επί του παρόντος, σε 23 είδη (Sindaco et al., 2013; Uetz and Hošek, 2016), ο κατάλογος των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 1.1 μαζί με τις αντίστοιχες κατανομές τους. Πολλά από τα είδη του γένους είναι ενδημικά νησιών της Μεσογείου, ενώ κάποια έχουν εισαχθεί με ανθρωπόχωρη διασπορά σε άλλα μέρη πέραν της φυσικής τους κατανομής (Πίνακας 1.1) (Sindaco and Jeremcenko, 2008). Το γένος έχει καταγωγή από τη δυτική Ευρώπη με τη βιοποικιλότητά του να είναι αποτέλεσμα πολλαπλών γεγονότων βικαριανισμού σχετιζόμενων κατά βάση με τον κατακερματισμό των δυτικών τεκτονικών μικροπλακών κατά τη διάρκεια του Μειοκαινού (Oliverio et al., 2000). Εξαπλώνεται κυρίως στη νότια Ευρώπη, με την κατανομή του να περιλαμβάνει περιοχές από τη βορειοδυτική Αφρική, την Ιβηρική και την Ιταλική Χερσόνησο μέχρι τα νότια Βαλκάνια, τη βορειοδυτική Μικρά Ασία και τη χερσόνησο της Κριμαίας (Εικ. 1.2, Arnold, 1973). Έχουν την τυπική μορφολογία των Lacertidae, με μέτριο μέγεθος (~9 εκ. άνευ ουράς), μεγάλη ποικιλία χρωματισμών, ενώ είναι ωτόκα και καταλαμβάνουν ποικίλα ενδιαίτηματα, συχνά συντοπικά με άλλα Lacertidae (Arnold, 1987).



Εικόνα 1.2 Κατανομή του γένους *Podarcis*. Η διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει τα ανατολικά όρια του γένους (Arnold, 1973).

**Πίνακας 1.1 Τα είδη του γένους *Podarcis* σε αλφαβητική κατάταξη, ο συγγραφέας και η ευρύτερη περιοχή εξάπλωσής τους, σύμφωνα με τους Uetz and Hošek (2016).**

Είδος	Συγγραφέας	Ευρύτερη Περιοχή Εξάπλωσης
<i>P. bocagei</i>	(Seoane, 1885)	ΒΔ/Δ κεντρική Ισπανία, Β/Δ/Α κεντρική Πορτογαλία
<i>P. carbonelli</i>	Perez Mellado, 1981	Εντοπισμένοι πληθυσμοί σε Ισπανία και Πορτογαλία
<i>P. cretensis</i>	(Wettstein, 1952)	Δ Κρήτη και νησίδες κεντρικής και Α Κρήτης
<i>P. erhardii</i>	(Bedriaga, 1882)	Ηπειρωτική Ελλάδα, Νησιά Αιγαίου (εκτός Α & Ν), Κορινθία, Ζάκυνθος (μεταφερμένο) Αλβανία, ΠΓΔΜ, Ν Βουλγαρία
<i>P. filfolensis</i>	(Bedriaga, 1876)	Αρχιπέλαγος Μάλτας
<i>P. gaigeae</i>	(Werner, 1930)	Αρχιπέλαγος Σκόρου και νησίδα Πιπέρι Β Σποράδων
<i>P. guadarramae</i>	(Boscá, 1916)	Κεντρική Δ Ισπανία και Β Πορτογαλία
<i>P. hispanicus</i>	(Steindachner, 1870)	Πορτογαλία, Ισπανία, Γιβραλτάρ, Ν Γαλλία, Β Μαρόκο, Β Αλγερία, Β Τυνησία
<i>P. lewendis</i>	Lymberakis, Poulakakis, Kaliontzopoulou, Valakos & Mylonas, 2008	Νησίδες Πορί και Λαγουβάρδος/Πορέτι
<i>P. lilfordi</i>	(Günther, 1874)	Αρχιπέλαγος Βαλεαριδών Νήσων
<i>P. liolepis</i>	(Boulenger, 1905)	ΝΑ Ισπανία, Ανδόρα, Γαλλία
<i>P. melisellensis</i>	(Braun, 1877)	Δαλματικές Ακτές και νήσοι Κροατίας, Σλοβενίας και Μαυροβουνίου, ΒΑ Ιταλία, ΒΔ Αλβανία
<i>P. milensis</i>	(Bedriaga, 1882)	Αρχιπέλαγος Μήλου
<i>P. muralis</i>	(Laurenti, 1768)	Ευρεία εξάπλωση σε όλη την Ευρώπη, εισαγμένο σε Αγγλία, ΗΠΑ & Καναδά
<i>P. peloponnesiacus</i>	(Bibron & Bory, 1833)	Πελοπόννησος, εισαγμένο σε Αττική
<i>P. pityusensis</i>	(Boscá, 1883)	Αρχιπέλαγος Βαλεαριδών Νήσων
<i>P. raffoneae</i>	(Mertens, 1952)	Νησιά Β Σικελίας (Liparian Islands)
<i>P. siculus</i>	(Rafinesque-Schmaltz, 1810)	Ν Γαλλία, Ισπανία, Ελβετία, Ιταλία, Μαυροβούνιο, Κροατία, εισαγμένο σε Κορσική, Καταλονία, Μινόρκα, Αγγλία, νησιά Αδριατικής, Ελλάδα, Τουρκία, ΗΠΑ
<i>P. tauricus</i>	(Pallas, 1814)	ΝΔ Ουκρανία, χερσόνησος Κριμαίας, Ν/Α Ρουμανία, ΝΑ Ουγγαρία, ΠΓΔΜ, Βουλγαρία, Ηπειρωτική Ελλάδα και Ιόνιοι Νήσοι, νησίδα Θασοπούλα Β Αιγαίου, ΒΔ Τουρκία, Αλβανία, Ν Μολδαβία
<i>P. tiliguerta</i>	(Gmelin, 1789)	Αρχιπέλαγος Σαρδηνίας και Κορσικής
<i>P. vaucheri</i>	(Boulenger, 1905)	Ν Ισπανία, Μαρόκο, Πορτογαλία, ΒΔ Αλγερία, Τυνησία
<i>P. virescens</i>	Geniez, Sá-Sousa, Guillaume, Cluchier & Crochet, 2014	Νότια κεντρική Ισπανία
<i>P. waglerianus</i>	Gistel, 1868	Αρχιπέλαγος Σικελίας

### 5.3.1. Μια σημείωση για το φύλο (genre) του γένους *Podarcis*

Το γένος *Podarcis* περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Wagler (1830). Στην περιγραφή του ονόματος του γένους ο Wagler επεσήμανε ως ετυμολογία το «*pedibus celer*» που σημαίνει «γρήγορα πόδια». Η λέξη *Podarcis* αποτελεί λατινοποίηση του αρχαίου ελληνικού επιθέτου «*podarkēs* - ποδάρκης» (από τις λέξεις *πους* και *αρκέω* δηλαδή ο «αρκετός», ο ικανός στα πόδια, ο ταχύπους). Ωστόσο ο ίδιος ο Wagler δεν έκανε επίσημα καμία αναφορά όσον αφορά το φύλο (genre) του taxon *Podarcis*. Δύο αιώνες αργότερα αυτό προκάλεσε αντιπαράθεση σχετικά με το εάν το γένος *Podarcis* είναι αρσενικό ή θηλυκό, επηρεάζοντας έτσι την δωνυμική ονομασία των ειδών *P. sicul-us* (-a), *P. waglerian-us* (-a), *P. hispanic-us* (-a), *P. tauric-us* (-a) και *P. peloronnasiac-us* (-a) και των υποειδών τους. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι το «ποδάρκης» ως επίθετο δεν έχει φύλο. Η επιστημονική αυτή αντιπαράθεση ξεκίνησε όταν ο Böhme (1997) πρότεινε ότι το γένος είναι αρσενικού φύλου βασιζόμενος σε δύο επιχειρήματα: (α) από τη θεώρηση του ότι ο Wagler γνώριζε ότι το επίθετο «ποδάρκης» αναφερόταν από τον Όμηρο ως συγκεκριμένο γνώρισμα του Αχιλλέα και (β) από το γεγονός ότι ο Fitzinger επέλεξε ως τυπικό δείγμα (type specimen) του γένους το *Seps muralis*, το οποίο είναι αρσενικό και με βάση αυτό θα πρέπει να γίνει αποδοχή του *Podarcis* ως αρσενικό. Μία από τις πρώτες αντιδράσεις προήρθε από τους Lanza and Boscherini (2000), οι οποίοι θεώρησαν ότι το πρώτο επιχειρήμα του Böhme είναι απλή εικασία και ότι το επίθετο «ποδάρκης» αναφερόταν όχι στον Αχιλλέα, αλλά στην άρπυια Ποδάρκη, μητέρα των αλόγων του Αχιλλέα και ως εκ τούτου το γένος θα πρέπει να θεωρείται θηλυκό. Συνέχεια στην αντιπαράθεση έδωσε ο Arnold (2000), ο οποίος επίσης απέρριψε το πρώτο επιχειρήμα ως εικασία και το δεύτερο στηριζόμενος στο γεγονός ότι η λέξη «*seps*» επίσης δεν έχει φύλο και ότι ο Fitzinger δεν ανέφερε συγκεκριμένα το γένος *Seps*. Πρότεινε ότι αφού δεν μπορεί να αποδειχτεί το φύλο του γένους *Podarcis* να παραμείνει η χρήση του ως θηλυκό μιας και έτσι χρησιμοποιείται ιστορικά στην Ταξινόμια και θα αποφευχθούν με αυτόν τον τρόπο άσκοπες αλλαγές στα ονόματα των ειδών, κάτι που συνάδει με το πνεύμα του Διεθνή Κώδικα Ζωολογικής Ονοματολογίας (International Code of Zoological Nomenclature - ICZN) που υποστηρίζει την σταθερότητα των ονομάτων. Η τελική

απάντηση ήρθε από τον Böhme (2005), ο οποίος εκτός των άλλων αντεπιχειρημάτων συμφώνησε τελικά ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη αναφορά σχετικά με το φύλο του ονόματος *Podarcis*, αλλά κατέληξε στο ότι το γένος *Podarcis* πρέπει να θεωρείται αρσενικό βασιζόμενος στο άρθρο 30.1.4.2 του ICZN που αναφέρει ότι «...το όνομα ενός γένους το οποίο είναι λέξη ή έχει κατάληξη λέξης, η οποία δεν έχει φύλο, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως αρσενικό εκτός και αν ο συγγραφέας που περιέγραψε το γένος, ανέφερε ότι είναι θηλυκό...». Ως εκ τούτου στην παρούσα διατριβή ακολουθείται η πρόταση του Böhme και η χρήση του *Podarcis* ως αρσενικό. Κατά τη γνώμη του συγγραφέα της διατριβής αυτό υποστηρίζεται επιπλέον (α) από το γεγονός ότι η λέξη «Ποδάρκης» αναφέρεται σε δύο διαφορετικές ραψωδίες της Ιλιάδας (ραψωδία Β, στίχος 704 και ραψωδία Ν, στίχοι 693 και 698), αναφερόμενη στον *Ποδάρκη* τον πρωτότοκο υιό του Ιφίκλου που ήταν γνωστός για την ικανότητά του ως δρομέας και (β) από το γεγονός ότι *Ποδάρκης* ήταν και το αρχικό όνομα του Πριάμου, βασιλιά της Τροίας.

#### 5.4. Τα υπό εξέταση taxa

Φυλογενετικά, τα είδη του γένους *Podarcis* έχουν διαχωριστεί σε ομάδες και υποομάδες ειδών (βλ. εισαγωγή Δεύτερου Κεφαλαίου για λεπτομέρειες). Τα υπό μελέτη taxa της παρούσας διατριβής συμπεριλαμβάνονται στη Βαλκανική ομάδα ειδών, η οποία αποτελείται από δύο διακριτές υποομάδες: (α) την υποομάδα «*P. erhardii*» που αποτελείται από τα είδη *P. cretensis*, *P. erhardii*, *P. levendis* και *P. peloponnesiacus*, και (β) την υποομάδα «*P. tauricus*» που περιλαμβάνει τα είδη *P. gaigeae*, *P. melisellensis*, *P. milensis* και *P. tauricus* (Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d). Παρακάτω αναφέρονται στοιχεία μορφολογίας, κατανομής, Ταξινομίας και Βιολογίας των ειδών της υπό εξέτασης υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» με το σύνολο των πληροφοριών να προέρχεται από το βιβλίο *The Amphibians and Reptiles of Greece* (Valakos et al., 2008) εκτός από τις πληροφορίες για το είδος *P. melisellensis*, οι οποίες προέρχονται από το βιβλίο των Tiedemann and Henle (1986).

### 5.4.1. *Podarcis gaigeae* (Werner, 1930)

Το είδος *P. gaigeae*, γνωστό ως Σαύρα της Σκύρου (Skyros wall lizard), αποτελεί νησιωτικό ενδημικό είδος της Ελλάδας και του Αιγαίου και υποδιαιρείται ταξινομικά σε δυο υποείδη. Πιο συγκεκριμένα κατανέμεται στο νησιωτικό συγκρότημα της Σκύρου (Εικ. 1.3), δηλαδή στη Σκύρο και τις δορυφορικές νησίδες της [υποείδος *P. g. gaigeae* (Werner, 1930)], καθώς επίσης και στη νησίδα Πιπέρι των Βόρειων Σποράδων [υποείδος *P. g. weigandi* (Gruber & Schultze-Westrum, 1971)]. Τα ενδιαιτήματα που προτιμά είναι η ανοικτή βλάστηση τύπου μακί, οι καλλιέργειες και οι αμμοθίνες. Σε θαμνώδη ενδιαιτήματα μπορεί να σχηματίσει πυκνούς πληθυσμούς μιας και οι θάμνοι παρέχουν αρκετά καταφύγια (έναντι θηρευτών και δυσχερών περιβαλλοντικών συνθηκών). Το είδος αυτό έχει μεσαίο μέγεθος (~6 cm χωρίς την ουρά) και εμφανίζει φυλετικό διμορφισμό. Στα αρσενικά το χρώμα της ράχης είναι ανοικτό πράσινο με μαύρες κηλίδες (Εικ. 1.4), οι οποίες σχηματίζουν ραχιαίες και ραχαιοπλευρικές λωρίδες, ενώ κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου εμφανίζουν μπλε κηλίδες στα πλευρά. Η κοιλιά τους είναι λευκόχρωμη με μερικές μαύρες φολίδες στο λαιμό. Κάποιες φορές θυμίζουν τα αρσενικά του είδους *P. milensis*. Τα θηλυκά εμφανίζουν λιγότερα χρωματικά πρότυπα έχοντας ομοιόμορφο πράσινο-καφέ χρώμα. Βιολογικά τα άτομα του είδους είναι ενεργά καθόλη τη διάρκεια του έτους εκτός από κάποιες κρύες μέρες του χειμώνα, ενώ το καλοκαίρι σε ημερήσια βάση είναι ενεργά νωρίς το πρωί ή αργά το απόγευμα. Κυρίως τρέφονται με αρθρόποδα και πιο συγκεκριμένα με έντομα, με το καλοκαίρι να έχει παρατηρηθεί η σχεδόν αποκλειστική διατροφή τους με μυρμήγκια, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις κατανάλωσης φυτών. Έχουν μακρά αναπαραγωγική περίοδο, η οποία διαρκεί από τα μέσα του χειμώνα έως το καλοκαίρι, με πολλαπλές εκκολάψεις των 1-3 αυγών. Σε κάποια νησιά έχουν παρατηρηθεί εμφανείς περιπτώσεις νησιωτικού γιγαντισμού (10 cm δίχως ουρά). Από άποψη Κατάστασης Διατήρησης το είδος βρίσκεται στο Παράρτημα III της Συνθήκης της Βέρνης. Επίσης, έχει χαρακτηριστεί ως Τρωτό (vulnerable) από την IUCN (<http://www.iucnredlist.org>), λόγω της περιορισμένης του κατανομής και της πιθανότητας να κινδυνεύει από την εισαγωγή θηρευτών στις περιοχές εξάπλωσής του.



Εικόνα 1.3. Κατανομή του είδους *P. gaigeae* σύμφωνα με την IUCN.



Εικόνα 1.4. Ενήλικο άτομο του είδους *P. gaigeae* (Φωτογραφία: Jan Van Der Voort).

#### 5.4.2. *Podarcis melisellensis* (Braun, 1877)

Το είδος *P. melisellensis*, γνωστό ως Τοιχόσαυρα της Δαλματίας (Dalmatian wall lizard), εξαπλώνεται στις αδριατικές ακτές και σε νησιά και νησίδες από τα σύνορα της Ιταλίας έως τη βόρεια Αλβανία (Εικ. 1.5). Περιλαμβάνει τρία υποείδη, δύο περιεγραμμένα ως *P. m. melisellensis* (Braun, 1877) και *P. m. fiumana* (Werner, 1891) και ένα μη περιεγραμμένο (Podnar et al., 2004; Sindaco and Jeremcenko, 2008). Το μήκος του κεφαλοκορμού στα ενήλικα άτομα ξεπερνάει τα 6,5 εκ., ενώ η ουρά του έχει διπλάσιο μήκος από το σώμα του. Η κοιλιακή τους πλευρά είναι άσπρη, πορτοκαλί ή κόκκινη, συνήθως χωρίς άλλα χρωματικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Το χρώμα της ράχης είναι ανοιχτό καφέ ή πράσινο (Εικ. 1.6). Σε γενικές γραμμές τα χρωματικά πρότυπα ποικίλλουν: μερικά ζώα, ιδιαίτερα στις ακτές, στερούνται κηλίδων κ.λπ., άλλα εμφανίζουν λεπτές, εμφανείς ανοιχτόχρωμες νωτοκοιλιακές λωρίδες και μια σκουρόχρωμη λωρίδα στη ράχη, τουλάχιστον στο πίσω μέρος της. Τα θηλυκά παράγουν δύο με οκτώ αυγά σε κάθε εκκόλαψη. Ζουν σε ποικιλία ξηρών κυρίως ενδιαιτημάτων, περισσότερο στο έδαφος, αν και μπορούν να αναρριχηθούν σε χαμηλούς τοίχους και σε βράχους. Το είδος συναντάται από το επίπεδο της θάλασσας έως και τα 1.400 μ. υψόμετρο. Το είδος αντικαθίσταται από το *P. muralis* στην ενδοχώρα σε πιο υγρές και σκιερές περιοχές και σε μεγάλα υψόμετρα, ενώ στα παράλια εμφανίζεται συμπάτριο με το *P. siculus* στα βόρεια (Arnold & Burton 1978), ενώ στα νότια (Αλβανία) έχει επικαλυπτόμενη κατανομή με το *P. tauricus*. Σύμφωνα με την IUCN το είδος αυτό θεωρείται Ελάχιστου Ενδιαφέροντος (Least Concern) από άποψη διατήρησης.



Εικόνα 1.5. Κατανομή του είδους *P. melisellensis* σύμφωνα με την IUCN.



Εικόνα 1.6. Ενήλικο άτομο του είδους *P. melisellensis* (Φωτογραφία: Jakob Fahr).



### 5.4.3. *Podarcis milensis* (Bedriaga, 1882)

Το είδος *P. milensis*, γνωστό ως Χρυσοφυλλίδα ή Σαύρα της Μήλου (Milos wall lizard), αποτελεί επίσης νησιωτικό ενδημικό είδος της Ελλάδας και του Αιγαίου και υποδιαιρείται ταξινομικά σε τρία υποείδη. Πιο συγκεκριμένα, κατανέμεται στο νησιωτικό συγκρότημα της Μήλου (Εικόνα 1.7), δηλαδή στη Μήλο, στην Κίμωλο, στην Πολύαιγο, στην Αντίμηλο και στις μικρότερες δορυφορικές νησίδες τους [υποείδος *P. m. milensis* (Bedriaga, 1882)], στις απομακρυσμένες βραχονησίδες Ανάνες [υποείδος *P. m. gerakuniae* (Müller, 1938)], καθώς και στις βραχονησίδες Βελοπούλα και Φαλκονέρα [*P. m. adolfjordansi* (Buchholz, 1962)]. Το είδος μπορεί να βρεθεί σε σχετικά μεγάλο εύρος ενδιατημάτων, όπως κήπους, καλλιέργειες, ξερολιθιές, βραχώδεις περιοχές, φρύγανα, μεσογειακούς θαμνότοπους, αμμοθίνες με αλόφυτα και δίπλα σε δρόμους. Το είδος αυτό έχει μικρό μέγεθος (μέγιστο τα 6,5 εκ. χωρίς την ουρά) και εμφανίζει φυλετικό διμορφισμό τόσο σε μέγεθος όσο και σε χρώμα. Στα αρσενικά το χρώμα της ράχης είναι γκρι-καφέ ή πράσινο και των πλευρών μαύρο με μεγάλες πράσινες, μπλε, τρκουάζ, λευκές ή κίτρινες κηλίδες (Εικ. 1.8). Η κοιλιά, ιδιαίτερα στα αρσενικά, έχει επίσης πολυάριθμες λευκές και μαύρες κηλίδες και λωρίδες. Ο χρωματισμός των θηλυκών είναι γενικά πιο θολός, ενώ κάποιες φορές φέρουν αχνές ραχαιοπλευρικές λωρίδες και λίγους μαύρους αλλά έντονους σχηματισμούς στον λαιμό. Τα ανήλικα έχουν λωρίδες έντονου χρώματος στα πλευρά. Σε κάποιες περιοχές τα αρσενικά δεν έχουν κηλίδες αλλά μαύρο σαγόνι και λαιμό. Βιολογικά τα άτομα του είδους είναι ενεργά καθόλη τη διάρκεια του έτους και αναλόγως την εποχή μία ή δύο ημερήσιες ενεργές περιόδους. Κινείται πολύ γρήγορα και συχνά θερμορυθμίζει σε πέτρες, ενώ τρέφεται με αρθρόποδα (κυρίως μυρμήγκια). Τυπικό του νησιωτισμού, το είδος χαρακτηρίζεται από πολλαπλές εκκολάψεις 1-3 αυγών μέσα στο έτος. Από άποψη κατάστασης διατήρησης το είδος προστατεύεται με Προεδρικό Διάταγμα (67/1981) και βρίσκεται στα Παραρτήματα IV της Ευρωπαϊκής Οδηγίας και II της Συνθήκης της Βέρνης. Επίσης έχει χαρακτηριστεί ως Σχεδόν Απειλούμενο (near threatened) από την IUCN λόγω της περιορισμένης εξάπλωσης, μέρος της οποίας βρίσκεται εντός προστατευόμενων ζωνών και εντός του δικτύου NATURA2000.



Εικόνα 1.7. Κατανομή του είδους *P. milensis* σύμφωνα με την IUCN.



Εικόνα 1.8. Ενήλικο άτομο του είδους *P. milensis* (Φωτογραφία: Απόστολος Τριχάς).

#### 5.4.4. *Podarcis tauricus* (Pallas, 1814)

Το είδος *P. tauricus*, γνωστό ως Βαλκανόσαυρα (Balkan wall lizard), αποτελείται από τρία υποείδη. Το φερώνυμο υποείδος *P. t. tauricus* (Pallas) έχει ευρεία κατανομή (Εικ. 1.9) από τη χερσόνησο της Κριμαίας, τη νότια Μολδαβία και τη νοτιοανατολική Ρουμανία έως τη Βουλγαρία, την ευρωπαϊκή Τουρκία, τη βορειοδυτική Τουρκία, την ΠΓΔΜ και τη Σερβία, καθώς και στην ηπειρωτική Ελλάδα και Αλβανία (ανατολικά των εξωτερικών Ελληνίδων). Επίσης υπάρχουν απομονωμένοι πληθυσμοί στην Ουγγαρία. Το υποείδος *P. t. ionicus* (Leurs, 1902) (Εικ. 1.10) βρίσκεται επίσης στην Ελλάδα και στην Αλβανία (δυτικά των εξωτερικών Ελληνίδων), στα Επτάνησα εκτός της Λευκάδας και στην Πελοπόννησο, Εικ. 1.9), ενώ το υποείδος *P. t. thasopulae* (Kattinger, 1942) (Εικ. 1.11) είναι ενδημικό της νησίδας Θασοπούλα που βρίσκεται ανάμεσα στη Θάσο και την ηπειρωτική περιοχή της Καβάλας (Κεραμωτή). Χαρακτηριστικό του είδους είναι ότι είναι απόν από οποιοδήποτε άλλο νησί ή νησίδα του Αιγαίου εκτός της Θασοπούλας (η παρουσία του στη Θάσο δεν έχει επιβεβαιωθεί). Το είδος αυτό προτιμά σχετικά επίπεδες ανοικτές εκτάσεις χαμηλής βλάστησης που δέχονται αρκετή ηλιακή ακτινοβολία. Είναι ένα τυπικό εδαφόβιο είδος με μειωμένη ικανότητα αναρρίχησης. Γενικά η παρουσία του είδους συσχετίζεται με περιοχές βλάστησης και μπορεί να βρεθεί σε αγροτικές περιοχές, ξέφωτα δασών, λιβάδια, αλιπεδα και αμμοθίνες με αραιά βλάστηση, καθώς και σε κήπους, ελαιώνες, παραδοσιακές καλλιέργειες, δίπλα σε δρόμους κ.λπ., όπου παρατηρείται χαμηλή βλάστηση. Το είδος μπορεί να βρεθεί αρκετά κοντά σε περιοχές με ανθρώπινη δραστηριότητα και επίσης στην άμμο και στα χαλίκια δίπλα στη θάλασσα ή σε γλυκό νερό. Ζει από το επίπεδο της θάλασσας έως τα 2.300 μ. υψόμετρο, αλλά συνήθως προτιμά περιοχές των 700-800 μ. σε υψόμετρο. Έχει μεσαίο μέγεθος (μέγιστο τα 8 εκ. χωρίς την ουρά) και ο χρωματισμός της εμφανίζει υψηλό βαθμό εποχικής διακύμανσης έτσι ώστε να ταιριάζει καλύτερα χρωματικά με το περιβάλλον του. Το βασικό ραχιαίο χρώμα είναι το έντονο πράσινο την άνοιξη και στην αρχή του καλοκαιριού, αλλά αλλάζει σε λαδί και καφέ προς το φθινόπωρο ή σε πληθυσμούς που ζουν σε ξηρότερες περιοχές. Τα πίσω πόδια και η ουρά είναι καφέ, ενώ τα πλευρά έχουν σκούρες μικρές και μεγάλες κηλίδες και μπορούν να είναι είτε πράσινα, όπως η ράχη, είτε

καφετί με λωρίδες, είτε πράσινα που τρέπονται σε καφέ προς τα οπίσθια πόδια. Η μπροστινή ραχιαία περιοχή είναι ασυνήθιστα λιγότερο εκτεταμένη στα θηλυκά ενώ οι ραχαιοπλευρικές λωρίδες είναι πιο σαφώς ορισμένες. Βιολογικά, τα άτομα του είδους έχουν δύο ημερήσιες περιόδους δραστηριότητας ειδικά προς το τέλος της άνοιξης και το καλοκαίρι. Η χειμέρια νάρκη διαρκεί από τα τέλη του Φεβρουαρίου έως τις αρχές του Μαρτίου, εξαρτώμενη από τις τοπικές καιρικές συνθήκες του χειμώνα. Το είδος τρέφεται με αρθρόποδα, προτιμώντας Ορθόπτερα, και χαρακτηρίζεται από δύο με τρεις ετήσιες εκκολάψεις. Από άποψη κατάστασης διατήρησης το είδος προστατεύεται με Προεδρικό Διάταγμα (67/1981) και βρίσκεται στα Παραρτήματα IV της Ευρωπαϊκής Οδηγίας και II της Συνθήκης της Βέρνης. Η IUCN το χαρακτηρίζει ως Ελάχιστου Ενδιαφέροντος. Η κατανομή του είδους καλύπτει αρκετές περιοχές που βρίσκονται εντός του δικτύου NATURA2000.



Εικόνα 1.9. Η κατανομή του είδους *P. tauricus* σύμφωνα με την IUCN. Η διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει τις Εξωτερικές Ελληνίδες της ηπειρωτικής Ελλάδας (Οροσειρά Πίνδου). Δυτικά της γραμμής κατανέμεται το υποείδος *P. t. ionicus*, ενώ ανατολικά το υποείδος *P. t. tauricus* (μαζί με το υποείδος *P. t. thasopulae* της νησίδας Θασοπούλας (βόρεια της νήσου Θάσου).



Εικόνα 1.10. Ενήλικο άτομο του υποείδους *P. t. thasopulae* από τη νησίδα Θασοπούλα (Φωτογραφία: Απόστολος Τριχάς).



Εικόνα 1.11. Ενήλικο άτομο του υποείδους *P. t. ionicus* από την Κέρκυρα (Φωτογραφία: Απόστολος Τριχάς).

## 6. Γενικά κίνητρα και στόχοι της παρούσας διατριβής

Για την επιλογή του θέματος της παρούσας διατριβής αφορμή στάθηκε το ότι μέχρι στιγμής η φυλογένεση των βαλκανικών *Podarcis* δεν έχει επιλυθεί σε ικανοποιητικό βαθμό και το ότι, όσον αφορά την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*», δεν έχει χρησιμοποιηθεί ο απαραίτητος αριθμός αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από όλη την κατανομή της ομάδας. Χαρακτηριστικό είναι ότι στη βάση γεντικών δεδομένων GenBank υπάρχουν αλληλουχίες για δύο μόνο δείγματα του είδους *P. milensis*, ενώ για το είδος *P. tauricus* υπάρχουν ελάχιστες αλληλουχίες για άτομα εκτός Ελλάδας, με τα ελληνικά να είναι ταυτόχρονα λίγα σε αριθμό.

Επιπλέον κίνητρο προσέφερε το γεγονός της άνθησης των μοριακών και μη «εργαλείων» που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων αλλά και των φυλογεωγραφικών προτύπων των ειδών. Μέχρι στιγμής, για τη μελέτη της μοριακής φυλογένεσης των βαλκανικών *Podarcis* έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο δύο γονίδια mtDNA (*cyt b* και *16S rRNA*) (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005c; Poulakakis et al., 2005d) και ένα μη πληροφοριακό πυρηνικό (*c-mos*) (Πουλακάκης, 2005).

Στοχεύοντας σε μια ολοκληρωμένη μελέτη της Μοριακής Φυλογένεσης της υποομάδας «*P. tauricus*» και με στόχο να ξεπεραστούν οι παραπάνω περιορισμοί, στην παρούσα εργασία συλλέχθηκε ένα σύνολο δειγμάτων που, από τη μία, περιλαμβάνει δείγματα από όλη τη σύγχρονη κατανομή του είδους *P. tauricus* εκτός Ελλάδας και, από την άλλη, εμπλουτίζει τα ελληνικά δείγματα. Αυτό έγινε είτε ψάχνοντας σε περιοχές που δεν είχε γίνει δειγματοληψία με σκοπό την ανακάλυψη νέων εξελικτικών γραμμών, είτε με προσθήκη δειγμάτων όλων των ειδών από γνωστές τοποθεσίες με σκοπό τη χρήση τους σε πληθυσμιακές αναλύσεις. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα ποικίλης προέλευσης, τόσο γενετικά (mtDNA, nDNA, ddRADseq και μικροδορυφορικά) όσο και δεδομένα παρουσίας, κλιματικά, περιβαλλοντικά και παλαιογεωγραφικά, ενώ εφαρμόστηκε ποικιλία αναλύσεων (βιογεωγραφικές, ιστορικής δημογραφίας, φυλογενετικές, χρονοφυλογενετικές, οριοθέτησης ειδών, μοντελοποίησης χωρικής κατανομής και πληθυσμιακής γενετικής).

## 7. Δείγματα και σύνολα δειγμάτων

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δεδομένων που περιλαμβάνει αλληλουχίες που παράχθηκαν σε αυτήν τη διατριβή καθώς και αλληλουχίες που ελήφθησαν από τη γενετική βάση δεδομένων NCBI. Πολλά από τα παραπάνω δεδομένα προήρθαν από δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών που έγιναν στο χρονικό διάστημα 2012-2015 και στις οποίες συμμετείχε ο ίδιος συγγραφέας της παρούσας διατριβής. Απώτερος στόχος όσον αφορά τη συλλογή και χρήση δεδομένων ήταν: (α) η κάλυψη, σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο βαθμό των γεωγραφικών κατανομών των υπό εξέταση ειδών/υποειδών/φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων, (β) η προσπάθεια λήψης δεδομένων από όσο το δυνατόν περισσότερους γενετικούς τόπους και η προσπάθεια δημιουργίας συνόλων δεδομένων δίχως «κενά», και (γ) η συλλογή δειγμάτων για εξαγωγή DNA υψηλής ποιότητας (βλέπε παρακάτω).

Τα παραπάνω πρωτογενή δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μετα-δεδομένων από αναλύσεις φυλογένεσης, φυλογενωμικής, φυλογεωγραφίας, βιογεωγραφίας, πληθυσμιακής γενετικής, δημογραφίας, μοντελοποίησης χωρικών κατανομών και οριοθέτησης ειδών. Επειδή κάθε ανάλυση είχε το δικό της σκοπό και συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες, διαφορετικά σύνολα δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μία από αυτές. Στο Παράρτημα II δίνονται τα έξι διαφορετικά σύνολα δειγμάτων και η αντιστοίχιση κάθε δείγματος ή αλληλουχίας σε ένα ή παραπάνω από αυτά. Το Σύνολο Δειγμάτων I περιλαμβάνει 365 δείγματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις για την παραγωγή δέντρου βάσει των δύο mtDNA γονιδίων (Δεύτερο Κεφάλαιο). Αποτελείται ουσιαστικά από αλληλουχίες των γονιδίων *cyt b* και *16S rRNA* τόσο της παρούσας διατριβής όσο και της βάσης NCBI, ωστόσο δεν υπάρχουν διαθέσιμες οι αλληλουχίες και των δύο γενετικών τόπων για όλα τα δείγματα. Η λογική επιλογής αυτών των δειγμάτων από το σύνολο ήταν η αντιπροσώπευση κάθε σταθμού δειγματοληψίας χωρίς όμως να γίνεται αλληλούχιση όλων των ατόμων του κάθε σταθμού. Το Σύνολο Δειγμάτων II αποτελείται από 52 δείγματα που επιλέχθηκαν ως αντιπρόσωποι των διακριτών γενεαλογιών-συναθροίσεων (PTP, Δεύτερο Κεφάλαιο) με σκοπό την αλληλούχιση των nDNA γενετικών τόπων, ενώ περιλαμβάνει επίσης και

αλληλουχίες δειγμάτων από τη βάση NCBI. Το σύνολο αυτό χρησιμοποιήθηκε (α) για την παραγωγή δέντρου βάσει των τριών nDNA γενετικών τόπων (Δεύτερο Κεφάλαιο) και (β) για την παραγωγή δέντρου βάσει των πέντε (mtDNA και nDNA) γενετικών τόπων (Δεύτερο Κεφάλαιο). Για κάποια δείγματα δεν υπάρχουν διαθέσιμες αλληλουχίες για όλους τους γενετικούς τόπους. Το Σύνολο Δειγμάτων III αποτελείται από 119 άτομα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή δεδομένων Επόμενης Γενιάς Αλληλούχισης και την κατασκευή του φυλογενωμικού δέντρου με τη μέθοδο ddRAD-tags (Τρίτο Κεφάλαιο). Χαρακτηριστικό αυτών των δειγμάτων είναι ότι αποτελούν τους αντιπροσώπους των κύριων φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων των βαλκανικών *Podarcis* και ότι περιείχαν υψηλής ποιότητας DNA, κατάλληλου για την κατασκευή γενωμικής «βιβλιοθήκης». Το Σύνολο Δειγμάτων IV περιλαμβάνει 361 δείγματα της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», στα οποία έγινε γονοτύπηση μικροδορυφορικών τόπων και χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής (Τέταρτο Κεφάλαιο). Η ιδιαιτερότητα αυτού του συνόλου είναι ότι περιλαμβάνει σχεδόν όλα τα άτομα του κάθε σταθμού δειγματοληψίας, σε αντίθεση δηλαδή με το Σύνολο Δειγμάτων II, ωστόσο δεν περιλαμβάνει τα δείγματα με κωδικό 898 έως 953, τα οποία συλλέχθηκαν μετά το πέρας της γονοτύπησης. Το Σύνολο Δειγμάτων V είναι υποσύνολο του Συνόλου Δειγμάτων II μιας και περιλαμβάνει τα δείγματα (34 στο σύνολο) για τα οποία έγινε αλληλούχιση και των πέντε γενετικών τόπων εμπεριέχοντας όλα τα δείγματα του δεύτερου εκτός από αυτά που δεν ανήκουν στην υποομάδα ειδών «*P. tauricus*». Το σύνολο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση οριοθέτησης ειδών (Πέμπτο Κεφάλαιο). Τέλος, το Σύνολο Δειγμάτων VI περιλαμβάνει τα δείγματα εκείνα (72 στο σύνολο) που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρονοφυλογενετική ανάλυση BEAST με βάση τους πέντε γενετικούς τόπους (Έκτο Κεφάλαιο). Ουσιαστικά περιλαμβάνει το Σύνολο Δειγμάτων II και επιπλέον αλληλουχίες από την NCBI που ανήκουν σε taxa, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του χρονοφυλογενετικού δέντρου.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

---

Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών της  
υποομάδας «*Podarcis tauricus*» με χρήση δεδομένων  
αλληλούχισης Sanger

Τα δεδομένα είναι μέρος της δημοσίευσης (Παράρτημα IV):

*Psonis et al. (2017) Hidden diversity in the Podarcis tauricus (Sauria, Lacertidae) species subgroup in the light of multilocus phylogeny and species delimitation. Mol. Phylogenet. Evol. 106, 6-17.*

## 1. Περίληψη κεφαλαίου

Η υποομάδα ειδών «*Podarcis tauricus*» περιλαμβάνει τέσσερα είδη, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη άλυτων φυλογενετικών σχέσεων τόσο μεταξύ τους όσο και μεταξύ των πληθυσμών εντός των ειδών. Η υποομάδα αυτή κατανέμεται στα δυτικά και νότια Βαλκάνια, περιοχή η οποία θεωρείται κέντρο υψηλής βιοποικιλότητας (biodiversity hotspot) ερπετοπανίδας. Πληθώρα ενδημικών ειδών συναντάται κοντά στις εξωτερικές Ελληνίδες της ηπειρωτικής Ελλάδας (οροσειρά Πίνδου), οι οποίες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους βιογεωγραφικούς φραγμούς στη βαλκανική χερσόνησο. Χρησιμοποιώντας δεδομένα αλληλουχιών δύο μιτοχονδριακών και τριών πυρηνικών γενετικών τόπων και εφαρμόζοντας μια σειρά φυλογενετικών μεθόδων σε ένα εκτεταμένο σύνολο δειγμάτων, έγινε μια προσπάθεια ανασύστασης της φυλογένεσης των σαυρών του γένους *Podarcis* στα Βαλκάνια, με έμφαση στην υποομάδα ειδών «*P. tauricus*». Ταυτόχρονα, επανεξετάστηκε η ταξινομική κατάσταση της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», λαμβάνοντας υπόψιν τις φυλογενετικές σχέσεις που αναγνωρίστηκαν. Σύμφωνα με τις αναλύσεις, η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» εμπεριέχει πέντε κύριους φυλογενετικούς κλάδους, με το είδος *P. melisellensis* να βρίσκεται στη βάση του φυλογενετικού δέντρου της υποομάδας. Η μονοφυλετικότητα του taxon *P. tauricus sensu stricto* δεν υποστηρίζεται, με το υποείδος *P. t. ionicus* να εμφανίζει κρυμμένη γενετική ποικιλότητα, αποτελούμενο από πέντε, γεωγραφικά διακριτούς, φυλογενετικούς υποκλάδους, με τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους να φτάνουν σε διαειδικά επίπεδα. Τα ευρήματα αυτά καθιστούν αναγκαία την ταξινομική αναθεώρηση της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Στο πλαίσιο αυτό, προτείνεται η συνωνυμία κάποιων αναγνωρισμένων υποειδών της υποομάδας και η ύπαρξη ενός διακριτού ελληνοαλβανικού είδους ή συμπλέγματος ειδών (species complex) ονόματι, προσωρινά, *P. ionicus*.

**Λέξεις κλειδιά:** Βαλκανική χερσόνησος, Κρυμμένη γενετική ποικιλότητα, Σύμπλεγμα ειδών, Τοιχόσαυρες, Φυλογενετικό δέντρο.

## 2. Εισαγωγή

### 2.1. Μελέτες Μοριακής Φυλογένεσης βαλκανικών taxa

Από τη δεκαετία του '90, όταν και έγιναν οι πρώτες μελέτες Μοριακής Φυλογένεσης μέχρι και σήμερα, ο αριθμός, αλλά και ο ρυθμός με τον οποίο δημοσιεύονται τέτοιου είδους μελέτες όσον αφορά οργανισμούς της βαλκανικής χερσονήσου, έχει αυξηθεί ραγδαία. Οι μελέτες αυτές που εστιάζουν είτε στην επίλυση της φυλογένεσης είτε στη διερεύνηση της φυλογεωγραφίας έχουν βασιστεί κατά ένα μεγάλο ποσοστό σε δεδομένα mtDNA, ενώ σχετικά πρόσφατα έχει ξεκινήσει η ενσωμάτωση nDNA γενετικών τόπων σε αυτές. Οι παραπάνω μελέτες αφορούν πληθώρα ειδών οργανισμών που εξαπλώνονται στα Βαλκάνια, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται: *αμφίβια* (Beerli et al., 1996; Lymberakis et al., 2007; Sotiropoulos et al., 2007; Akin et al., 2010; Wielstra et al., 2013; Vences et al., 2014; Hofman et al., 2015), *αράχνες* (Kornilios et al., 2016), *θηλαστικά* (Barome et al., 2001; Michaux et al., 2004; Kasapidis et al., 2005b; Thanou et al., 2005; Tryfonopoulos et al., 2008; 2010; Thanou et al., 2012; Karaïskou et al., 2014), *έντομα* (Papadopoulou et al., 2008; Allegrucci et al., 2009; Papadopoulou et al., 2009; Papadopoulou et al., 2010; Gkontas et al., 2016), *δεκάποδα* (Jesse et al., 2010), *ισόποδα* (Klossa-Kilia et al., 2006; Parmakelis et al., 2008; Poulakakis and Sfenthourakis, 2008; Kamilari et al., 2014), *πλατυέλμινθες* (Sluys et al., 2013; Solà et al., 2013), *σαύρες* (Poulakakis et al., 2003; Harris et al., 2004; Podnar et al., 2004; Kasapidis et al., 2005a; Poulakakis et al., 2005a; Poulakakis et al., 2005b; Poulakakis et al., 2005c; Poulakakis et al., 2005d; Carranza and Arnold, 2006; Valakos et al., 2007; Poulakakis et al., 2008; Gvoždík et al., 2010; Thanou et al., 2012; Gassert et al., 2013; Salvi et al., 2013; Mačát et al., 2014; Podnar et al., 2014; Sagonas et al., 2014; Jablonski et al., 2016; Marzahn et al., 2016; Skourtanioti et al., 2016), *σκορπιούς* (Parmakelis et al., 2006a; Parmakelis et al., 2006b; Parmakelis et al., 2013), *υδρόβια σαλιγκάρια* (Falniowski and Szarowska, 2011; Calvo et al., 2015), *φίδια* (Carranza et al., 2006a; Guicking et al., 2008; Kyriazi et al., 2008; Ursenbacher et al., 2008; Guicking et al., 2009; Musilová et al., 2010; Ferchaud et al., 2012), *φυτά* (Bittkau and Comes, 2005; Edh et al., 2007; Comes et al., 2008; Bittkau and Comes, 2009; Cellinese et al., 2009), *χελώνες* (Mantziou et al., 2004), *χερσαία σαλιγκάρια* (Ayoutanti et al., 1993a;

Ayoutanti et al., 1993b; Schilthuizen et al., 1995; van Moorsel et al., 2000; Uit de Weerd et al., 2004; Uit de Weerd et al., 2005; Douris et al., 2007; Kornilios et al., 2009; Kotsakiozi et al., 2012; Fehér et al., 2014; Korábek et al., 2014; Psonis et al., 2015a, 2015b) και *χηλόποδα* (Simaiakis et al., 2012). Η επίδραση των παραπάνω μελετών είναι πολύ σημαντική διότι οι μεν φυλογενετικές εργασίες βοήθησαν στη βελτίωση της Ταξινόμιας και στην εύρεση κατάλληλων μορφολογικών ταξινομικών χαρακτήρων, οι δε φυλογεωγραφικές επισήμαναν τη βιογεωγραφική σημαντικότητα των Βαλκανίων ως περιοχή εκδήλωσης υψηλών επιπέδων ενδημισμού και βιοποικιλότητας.

## 2.2. Μοριακή Φυλογένεση και Lacertidae

Η οικογένεια των Lacertidae αποτελεί μια από τις πιο καλά μελετημένες ομάδες σπονδυλωτών, ιδιαίτερα στον ευρωπαϊκό χώρο (Harris, 1999). Η μονοφυλετικότητα της παραπάνω ομάδας έχει τεκμηριωθεί και δεν αμφισβητείται (Estes et al., 1988), ωστόσο η επίλυση των φυλογενετικών σχέσεων εντός της οικογένειας αποτέλεσε δύσκολο έργο για την επιστημονική κοινότητα. Οι πρώτες μελέτες (Arnold, 1989 και αναφορές εκεί) βασίστηκαν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ομάδων ειδών και μια πρώτη φυλογενετική τοπολογία, η οποία ωστόσο ήταν στατιστικά αδύναμη σε κάποιες από τις σχέσεις της. Την προσπάθεια μορφολογικής φυλογένεσης ακολούθησε η προσπάθεια βιοχημικής φυλογένεσης με χρήση πρωτεϊνών (ηλεκτροφόρηση ενζύμων και ανοσολογικές αντιδράσεις) από μια σειρά μελετών (Mayer and Benyr, 1995 και αναφορές εκεί), η οποία παρήγαγε αποτελέσματα που δε βοήθησαν ουσιαστικά στην επίλυση των προβληματικών σχέσεων. Ταυτόχρονα, υπήρξαν μελέτες που έκαναν χρήση του καρυότυπου των ειδών (Odierna et al., 1992 και αναφορές εκεί), οι οποίες είχαν μόνο υποστηρικτικό χαρακτήρα σε ήδη λυμένες σχέσεις της τοπολογίας.

Η ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αποτέλεσε ερευνητικό σταυροδρόμι στη μελέτη της φυλογένεσης των Lacertidae. Η πραγματοποίηση πληθώρας μελετών Μοριακής Φυλογένεσης στο διάστημα 1994-2007 (π.χ. Harris, 1999; Arnold, 2004; Arnold et al., 2007 και αναφορές σε αυτές τις εργασίες) βασισμένων κυρίως σε δεδομένα mtDNA, είχε ως αποτελέσματα, μεταξύ των άλλων, την επιβεβαίωση της μονοφυλετικότητας

πολλών γενών και σε ορισμένες περιπτώσεις την αποσαφήνιση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ ορισμένων ομάδων ειδών, την περιγραφή πολλών νέων γενών και την επανεξέταση της ταξινομικής κατάστασης πολλών ειδών. Το κυριότερο αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία ενός γενικευμένου, ωστόσο μη πλήρως επιλυμένου φυλογενετικού δέντρου, όπως αυτό παρουσιάζεται στην εργασία των Arnold et al. (2007), η οποία συνδυάζει μορφολογικούς και γενετικούς χαρακτήρες, λαμβάνοντας υπόψιν τις προηγούμενες μελέτες και επαναλαμβάνοντας αναλύσεις με επιπρόσθετη πληροφορία. Σύμφωνα με την εργασία αυτή, η οικογένεια Lacertidae αποτελείται από τρεις κύριους φυλογενετικούς κλάδους: την υποοικογένεια Gallotiinae που εμφανίζεται κοντά στη ρίζα του δέντρου και τις υποοικογένειες Lacertinae και Eremiadiinae που εμφανίζονται ως αδελφά taxa. Η εξάπλωση αυτών των τριών κλάδων είναι διακριτή, δίχως ιδιαίτερη αλληλοεπικάλυψη: τα Gallotiinae εξαπλώνονται στις Κανάριες Νήσους και τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές της Ευρώπης και της Αφρικής, τα Lacertinae έχουν την Ευρώπη ως κύρια περιοχή εξάπλωσης με κάποια είδη του taxon αυτού να εισχωρούν και στην Ασία, και τα Eremiadiinae να κατανέμονται στην Αφρική και τη Μέση Ανατολή. Η πλήρης επίλυση του δέντρου μεταξύ όλων των γενών θεωρήθηκε εφικτή με την προσθήκη πολλαπλών πυρηνικών γενετικών τόπων, ωστόσο οι αρχικές προσπάθειες (Mayer and Pavlicev, 2007; Karli et al., 2011; Engleder et al., 2013) δε στέφθηκαν με επιτυχία, παρά μόνο σε μικρό βαθμό. Η εξήγηση που δόθηκε για το παραπάνω φαινόμενο ήταν ότι είτε η οικογένεια υπέστη πολλαπλή ακτινωτή διάσπαση κατά το Μέσο Μειόκαινο ως αποτέλεσμα πολλαπλών τεκτονικών και κλιματικών αλλαγών της εποχής (Pavlicev and Mayer, 2009) είτε οι γενετικοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα ενδεχομένως να μην είναι κατάλληλοι και επαρκείς (Karli et al., 2011). Σε μια πρόσφατη μελέτη (Pyron et al., 2013) που περιλάμβανε 4.161 είδη Λεπιδωτών (από τα >9400) και περίπου 13.000 ζ.β. από 12 γενετικούς τόπους φάνηκε ότι η αύξηση της κατάλληλης πληροφορίας έκανε εφικτή την ανασύσταση μεγάλου μέρους των φυλογενετικών σχέσεων εντός των Lacertidae. Σε αντίστοιχο συμπέρασμα περί σωστής επιλογής μοριακών δεικτών κατέληξε και η πιο πρόσφατη μελέτη στα Lacertini (Mendes et al., 2016). Αναμένεται η χρήση της τεχνολογίας Νέας Γενιάς Αλληλούχισης και η συμπερίληψη γενωμικού DNA σε

μελλοντικές φυλογενωμικές αναλύσεις να βοηθήσουν σημαντικά, δίνοντας λύσεις σε περιπτώσεις άλυτης φυλογένεσης.

### 2.3. Φυλογενετικές σχέσεις του γένους *Podarcis*

Το γένος *Podarcis* εμφανίζεται ως μονοφυλετική ταξινομική μονάδα τόσο βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών όσο και γενετικών (Arnold, 1973, 1989; Harris et al., 1998; Fu, 2000; Oliverio et al., 2000). Ωστόσο, η ταξινομική κατάσταση εντός του γένους είναι περίπλοκη και αναθεωρείται συνεχώς εξαιτίας της ύπαρξης παρόμοιας διαειδικής μορφολογίας και ταυτόχρονα μεγάλης ενδοειδικής ποικιλομορφίας (Arnold et al., 1978). Οι πρώτες μελέτες μοριακής φυλογένεσης που αφορούσαν το γένος *Podarcis* (Harris and Arnold, 1999; Oliverio et al., 2000) το διαχώρισαν σε αρκετές ομάδες ειδών (species groups) με άλυτες, ως επί το πλείστον, φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τους. Η πρώτη μελέτη υποστήριξε την ύπαρξη τεσσάρων ομάδων ειδών (Νοτιοδυτική Μεσογειακή, Ιταλική, Βαλκανική και ομάδα Δυτικών Νησιών της Μεσογείου), ενώ η δεύτερη ανέφερε επτά ομάδες ειδών (Balearic Tyrrhenian και Siculo-Maltese ζεύγη, σύμπλεγμα *P. siculus*, *P. muralis*, Βαλκανική ομάδα και Ibero-Maghrebian ομάδα). Από το 2000, έχει διεξαχθεί πληθώρα μοριακών μελετών (Vasconcelos et al., 2006; Arntzen and Sá-Sousa, 2007; Fulgione et al., 2008; Pinho et al., 2009; Terrasa et al., 2009; Lymberakis and Poulakakis, 2010; Bellati et al., 2011; Kaliontzopoulou et al., 2011; Buades et al., 2013; Michaelides et al., 2015 και αναφορές σε όλες τις παραπάνω εργασίες), εστιάζοντας σε συγκεκριμένα είδη ή ομάδες ειδών με στόχο την επίλυση της φυλογένεσης των *Podarcis*. Μία σύνοψη όλων των παραπάνω μελετών και η τρέχουσα ταξινομική κατάσταση του γένους *Podarcis* φαίνεται στον Πίνακα 2.1. Οι περισσότερες από αυτές εστίαζαν στα *Podarcis* της Ιβηρικής Χερσονήσου στα οποία είχε εντοπιστεί κρυμμένη ενδοειδική ποικιλότητα με διακριτές φυλογενετικές οντότητες με αποτέλεσμα κάποια είδη να χαρακτηριστούν συμπλέγματα ειδών. Πρόσφατα, κάποιες από τις παραπάνω φυλογενετικές οντότητες περιεγράφηκαν και μορφολογικά και αναγνωρίστηκαν επίσημα ως νέα, διακριτά είδη. Όπως προαναφέρθηκε στο Πρώτο Κεφάλαιο τα υπό μελέτη taxa της παρούσας διατριβής συμπεριλαμβάνονται στη Βαλκανική ομάδα ειδών και στην υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» που περιλαμβάνει τα είδη *P. gageae*, *P. melisellensis*, *P. milensis* και *P. tauricus* (Poulakakis et al., 2005c; Poulakakis et al., 2005d).

**Πίνακας 2.1.** Η τρέχουσα ταξινομική κατάσταση του γένους *Podarcis* σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (βλ. κείμενο, ενότητα 2.3).

Ομάδα Ειδών	Υποομάδα Ειδών	Taxon	Εξελικτική Γραμμή	Σχέση εντός Ομάδας/Υποομάδας
Ιταλική		<i>siculus</i>		
		<i>raffoneae</i>		
Σικελο-Αιολική		<i>waglerianus</i>		
Ευρωπαϊκή - Ευρείας κατανομής		<i>muralis</i>		
Βαλκανική	<i>erhardii</i>	<i>erhardii</i>	Κοκλάδες Ηπειρωτική Ελλάδα	στη βάση της υποομάδας
		<i>cretensis</i>		σογγενικά μεταξύ τους
		<i>levendis</i>		
		<i>peloponnesiacus</i>		
	<i>tauricus</i>	<i>melisellensis</i>	<i>P. m. melisellensis</i> <i>P. m. fiumana</i> Lastovo	
		<i>gaigeae</i>		αδελφά taxa
		<i>milensis</i>		
		<i>tauricus</i>		στη βάση της υποομάδας
		<i>bocagei</i>		αδελφά taxa
		<i>guadarramae</i>		
Νοτιοδυτική Μεσογειακή	<i>hispanicus</i>		Albacete/Murcia	αδελφά taxa
			sensu stricto	
			Batna	
			Τυνησία & ΒΑ Αλγερία	
			Jebel Sirwah	
	<i>liolepis</i>		Azazga	αδελφά taxa
			Galera	
			Μαρόκο-Αλγερία	
			Νότια Ισπανία Νότια και κεντρική Ισπανία	
<i>vaucheri</i>			αδελφό taxon με Βορειοαφρικάνικο <i>P. hispanicus</i> (Τυνησία & ΒΑ Αλγερία, Jebel Sirwah)	
<i>carbonelli</i>		<i>carbonelli</i>		αδελφά taxa
		<i>virescens</i>		
Δυτικών Νησιών Μεσογείου		<i>filfolensis</i>		στη βάση της ομάδας
		<i>lilfordi</i>		αδελφά taxa
		<i>pityusensis</i>		
		<i>tiliguerta</i>	Κορσική Σαρδηνία Marina di Gairo	



## 2.4. Φυλογενετικές σχέσεις της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*»

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ και εντός των ειδών της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» έχουν ήδη γίνει αντικείμενο έρευνας προηγούμενων μελετών που βασίζονταν στη χρήση μιτοχονδριακών γενετικών δεικτών (Podnar et al., 2004; Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d; Valakos et al., 2007; Podnar et al., 2014). Αναφορικά με το είδος *P. melisellensis*, τα δεδομένα του mtDNA ανέδειξαν την παρουσία τριών κύριων φυλογενετικών κλάδων (*melisellensis*, *fiumana* και *Lastovo*) που χαρακτηρίζονταν από διακριτή γεωγραφική κατανομή και εμφανή ασυμφωνία μεταξύ Ταξινόμιας σε επίπεδο υποείδους και φυλογενετικών σχέσεων (Podnar et al., 2004; Podnar et al., 2014). Μια πλουσιότερη σε αριθμό δειγμάτων μελέτη που περιλάμβανε όλα τα είδη της υποομάδας «*P. tauricus*» με περιορισμένο, ωστόσο, αριθμό δειγμάτων από την Ελλάδα (Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d), υποστήριξε τη μονοφυλετικότητα της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» και την υποδιαίρεσή της σε δύο κύριους φυλογενετικούς κλάδους. Ο πρώτος αντιστοιχούσε στο taxon *P. tauricus sensu stricto*, ενώ ο δεύτερος αποτελούταν από τα είδη *P. gaiageae*, *P. milensis*, και *P. melisellensis*. Η μονοφυλετικότητα καθενός από τα παραπάνω taxa επίσης υποστηρίχθηκε στατιστικά. Επιπροσθέτως, εντοπίστηκε η ύπαρξη δύο κύριων εξελικτικών γραμμών εντός του taxon *P. tauricus sensu stricto* χαρακτηριζόμενων από υψηλή γενετική ποικιλότητα.

## 2.5. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου

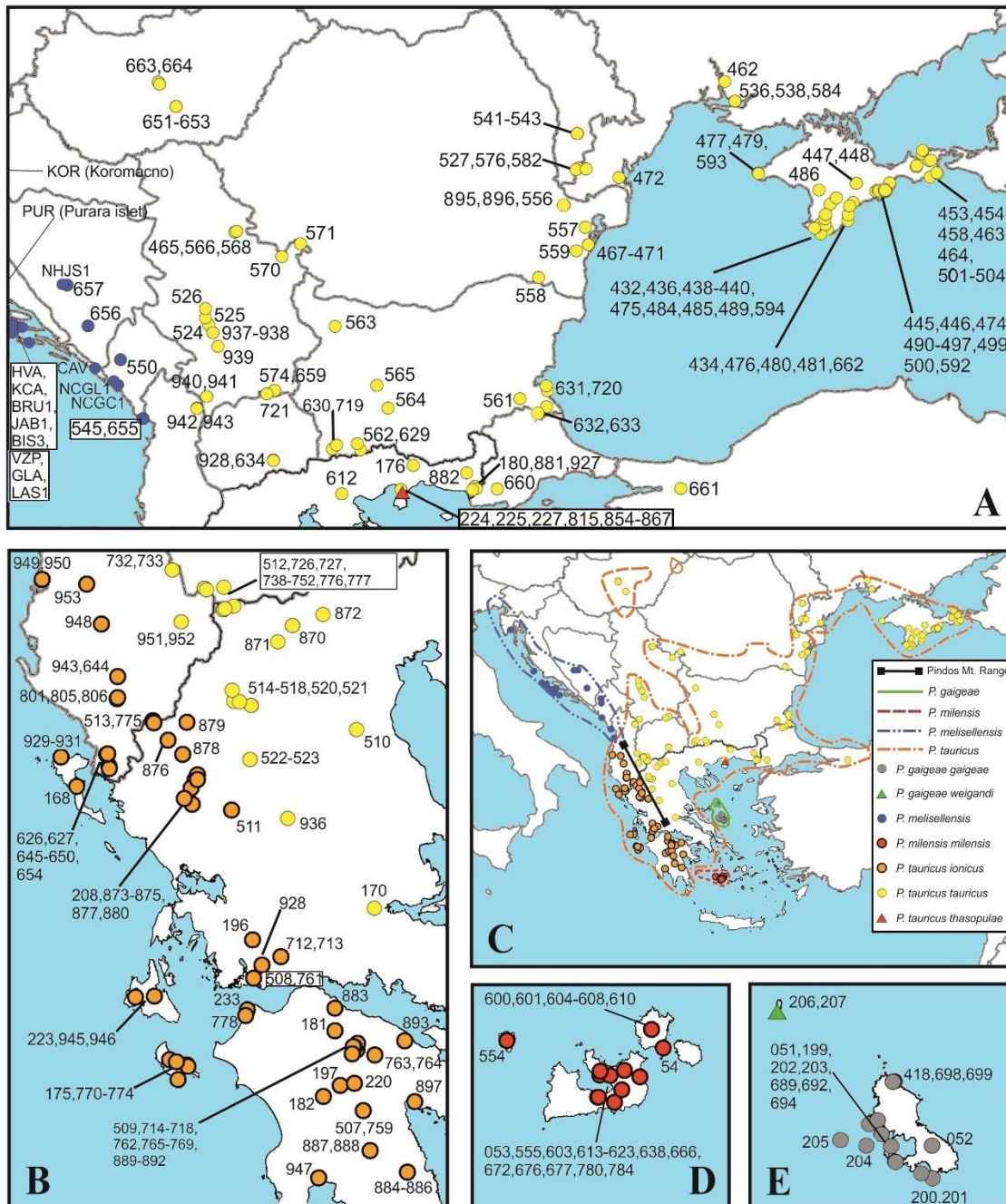
Οι στόχοι του παρόντος κεφαλαίου είναι: (α) η αξιολόγηση της φυλογενετικής θέσης της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» μέσα στο πλήρες φυλογενετικό δέντρο των *Podarcis*, χρησιμοποιώντας μοριακές φυλογενετικές μεθόδους που ενσωματώνουν πληροφορίες από πολλαπλούς γενετικούς τόπους (δύο mtDNA και τρεις nDNA δείκτες), (β) η επίλυση της φυλογένεσης της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» κάνοντας χρήση εκτεταμένου συνόλου δειγμάτων που περιλαμβάνει δείγματα από όλη τη γεωγραφική κατανομή των υπό εξέταση taxa, και (γ) ο σχολιασμός της τρέχουσας ταξινόμησης της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» υπό το «φως» της παραγόμενης μοριακής φυλογένεσης.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Δείγματα, εξαγωγή DNA, PCR και αλληλούχηση

Ολικό γενωμικό DNA απομονώθηκε από μυ, σκώτι ή αίμα δειγμάτων (365 δείγματα, Σύνολο Δειγμάτων I, Παράρτημα I), τα οποία διατηρούνταν σε αιθανόλη 96%, χρησιμοποιώντας τυπικό πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με βάση τη δραστική ουσία οξικού αμμωνίου (ammonium acetate). Οι σταθμοί δειγματοληψίας φαίνονται στην Εικόνα 2.1, ενώ πληροφορίες για τα δείγματα ιστών μπορούν να αναζητηθούν στο Παράρτημα I. Όλα τα δείγματα ιστών έχουν κατατεθεί στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ), εκτός λίγων εξαιρέσεων (βλ. Παράρτημα I). Η αναγνώριση σε επίπεδο είδους βασίστηκε σε εξωτερικούς μορφολογικούς χαρακτήρες όπως ορίζονται από τους Arnold and Ovenden (2002). Συνοπτικά, χρησιμοποιήθηκαν 317 άτομα προερχόμενα από περισσότερες από 200 τοποθεσίες, τα οποία αντιστοιχούν σε 13 είδη κι αποτελούν την ενδο-ομάδα στις φυλογενετικές αναλύσεις (298 από αυτά ανήκουν στην υπό εξέταση υποομάδα ειδών «*P. tauricus*»).

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) εφαρμόστηκε για τον στοχευμένο πολλαπλασιασμό μέρους της αλληλουχίας δύο μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα του RNA (16S rRNA) και το κυτόχρωμα β (*cyt b*), αντίστοιχα, καθώς επίσης ενός πυρηνικού γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 της μελανοκορτίνης (*MC1R*) και δύο ανώνυμων πυρηνικών γενετικών δεικτών (*Pod15b* και *Pod55*). Οι δύο τελευταίοι προστέθηκαν πρόσφατα στους διαθέσιμους δείκτες γενετικής διαφοροποίησης, με σκοπό την εξειδικευμένη μελέτη της μοριακής φυλογένεσης, οριοθέτησης ειδών, πληθυσμιακής γενετικής και φυλογεωγραφίας του γένους *Podarcis* (Pereira et al., 2013). Οι εκκινητές και οι συνθήκες πολλαπλασιασμού της μεθόδου PCR, όπως επίσης και των αντιδράσεων της νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (cycle sequencing) δίνονται στον Πίνακα 2.2. Η αλληλούχηση του προϊόντος της τεχνικής PCR έγινε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές της PCR (Πίνακας 2.2), το πακέτο αντιδραστηρίων Big-Dye Terminator (v3.1) Cycle Sequencing kit® και το μοντέλο αυτοματοποιημένου αλληλουχιτή ABI3730 ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου του κατασκευαστή.



Εικόνα 2.1 Χάρτες με τις τοποθεσίες συλλογής των δειγμάτων και τις γεωγραφικές κατανομές των ταξα της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*»: (A) τα βόρεια τμήματα της συνολικής κατανομής της υποομάδας «*P. tauricus*», (B) συνολικό γεωγραφικό πρότυπο κατανομής του ταχον *P. tauricus ionicus* και νοτιοδυτικό τμήμα κατανομής του ταχον *P. t. tauricus*, (C) οι σταθμοί δειγματοληψίας σε όλη την κατανομή της υποομάδας, (D) το νησιωτικό συγκρότημα της Μήλου και οι τοποθεσίες συλλογής του ταχον *P. m. milensis* και (E) το νησιωτικό συγκρότημα της Σκύρου και η νησίδα Πιπέρι και οι τοποθεσίες συλλογής του ταχον *P. gaigeae*. Οι αριθμοί/κωδικοί στους χάρτες αντιστοιχούν στους κωδικούς δειγμάτων του Παραρτήματος I.

Πίνακας 2.2 Εκκινητές και συνθήκες πολλαπλασιασμού της τεχνικής PCR<sup>a</sup> και της νουκλεοτιδικής αλληλούχισης.

Γενετικός Τύπος	Ζευγάρι Εκκινητών	Αλληλουχία (5' - 3')	Μέγεθος (ζ. β.)	Συνθήκες	Βιβλιογραφική Αναφορά
16S rRNA	16SAr-l	CGGCCGCCTGTTTATCAAAAACAT	~ 530	3mM MgCl, 94°C/1min, 42·	(Palumbi, 1996)
	16SBr-h	GGAGCTCCGGTTTGAAGTCAGATC		52,9°C/1min, 72°C/1min x35 cycles	
Cyt b	GLUDG	TGACTTGAARAACCAAYCGTTG	~510	3mM MgCl, 94°C/1min	(Palumbi, 1996)
	CB2	CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	~350	42 - 48,6°C/1min	(Kocher et al., 1989)
	L14841	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA		72°C/1min x35 cycles	(Palumbi, 1996)
	CB2	CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA			
MC1R	MC1RF	GGCNGCCATYGTCAAGAACCGGAACC	~700	1,4mM MgCl, 94°C/1min,	(Pinho et al., 2010)
	MC1RR	CTCCGRAAGGCRTAAATGATGGGGTCCAC			
Pod55	pod55f	GGATCTTTATAGGAGAGTGCAGGCC	~500	59°C/1min,	(Pereira et al., 2013)
	pod55r	TTCCAGATTGTGTTTATCCTGGTGG		72°C/1min x 35	
Pod15b	pod15bf	AATCCTGGCTAAATGCAAGCCTTGG	~550	cycles	(Pereira et al., 2013)
	pod15br	GCCAGGAGAATAAGCTACTCCATCC			

<sup>a</sup> κάνοντας χρήση του ενζύμου DNA Πολυμεράσης τύπου *Taq* (KAPA BIOSYSTEMS®)

Η προβολή και στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με τη χρήση του προγράμματος CodonCode Aligner v. 3.7.1 (CodonCode Corporation ®). Η αυθεντικότητα των αλληλουχιών και η ομολογία με τα γονίδια-στόχους αξιολογήθηκε μέσω του ευρετικού αλγορίθμου BLAST εντός της βάσης γενετικών δεδομένων NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Όλες οι αλληλουχίες που παρήχθησαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής κατετέθηκαν στη βάση GenBank (οι αριθμοί πρόσβασης φαίνονται στο Παράρτημα I). Ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση Genbank που ανήκαν στο γένος *Podarcis* (131 συνολικά) χρησιμοποιήθηκαν επίσης στις φυλογενετικές αναλύσεις. Επιπλέον, ανακτήθηκαν αλληλουχίες των ειδών *Atlantolacerta andreanskyi* (Werner, 1929), *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758 και *Teira dugesii* (Milne-Edwards, 1829) με σκοπό τη χρήση τους ως εξωομάδες. Πληροφορίες για τις αλληλουχίες που ελήφθησαν από το διαδίκτυο (γενετικοί τόποι, αριθμοί πρόσβασης και μελέτες που τις παρήγαγαν) μπορούν να αναζητηθούν στο Παράρτημα I.

### 3.2. Στοίχιση αλληλουχιών

Η στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών εφαρμόστηκε ξεχωριστά για κάθε γενετικό τόπο με χρήση του λογισμικού MAFFT (v.7, Katoh and Standley, 2013) επιλέγοντας τις, εκ του κατασκευαστή, ρυθμίσεις και τις ακόλουθες στρατηγικές στοίχισης της μεθόδου iterative refinement: L-INS-i για τους γενετικούς τόπους *cyt b*, *MC1R* και *Pod55*, Q-INS-i για τον *16S rRNA* και E-INS-i για τον *Pod15b*. Προστέθηκαν κενά στις αλληλουχίες για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της διαφοράς μήκους μεταξύ αλληλουχιών. Οι αλληλουχίες των κωδικών γονιδίων *cyt b* και *MC1R* μεταφράστηκαν σε αμινοξέα πριν από τη φυλογενετική ανάλυση, ωστόσο δεν έγινε εντοπισμός κωδικονίου λήξης. Η απόκλιση μεταξύ των αλληλουχιών εκτιμήθηκε με βάση το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης Tamura & Nei's (1993, TrN) με τη βοήθεια του λογισμικού MEGA (v.6.06, Tamura et al., 2013).

### 3.3. Εκτίμηση του γονιδιακού δέντρου των δύο mtDNA γενετικών τύπων

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων\* χρησιμοποιώντας το Σύνολο Δειγμάτων I (Παράρτημα II) έγινε με βάση τις φυλογενετικές μεθόδους Neighbor Joining (NJ, Saitou and Nei, 1987), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) και Bayesian Inference (BI). Η ανάλυση Neighbor Joining εφαρμόστηκε στο λογισμικό MEGA βάσει του μοντέλου εξέλιξης TrN. Η στατιστική ανάλυση Bootstrapping με 1.000 ψευδο-επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η τοπολογική στατιστική σημαντικότητα των φυλογενετικών κλάδων του παραγόμενου δέντρου (Felsenstein, 1985). Η ανάλυση Maximum Parsimony εφαρμόστηκε στο λογισμικό PAUP\* (v.4.0b10, Swofford, 2002) με χρήση ευρετικού αλγορίθμου (heuristic search), με βαθμιαία προσθήκη αλληλουχιών και μέσω της μεθόδου αναδιευθέτησης κλάδων Tree-Bisection-Reconnection (TBR) (Swofford et al., 1996). Η στατιστική υποστήριξη των κόμβων του φυλογενετικού δέντρου ελέγχθηκε με 100 ψευδο-επαναλήψεις bootstrap, με τυχαία προσθήκη taxa. Η ανάλυση Maximum Likelihood εφαρμόστηκε με χρήση του λογισμικού RAxML (v.8.1.21, Stamatakis, 2014) υπό το μοντέλο εξέλιξης Generalized time-reversible + gamma (+G). Για να διασφαλιστεί ότι το παραγόμενο ML δέντρο δεν αποτελεί τοπικό μέγιστο, δηλαδή μια από τις καλές λύσεις της φυλογένεσης αλλά όχι η καλύτερη, η ανάλυση εύρεσης του καλύτερου δέντρου πραγματοποιήθηκε 200 φορές. Η στατιστική υποστήριξη των τοπολογίας του καλύτερου φυλογενετικού δέντρου ML εξετάστηκε περαιτέρω με 1.000 ταχείες ψευδο-επαναλήψεις bootstrap (rapid bootstrap) υπό το εξελικτικό μοντέλο GTRCAT. Τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση Bayesian Inference (GTR + G και για τα δύο γονίδια στόχους *16S rRNA* και *cyt b*) επιλέχθηκαν μέσω του λογισμικού jModelTest (v.2.1.3, Darriba et al., 2012) βάσει του κριτηρίου Bayesian Information Criterion (BIC, Schwarz,

---

\* Οι αναλύσεις ML και BI πραγματοποιήθηκαν στη συστοιχία υπολογιστών (160 cores) που διαθέτει το εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης.

1978) αγνοώντας τα μοντέλα που λάμβαναν ταυτόχρονα υπόψη τη Γάμμα κατανομή των πολυμορφικών θέσεων και τις νουκλεοτιδικές θέσεις μηδενικής ποικιλομορφίας (Yang, 2006). Η ανάλυση Bayesian Inference εφαρμόστηκε στο λογισμικό MrBayes (v.3.2.1, Ronquist et al., 2012), κάνοντας τέσσερα «τρέξιματα» (runs), στο κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν οκτώ ανεξάρτητες «αλυσίδες αναζήτησης» (chains) και  $10^7$  «βήματα αναζήτησης/ γενιές» (generations), ενώ αποθήκευση δέντρου γινόταν ανά 1.000 «γενιές». Η πλήρης εκτίμηση των παραμέτρων έγινε κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Για να επιβεβαιωθεί ότι οι «αλυσίδες» έχουν φτάσει σε κατάσταση σταθερότητας γύρω από μια τιμή πιθανοφάνειας για κάθε μια από τις εκτιμώμενες παραμέτρους έγινε αξιολόγηση του κάθε «τρέξιματος» στο λογισμικό Tracer (v.1.6, Rambaut et al., 2014), το οποίο παράγει διαγράμματα τιμών λογαριθμικής πιθανοφάνειας (-lnL) και μήκους δέντρου έναντι του αριθμού «γενεών». Η τιμή -lnL σταθεροποιήθηκε ύστερα από περίπου  $10^6$  «γενεές» και λόγω αυτού το 25% των αρχικών εκτιμώμενων δέντρων απορρίφθηκε (burn-in) ώστε να αποφευχθεί η συμπερίληψη τυχαίων, μη βέλτιστων δέντρων στα υπόλοιπα βέλτιστα. Το τελικό BI δέντρο (majority rule consensus tree) προέκυψε από την εκ των υστέρων κατανομή των παραγόμενων βέλτιστων δέντρων, ενώ για τη στατιστική υποστήριξη της τοπολογίας χρησιμοποιήθηκαν οι εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities), οι οποίες υπολογίστηκαν ως το ποσοστό δειγμάτων (δέντρων) που έφερε μια συγκεκριμένη τοπολογία. Τιμές άνω του 95% υποδεικνύουν στατιστική σημαντικότητα.

### 3.4. Εκτίμηση γονιδιακών δέντρων

Ακολουθώντας τη μέθοδο των Zhang et al. (2013) που βασίζεται στη χρήση του μοντέλου Poisson Tree Processes (PTP) για την ανίχνευση γενετικών συναθροίσεων, επιλέχθηκαν μιτοχονδριακές γενετικές συναθροίσεις, οι οποίες αντιπροσωπεύουν «ανεξάρτητες εξελισσόμενες οντότητες» όπως χαρακτηριστικά αναφέρονται στη μέθοδο. Ουσιαστικά γίνεται εκτίμηση των πλέον διαφοροποιημένων εξελικτικών γραμμών και επιλογή αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από κάθε μια από αυτές τις γραμμές. Η επιλογή έγινε μέσα από τις αλληλουχίες της ενδο-ομάδας του Συνόλου Δειγμάτων I, ενώ όσες αλληλουχίες ήταν πανομοιότυπες αφαιρέθηκαν από την ανάλυση. Για τις φυλογενετικές αναλύσεις επιλέχθηκε τουλάχιστον ένα δείγμα-αντιπρόσωπος από κάθε μια PTP συνάθροιση με σκοπό την αλληλούχιση των τριών πυρηνικών γενετικών τόπων. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν ουσιαστικά απαρτίζουν τον κορμό του Συνόλου Δειγμάτων II, απαριθμώντας 52 οντότητες που αντιπροσωπεύουν 13 είδη του γένους *Podarcis*, για τα οποία αλληλουχήθηκαν και οι πέντε μοριακοί γενετικοί δείκτες. Η ολοκλήρωση του Συνόλου Δειγμάτων II (Παράρτημα II) έγινε με την προσθήκη αλληλουχιών που ανακτήθηκαν από την NCBI, οι οποίες ανήκουν στα είδη *L. agilis* (χρήση ως εξω-ομάδα), *P. bocagei* (Seoane, 1884), *P. filfolensis* (Bedriaga, 1876), *P. muralis* και *P. tiliguerta* (Gmelin, 1789). Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε για το γονιδιακό δέντρο mtDNA και κάνοντας χρήση του παραπάνω συνόλου δειγμάτων, εφαρμόστηκαν όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις (NJ, MP, ML and BI) για την εκτίμηση του γονιδιακού δέντρου βάσει των τριών nDNA γενετικών τόπων (*MC1R*, *Pod55*, and *Pod15b*), αλλά και για την εκτίμηση του γονιδιακού δέντρου βάσει των πέντε γενετικών τόπων (mtDNA και nDNA). Τα μοντέλα που εφαρμόστηκαν στην ανάλυση BI είναι τα ακόλουθα: *16S rRNA*- GTR+G; *cyt b* - HKY+G; *MC1R* - HKY+I; *Pod55* - HKY+I; και *Pod15b* - K80+G.



### 3.5. Εκτίμηση του δέντρου των ειδών

Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύνολο δειγμάτων με την προηγούμενη ενότητα (52 δείγματα, Σύνολο Δειγμάτων II, Παράρτημα II). Η ανάλυση της εκτίμησης του δέντρου των ειδών, η οποία αποτελεί ανάλυση coalescent, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο BEAST 2 (v.2.4.0; Bouckaert et al., 2014). Τα αρχεία εισαγωγής (xml) δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα BEAUti v. 2.4.0, το οποίο αποτελεί μέρος του παραπάνω πακέτου. Τα μοντέλα νουκλεοτιδικής ποικιλότητας δεν δόθηκαν *a priori*, αλλά χρησιμοποιήθηκε η επιλογή «BEAST Model Test». Άλλες εκ των προτέρων επιλογές αποτελούν το μοντέλο ειδογένεσης «Yule Model» και το μοντέλο περιγραφής μοριακού ρολογιού «Uncorrelated Lognormal Model». Η ανάλυση MCMC «έτρεξε» για  $4 \times 10^8$  «γενιές», με αποθήκευση του αποτελέσματος ανά 5.000 γενιές. Τα ανακτηθέντα αρχεία «log» αναλύθηκαν στο λογισμικό Tracer v.1.6. (Rambaut et al., 2014) για την επιβεβαίωση της σύγκλισης της ανάλυσης και της ανάκτησης του κατάλληλου αριθμού τιμών «αποτελεσματικών μεγεθών δείγματος» (effective sample sizes, ESSs values >200). Η τιμή της πιθανοφάνειας (-lnL) σταθεροποιήθηκε πριν από τις  $4 \times 10^7$  «γενιές» και οι πρώτες 10% από τις 20.000 αποθηκευμένες απορρίφθηκαν. Η προβολή του δέντρου των ειδών έγινε δυνατή με τη βοήθεια των προγραμμάτων FigTree (v. 1.4.2; μέρος του πακέτου BEAST 2) και DensiTree (v.2.2.4; Bouckaert, 2010).

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Το γονιδιακό δέντρο των δύο mtDNA γενετικών τύπων

Συνοπτικά, για τις φυλογενετικές αναλύσεις σε μιτοχονδριακό επίπεδο (*cyt b* και *16S rRNA*) το Σύνολο Δειγμάτων I των 365 ατόμων αντιστοιχήθηκε σε 86 μοναδικούς απλότυπους. Στο σύνολο, στοιχήθηκαν 1.004 ζεύγη βάσεων (*cyt b* 465 ζ.β. και *16S rRNA* 539 ζ.β.) με 294 (29,3%) νουκλεοτιδικές θέσεις να εμφανίζουν ποικιλομορφία και 266 (26,4%) να είναι πληροφοριακές υπό το κριτήριο της φειδωλότητας (349 και 279, αντίστοιχα, όταν οι εξω-ομάδες λαμβάνονται υπόψιν στις μετρήσεις).

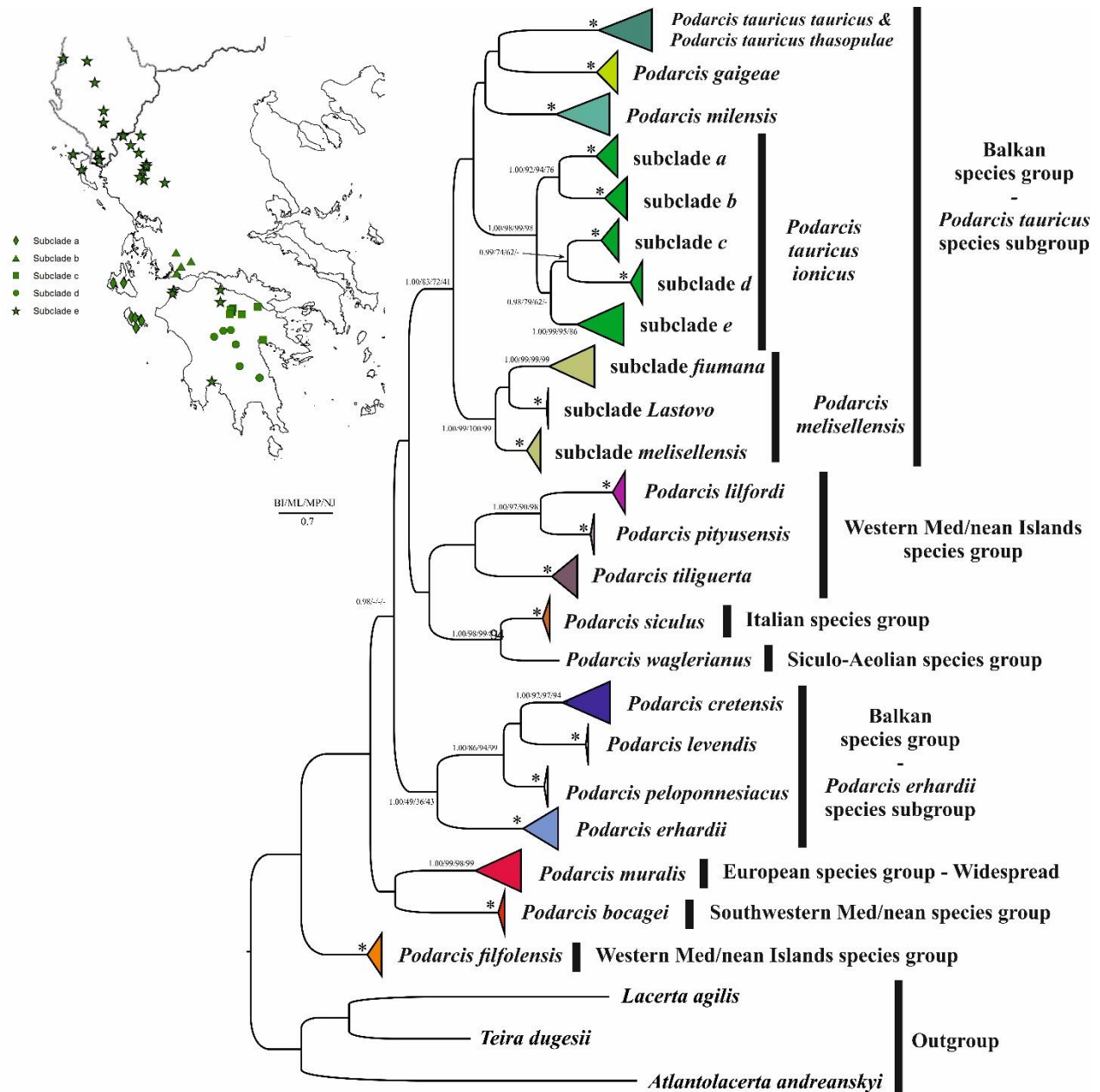
Η απόκλιση των αλληλουχιών ανά ζεύγος είχε εύρος 0-25,8% για το γονίδιο *cyt b* και 0-18,8% για το γονίδιο *16S rRNA*. Οι mtDNA γενετικές αποστάσεις μεταξύ και εντός των κύριων φυλογενετικών κλάδων, όπως αποκαλύφθηκαν από τις φυλογενετικές αναλύσεις, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3., ενώ οι ανά ζεύγος mtDNA γενετικές αποστάσεις φαίνονται στον Συμπληρωματικό Πίνακα Σ1 (Παράρτημα III).

Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις (NJ, MP, ML και BI) παρήγαγαν δέντρα παρόμοιας τοπολογίας. Η ανάλυση MP παρήγαγε πάνω από 10.000 εξίσου φειδωλά δέντρα με μήκος 1.370 βημάτων (consistency index CI=0,366, retention index RI=0,934). Ο μεγάλος αριθμός των εξίσου φειδωλών λύσεων οφείλεται κυρίως στην αναδιευθέτηση των εξωτερικών τοπολογιών. Η ανάλυση ML είχε ως τελικό αποτέλεσμα μια τοπολογία με τιμή  $lnL=-7.595,57$  (τελικές εκτιμήσεις παραμέτρων για το γονίδιο *cyt b*: συχνότητα βάσεων A=0,26, C=0,26, G=0,14, T=0,34, shape value (a)=0,25, A/C=1,35, A/G=6,03, A/T=0,94, C/G=0,25, C/T=11,08 και G/T=1 ενώ για το γονίδιο *16S rRNA*: A=0,33, C=0,23, G=0,19, T=0,25, shape value (a)=0,19, A/C=0,67, A/G=3,56, A/T=1,59, C/G=0,12, C/T=7,05 και G/T=1). Η ανάλυση BI κατέληξε στην τοπολογία με μέση τιμή  $lnL=-8.502,80$ . Πανομοιότητες τοπολογίες ανακτήθηκαν από κάθε ένα από τα τέσσερα «τρεξίματα» και το τελικό BI δέντρο (50% majority-rule consensus tree) από τα  $75 \times 10^3$  δέντρα τα οποία παρέμειναν μετά την περίοδο burn-in παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2 (τοπολογία κύριων φυλογενετικών κλάδων) και στις Συμπληρωματικές Εικόνες Σ1-Σ4 (πλήρης τοπολογία -Παράρτημα III).

**Πίνακας 2.3.** Γενετικές αποστάσεις (βάσει του μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης των Tamura & Nei) των γενετικών τόπων *cyt b* (κάτω από τη διαγώνιο - αριστερά) και *16S rRNA* (πάνω από τη διαγώνιο - δεξιά) μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων.

Φυλογενετικός Κλάδος	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. <i>P. t. tauricus</i> & <i>P. t. thasopuluae</i>	0,4/0,1	5,6	5,9	5,4	6,3	7,1	7,8	5,9	6,2	5,0	6,0	---	6,4	7,8	7,2	7,8	---	12,1	17,7	15,1
2. <i>P. t. ionicus</i>	12,1	5,4/1,4	5,3	4,6	5,0	7,1	6,9	5,4	5,9	5,2	6,1	---	6,6	7,2	5,7	6,7	---	10,8	17,0	13,6
3. <i>P. gaigeae</i>	13,9	13,0	0,3/0,2	4,8	5,8	6,4	6,8	6,2	6,4	5,3	5,7	---	5,8	6,1	6,3	7,0	---	12,3	17,8	12,4
4. <i>P. milensis</i>	12,4	11,9	10,4	1,0/0,4	4,4	7,3	6,4	5,7	5,8	5,2	6,6	---	5,8	6,3	6,7	7,3	---	10,4	16,6	13,7
5. <i>P. melisellensis</i>	14,2	14,2	12,1	11,4	3,9/1,3	6,4	6,4	5,4	6,3	4,8	5,9	---	5,4	5,4	5,3	5,3	---	8,9	14,3	13,0
6. <i>P. cretensis</i>	15,4	15,4	16,9	15,3	17,8	4,8/2,3	3,9	3,4	6,0	5,3	6,8	---	7,3	7,8	6,7	5,9	---	9,4	16,1	14,4
7. <i>P. lewendis</i>	14,4	16,8	18,0	15,4	16,8	8,9	0,2/0,0	3,0	5,3	5,6	6,9	---	7,3	7,7	6,3	6,1	---	10,4	17,8	14,3
8. <i>P. peloponnesiacus</i>	16,7	17,6	18,8	16,4	19,4	8,0	8,2	0,3/0,0	4,2	3,9	5,3	---	5,7	6,9	6,3	5,8	---	10,1	16,7	13,8
9. <i>P. erhardii</i>	16,3	16,0	17,7	14,8	15,4	15,8	14,4	15,4	2,9/1,4	5,2	5,8	---	5,8	6,9	6,8	6,4	---	10,8	17,4	14,1
10. <i>P. pityusensis</i>	23,7	20,2	22,0	18,7	18,4	19,4	24,4	22,1	20,7	0,3/0,0	1,4	---	5,1	5,6	5,3	6,1	---	8,9	15,6	12,4
11. <i>P. lilfordi</i>	20,7	17,4	18,1	18,0	16,1	16,1	14,4	16,3	19,4	11,6	1,1/0,2	---	5,0	5,7	6,3	6,9	---	10,9	16,4	12,6
12. <i>P. tiliguerta</i>	16,4	21,3	21,7	19,3	18,4	16,6	18,8	16,7	19,2	17,2	19,0	3,4/---	---	---	---	---	---	---	---	---
13. <i>P. siculus</i>	14,1	15,6	17,0	16,4	13,9	17,4	19,1	20,4	13,9	16,4	18,6	17,1	1,0/0,0	2,3	5,6	7,0	---	11,4	14,8	13,9
14. <i>P. wagnerianus</i>	16,0	16,1	16,4	15,9	13,1	19,6	17,6	20,2	15,4	14,4	15,7	15,4	7,2	n.a./n.a.	5,6	6,4	---	11,6	14,1	13,4
15. <i>P. muralis</i>	17,3	16,4	19,4	17,0	15,9	15,4	17,1	18,8	15,6	20,4	19,3	15,4	13,7	14,1	4,1/1,2	5,9	---	10,1	16,3	12,7
16. <i>P. bocagei</i>	17,4	17,6	17,7	19,0	16,7	18,1	18,8	19,4	19,7	21,4	18,0	15,2	18,9	15,2	15,3	0,7/0,0	---	9,4	15,1	12,6
17. <i>P. filfolensis</i>	20,6	21,4	19,4	20,4	19,4	21,9	17,9	21,3	20,2	21,0	17,7	19,9	18,8	17,0	19,9	19,0	2,0/---	---	---	---
18. <i>T. dugesii</i>	23,1	23,2	25,0	24,1	25,0	18,4	16,4	19,3	21,4	24,1	21,6	22,2	21,2	21,1	21,9	20,1	20,2	n.a./n.a.	13,9	11,8
19. <i>A. andreanskyi</i>	22,4	22,6	23,4	21,6	25,6	23,0	22,8	25,4	21,0	29,3	31,2	28,0	25,4	25,3	24,8	20,8	27,4	19,8	n.a./n.a.	18,8
20. <i>L. agilis</i>	21,9	23,7	24,6	20,3	21,4	18,4	17,2	22,7	19,4	21,6	18,2	27,4	21,3	20,9	22,7	23,8	24,9	20,0	25,8	n.a./n.a.

Οι τιμές στη διαγώνιο (πλάγια γραμματοσειρά) αντιστοιχούν στις εντός των κλάδων γενετικές αποκλίσεις (*cyt b* / *16S rRNA*), ενώ οι παύλες υποδεικνύουν την απουσία του taxon όσον αφορά το *16S rRNA* και η ένδειξη n.a. υποδεικνύει την αδυναμία υπολογισμού της απόκλισης εντός της εξελικτικής γραμμής λόγω μοναδιαίας αντιπροσώπευσης της στα δεδομένα.



Εικόνα.2.2. Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο mtDNA γενετικών τόπων (*cyt b* και *16S rRNA*) όσον αφορά τους κύριους φυλογενετικούς κλάδους. Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (>0,95) και οι τιμές bootstrap (>50%) όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται πάνω από το κάθε φυλογενετικό κλαδί. Στις περιπτώσεις που δεν δίνεται τιμή, η στατιστική υποστήριξη είναι μικρή, ενώ οι παύλες υποδηλώνουν διαφορετική τοπολογία. Τέλος, οι αστερισκοί υποδεικνύουν απόλυτη στατιστική υποστήριξη από όλες τις μεθόδους.

Σύμφωνα με το παραγόμενο φυλογενετικό δέντρο, τα δείγματα του γένους *Podarcis* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ομαδοποιούνται σε αρκετούς κύριους φυλογενετικούς κλάδους, με την πλειονότητα των μορφολογικά αναγνωρισμένων ειδών να εμφανίζονται μονοφυλετικά. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ αυτών των κύριων κλάδων είναι, ως επί το πλείστον, άλυτες με εξαίρεση τέσσερις ομαδοποιήσεις: την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*», την υποομάδα ειδών «*P. erhardii*», το ζεύγος ειδών *P. siculus* – *P. waglerianus* και το ζεύγος ειδών *P. pityusensis* – *P. lilfordi*.

Εντός της υπό εξέτασης ομάδας ειδών «*P. tauricus*», η οποία εμφανίζεται μονοφυλετική με μέτρια έως υψηλή στατιστική υποστήριξη, αναγνωρίζονται πέντε κύριοι φυλογενετικοί κλάδοι με άλυτες φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τους, οι οποίοι αντιστοιχούν στα μορφολογικά αναγνωρισμένα taxa *P. melisellensis*, *P. milensis*, *P. gaiageae*, *P. tauricus ionicus* και *P. t. tauricus* - *P. t. thasopulae*. Σύμφωνα με την mtDNA τοπολογία, το είδος *P. tauricus sensu stricto* είναι πολυφυλετικό, αν και με χαμηλή στατιστική υποστήριξη, εξαιτίας της κοντινής φυλογενετικής συγγένειας μεταξύ των *P. t. ionicus* και *P. gaiageae*. Επιπροσθέτως, το taxon *P. t. ionicus* είναι μονοφυλετικό με πέντε, καλά υποστηριγμένους στατιστικά, φυλογενετικούς υποκλάδους (*a* – *e*; βλ. Εικ. 2.2 για την αντίστοιχη γεωγραφική κατανομή κάθε υποκλάδου). Οι μεταξύ υποκλάδων φυλογενετικές σχέσεις μπορούν να θεωρηθούν μερικώς επιλυμένες. Με υψηλή στατιστική υποστήριξη εκτιμάται η σχέση αδελφών γενεαλογιών μεταξύ των υποκλάδων *a* – *b*, ενώ με μέτρια έως καλή η κοντινή σχέση των υπόλοιπων τριών υποκλάδων και η αδελφική σχέση μεταξύ των υποκλάδων *c* και *d*. Τα υπόλοιπα δύο υποείδη του είδους *P. tauricus sensu stricto* (*P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae*) ομαδοποιούνται εντός του ίδιου φυλογενετικού κλάδου, ο οποίος περιλαμβάνει δείγματα από μεγάλο εύρος της γεωγραφικής κατανομής του είδους αυτού (Εικ. 2.1Α, 2.1Β και 2.1Γ) και χαρακτηρίζεται από χαμηλή γενετική ποικιλότητα. Ο φυλογενετικός κλάδος του είδους *P. gaiageae* εμπεριέχει δείγματα από τη νήσο Σκύρο και τις γειτονικές νησίδες Σαρακινό, Πλατειά, Κούλουρη, Έξω Διαβάτης, Λακονήσι, Σκυροπούλα, Βάλαξα, Παλαμάρι, Ρηνεία, καθώς και από τη νησίδα Πιπέρι, με το υποείδος που ενδημεί στο τελευταίο (*P. g. weigandi*), να

μην είναι φυλογενετικά διακριτό από το υποείδος *P. g. gaigeae* που κατανέμεται στις υπόλοιπες νησίδες και τη νήσο Σκύρο. Ο φυλογενετικός κλάδος του είδους *P. melisellensis* υποδιαιρείται σε τρεις φυλογενετικούς υποκλάδους με άλυτες φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τους, αλλά με διακριτή γεωγραφική καταγωγή. Οι δύο από αυτούς τους υποκλάδους προέρχονται από τις Δαλματικές Νήσους και τις γειτονικές τους νησίδες (οι νήσοι Glavat και Lastono αποτελούν τον πρώτο φυλογενετικό υποκλάδο, ενώ οι νήσοι Jabuka, Brusnik, Bišeno και Vis τον δεύτερο). Ο τρίτος φυλογενετικός υποκλάδος περιέχει δείγματα από το Μαυροβούνιο, τη Βοσνία-Ερζεγοβίνη και τα κροατικά παράλια (Koromačno-Istria και Cavtat-Dalmatia), καθώς και μερικές νήσους και νησίδες της Δαλματίας (νήσος Korčula, νησίδα Purara και νήσος Hvar). Τέλος, ο φυλογενετικός κλάδος του είδους *P. milensis* αποτελείται από δείγματα του νησιωτικού συγκροτήματος της νήσου Μήλου (νήσος Μήλος, νήσος Κίμωλος, νησίδα Αντίμηλος και νησίδα Άγιος Ευστάθιος).

Αναφορικά με την υποομάδα ειδών *P. erhardii*, το ομώνυμο είδος *P. erhardii* εμφανίζεται στη βάση του φυλογενετικού δέντρου της υποομάδας, ενώ οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των υπόλοιπων μελών της υποομάδας (*P. peloponnesiacus*, *P. levendis* και *P. cretensis*) παραμένουν άλυτες.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης PTP ήταν η ανίχνευση 34 διακριτών εξελικτικών οντοτήτων. Από κάθε μια από τις παραπάνω οντότητες επιλέχθηκαν έως 10 άτομα (Παράρτημα II) και αλληλουχήθηκαν για τους τρεις πυρηνικούς γενετικούς τόπους (*MC1R*, *Pod55* και *Pod15b*) με εξαίρεση τα δείγματα με κωδικό 947 (*P. tauricus* από Καλαμάτα) και 132 (*P. muralis* από το Όρος Κίσαβος), για τα οποία απέτυχε ο πολλαπλασιασμός των nDNA μοριακών γενετικών δεικτών. Εξαίρεση αποτελούν επίσης και τα δείγματα των οποίων οι mtDNA αλληλουχίες ανακτήθηκαν από τη βάση GenBank (π.χ. ο υποκλάδος Lastono του είδους *P. melisellensis*).

## 4.2. Το γονιδιακό δέντρο των τριών nDNA γενετικών τόπων

Συνολικά στοιχήθηκαν 1.739 ζεύγη βάσεων για τα 3 πυρηνικά γονίδια (*MC1R* 696 ζ.β., *Pod55* 474 ζ.β. και *Pod15b* 569 ζ.β.) με 164 (9,4%) νουκλεοτιδικές θέσεις να εμφανίζουν ποικιλομορφία και 103 (5,9%) να είναι πληροφοριακές υπό το κριτήριο της φειδωλότητας (172 και 103, αντίστοιχα, όταν οι εξω-ομάδες λαμβάνονται υπόψιν στις μετρήσεις).

Το μήκος των παραγόμενων αλληλουχιών είχε εύρος από 576 έως 696 ζ.β. για το γονίδιο *MC1R*, από 408 έως 474 ζ.β. για τον γενετικό τόπο *Pod55* και από 415 έως 541 ζ.β. για τον γενετικό τόπο *Pod15b*.

Η απόκλιση των αλληλουχιών ανά ζεύγος είχε εύρος από 0 έως 2,7% για το γονίδιο *MC1R*, από 0 έως 3,1% για τον γενετικό τόπο *Pod55* και από 0 έως 6,1% για τον γενετικό τόπο *Pod15b*. Οι nDNA γενετικές αποστάσεις μεταξύ και εντός των κύριων φυλογενετικών κλάδων, όπως αποκαλύφθηκαν από τις φυλογενετικές αναλύσεις, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4., ενώ οι ανά ζεύγος nDNA γενετικές αποστάσεις φαίνονται στον Συμπληρωματικό Πίνακα Σ2 (Παράρτημα III).

Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις (NJ, MP, ML και BI) βάσει του nDNA παρήγαγαν δέντρα παρόμοιας τοπολογίας (Εικ. 2.3), τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά του mtDNA (Εικ. 2.2) με τιμή  $lnL=-4.057,21$  για την ML ανάλυση και τιμή  $lnL=-4.361,08$  για την ανάλυση BI. Η μονοφυλετικότητα του taxon *P. t. ionicus* δεν υποστηρίζεται στατιστικά, ωστόσο υπάρχει υψηλή στατιστική υποστήριξη του ζεύγους *P. cretensis* και *P. levendis* ως αδελφά taxa, η οποία σχέση δεν παρατηρήθηκε στο mtDNA φυλογενετικό δέντρο με υψηλή στατιστική υποστήριξη.

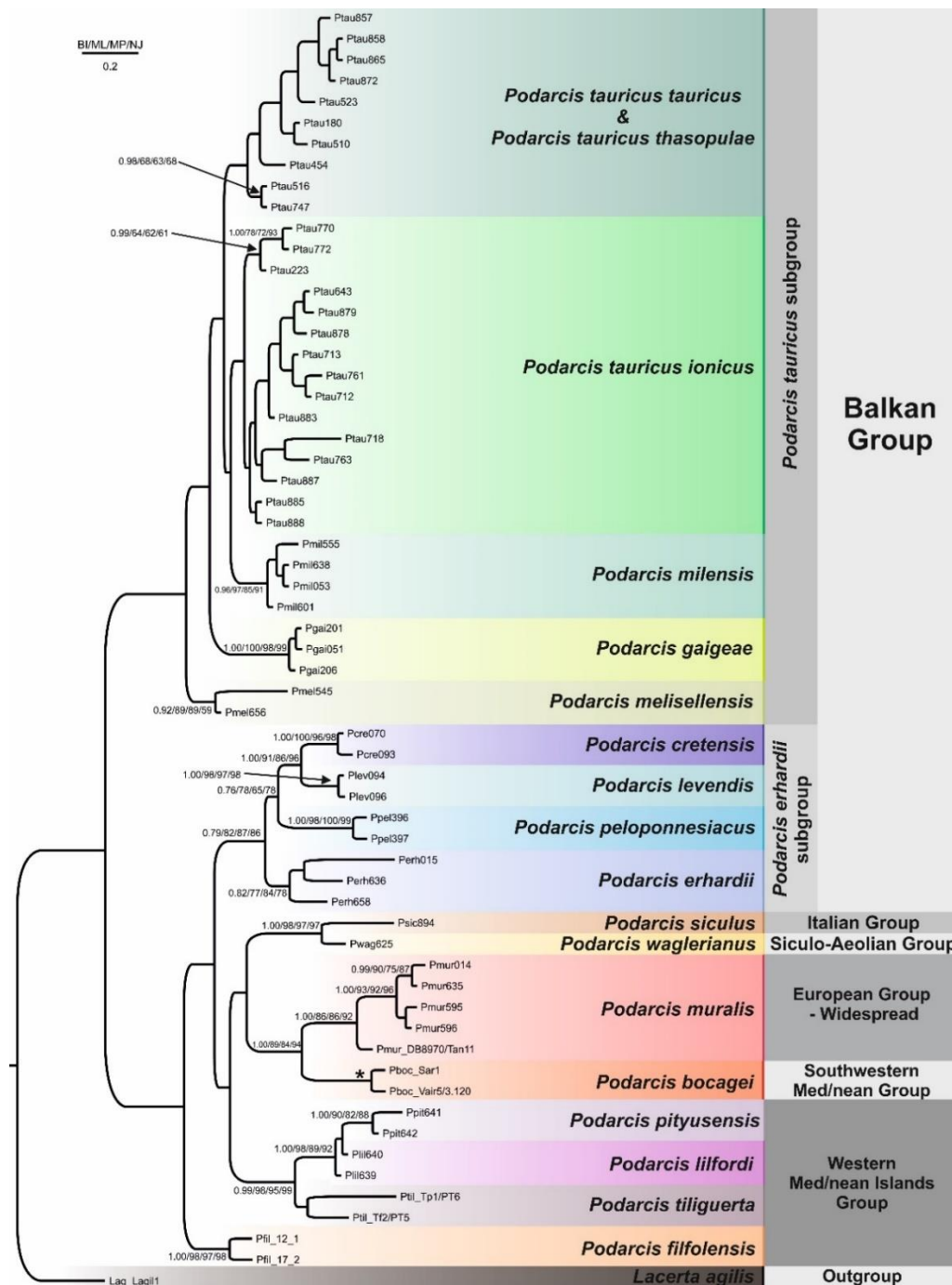
Για βοηθητικούς λόγους τα φυλογενετικά δέντρα βάσει κάθε πυρηνικού γενετικού τόπου ξεχωριστά δίνονται στις Συμπληρωματικές Εικόνες Σ5 έως Σ7 (Παράρτημα III). Τα δέντρα αυτά δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τα «phased data» των αλληλουχιών.

**Πίνακας 2.4.** Γενετικές αποστάσεις (βάσει του μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης των Tamura & Nei) των γενετικών τόπων *Pod55* και *Pod15b* (κάτω από τη διαγώνιο - αριστερά, ο τόπος *Pod15b* εντός παρενθέσεων) και *MC1R* (πάνω από τη διαγώνιο - δεξιά) μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων.

Φυλογενετικός Κλάδος	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>P. tauricus tauricus</i> & <i>Podarcis tauricus thasopulae</i>	0,0/0,3/0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,9	0,8	0,8	0,2	0,8	0,4	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	2,0
2. <i>P. tauricus ionicus</i>	0,3 (0,6)	0,1/0,2/0,3	0,2	0,6	0,4	0,9	0,8	0,6	0,2	0,8	0,4	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6	0,8	2,0
3. <i>P. gaigeae</i>	0,9 (0,9)	0,7 (0,9)	0,0/0,0/0,0	0,4	0,7	1,1	1,1	1,1	0,4	1,1	0,8	1,0	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	2,0
4. <i>P. milensis</i>	0,4 (0,7)	0,3 (0,8)	1,0 (1,0)	0,0/0,0/0,1	0,3	0,8	0,7	0,7	0,1	0,7	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6	0,6	1,9
5. <i>P. melisellensis</i>	0,9 (1,3)	0,8 (1,1)	1,4 (1,1)	0,8 (1,4)	0,2/1,2/0,2	0,9	0,8	0,8	0,2	0,8	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	1,8
6. <i>P. cretensis</i>	1,0 (3,2)	1,3 (3,1)	1,9 (2,9)	1,2 (3,2)	1,1 (3,4)	0,0/0,0/0,2	0,4	1,0	0,7	1,3	0,9	1,0	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	2,6
7. <i>P. levendis</i>	1,1 (2,9)	1,4 (2,8)	2,0 (2,7)	1,3 (3,0)	1,2 (3,1)	0,1 (0,8)	0,0/0,0/0,0	0,9	0,6	1,2	0,8	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	2,4
8. <i>P. peloponnesiacus</i>	1,7 (3,2)	2,0 (2,9)	2,6 (3,0)	1,9 (3,2)	1,8 (3,3)	0,7 (1,0)	0,8 (0,9)	0,0/0,0/4/0,0	0,6	1,2	0,9	1,1	1,2	1,2	0,9	0,9	1,3	2,4
9. <i>P. erhardii</i>	1,3 (4,2)	1,6 (4,0)	2,0 (3,9)	1,4 (4,1)	1,3 (4,4)	0,2 (2,1)	0,4 (1,9)	1,0 (2,1)	0,4/2,2/0,0	0,6	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4	0,6	1,8
10. <i>P. pityusensis</i>	1,7 (3,6)	1,9 (3,4)	2,4 (2,9)	1,8 (3,6)	1,7 (3,4)	0,7 (2,9)	0,8 (2,8)	1,4 (3,1)	1,0 (3,9)	0,0/0,6/0,0	0,3	0,4	0,9	1,2	0,9	0,9	1,0	2,3
11. <i>P. lilfordi</i>	1,6 (3,4)	1,9 (3,3)	2,4 (2,8)	1,8 (3,4)	1,7 (3,3)	0,6 (2,4)	0,7 (2,4)	1,3 (2,7)	0,8 (3,6)	0,0 (0,4)	0,0/0,0/0,0	0,2	0,6	0,9	0,6	0,4	0,6	2,0
12. <i>P. tiliguerta</i>	1,9 (3,9)	2,2 (3,8)	2,6 (3,3)	1,8 (3,7)	1,7 (3,8)	0,8 (3,0)	0,9 (2,7)	1,5 (2,9)	1,0 (4,0)	1,0 (1,4)	0,9 (1,0)	0,7/1,2/0,3	0,9	1,2	0,8	0,8	0,9	2,4
13. <i>P. siculus</i>	2,1 (3,4)	2,4 (2,8)	3,1 (3,1)	2,4 (3,3)	1,8 (2,9)	1,2 (2,8)	1,3 (2,6)	1,9 (2,6)	1,7 (3,6)	1,9 (2,5)	1,8 (2,3)	2,6 (2,5)	n.a./n.a./n.a.	0,4	0,8	0,9	0,5	2,5
14. <i>P. waglerianus</i>	1,0 (3,1)	1,3 (2,6)	1,9 (2,9)	1,2 (3,2)	1,6 (2,7)	0,5 (2,4)	0,6 (2,0)	1,2 (2,2)	0,7 (3,3)	1,2 (2,1)	1,1 (1,9)	1,3 (2,3)	1,2 (0,4)	n.a./n.a./n.a.	1,0	0,9	0,7	2,5
15. <i>P. muralis</i>	2,0 (3,1)	1,9 (3,0)	2,6 (2,9)	1,9 (3,2)	2,1 (3,1)	1,5 (2,3)	1,7 (2,3)	2,3 (2,5)	1,9 (3,5)	2,2 (2,3)	2,2 (1,9)	2,8 (2,0)	2,3 (2,1)	1,6 (1,7)	0,1/0,3/0,2	0,5	0,7	2,3
16. <i>P. bocagei</i>	2,2 (3,5)	2,5 (3,2)	3,1 (3,0)	2,3 (3,5)	2,7 (3,1)	1,5 (2,7)	1,6 (2,2)	2,2 (2,76)	1,9 (3,8)	2,3 (2,3)	2,2 (1,8)	2,6 (2,0)	2,3 (2,0)	1,5 (2,0)	1,9 (1,1)	0,0/0,4/0,0	0,9	2,4
17. <i>P. filfolensis</i>	0,7 (2,8)	0,6 (2,7)	1,2 (2,7)	0,5 (2,8)	0,4 (3,1)	0,7 (2,0)	0,9 (1,7)	1,5 (1,9)	1,0 (3,2)	1,3 (2,2)	1,3 (1,8)	1,3 (2,2)	2,0 (2,1)	1,2 (1,7)	1,8 (1,6)	2,3 (1,8)	0,0/0,0/0,6	2,5
18. <i>Lacerta agilis</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---/---/n.a.

Οι τιμές στη διαγώνιο (πλάγια γραμματοσειρά) αντιστοιχούν στις εντός των κλάδων γενετικές αποκλίσεις (*Pod55* / *Pod15b* / *MC1R*), ενώ οι παύλες υποδεικνύουν την απουσία του taxon και η ένδειξη n.a. υποδεικνύει την αδυναμία υπολογισμού της απόκλισης εντός της εξελικτικής γραμμής λόγω μοναδιαίας αντιπροσώπευσης της στα δεδομένα.





Εικόνα 2.3. Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των τριών nDNA γενετικών τόπων (*MC1R*, *Pod55* και *Pod15b*). Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (>0,95) και οι τιμές bootstrap (>50%) όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται πάνω από το κάθε φυλογενετικό κλαδί. Στις περιπτώσεις που δεν δίνεται τιμή, η στατιστική υποστήριξη είναι μικρή, ενώ οι παύλες υποδηλώνουν διαφορετική τοπολογία. Τέλος, οι αστερίσκοι υποδεικνύουν απόλυτη στατιστική υποστήριξη από όλες τις μεθόδους.

### 4.3. Το γονιδιακό δέντρο των πέντε γενετικών τόπων (mtDNA και nDNA)

Στο σύνολο, για τις φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας και τους πέντε γενετικούς τόπους (*cyt b*, *16S rRNA*, *MC1R*, *Pod55* και *Pod15b*) στοιχήθηκαν 2.718 ζεύγη βάσεων με 438 (16,1%) νουκλεοτιδικές θέσεις να εμφανίζουν ποικιλομορφία και 353 (13,0%) να είναι πληροφοριακές υπό το κριτήριο της φειδωλότητας (468 και 355, αντίστοιχα, όταν οι εξω-ομάδες λαμβάνονται υπόψιν στις μετρήσεις).

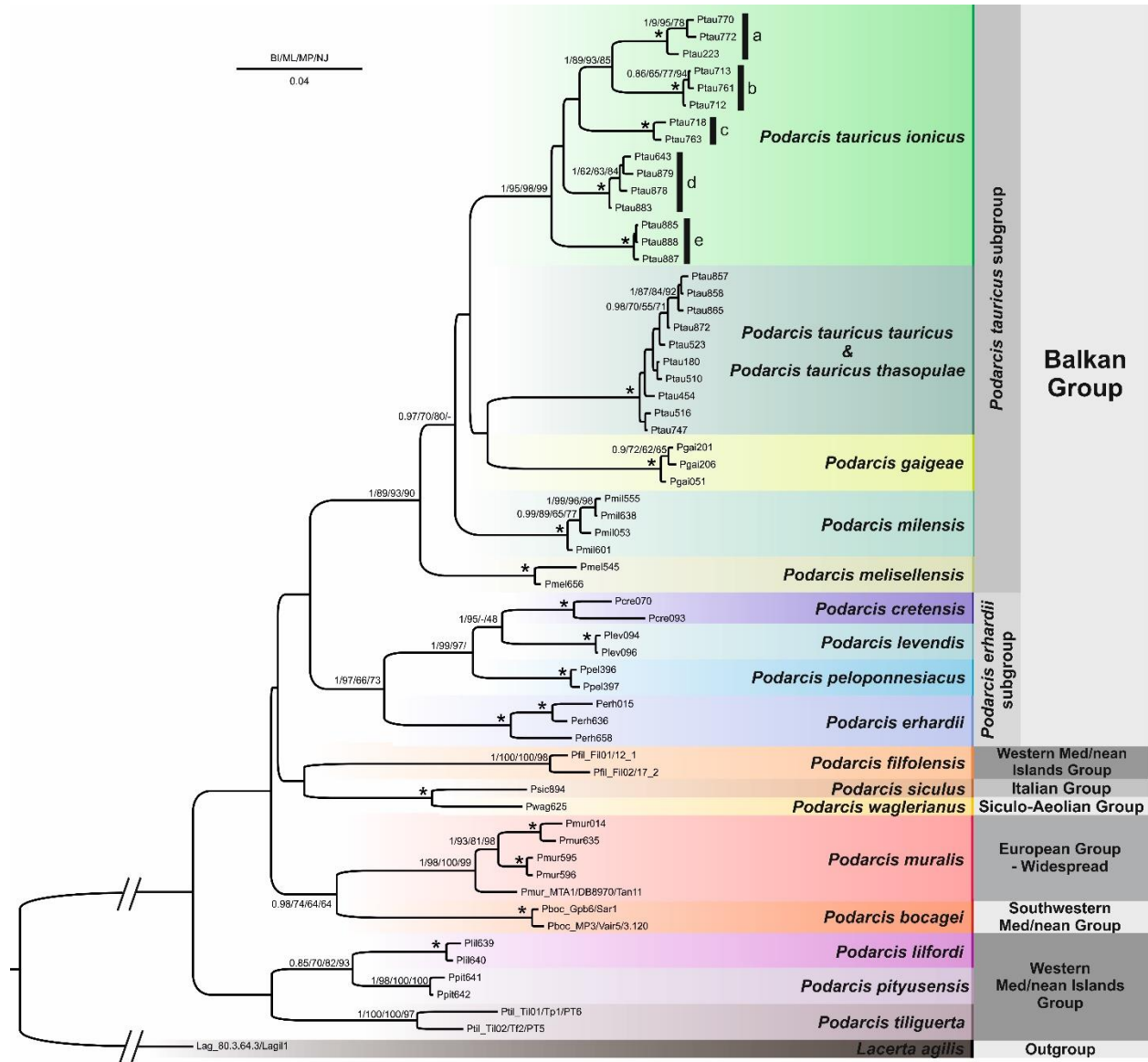
Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις (NJ, MP, ML και BI) για το σύνολο των mtDNA και nDNA παρήγαγαν δέντρα παρόμοιας τοπολογίας με τα προηγούμενα όσον αφορά τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων (Εικ. 2.4) με τιμή  $lnL=-9.934,64$  για την ML ανάλυση και τιμή  $lnL=-10.198,58$  για την ανάλυση BI. Σύμφωνα με αυτό το δέντρο, υποστηρίζονται τα ακόλουθα: (α) οι υποομάδες ειδών «*P. tauricus*» και «*P. erhardii*» είναι μονοφυλετικές, (β) το είδος *P. melisellensis* βρίσκεται στη βάση της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», (γ) το είδος *P. erhardii* βρίσκεται στη βάση της υποομάδας ειδών «*P. erhardii*», (δ) τα είδη *P. peloponnesiacus*, *P. levendis* και *P. cretensis* είναι στενά συγγενικά με τα δύο τελευταία να είναι αδελφά taxa, και (ε) οι ομάδες ειδών που αντιπροσωπεύονται από τα είδη *P. muralis* και *P. bocagei* έχουν σχέση αδελφών ομάδων.

Εντός του *P. t. ionicus* αναγνωρίζονται πάλι πέντε κύριοι φυλογενετικοί υποκλάδοι, όπως και στην περίπτωση των δύο γενετικών τόπων, οι σχέσεις των οποίων ωστόσο είναι ασαφείς εκτός του ζεύγους των υποκλάδων *a - b*. Οι γενετικές αποστάσεις των παραπάνω φυλογενετικών υποκλάδων δίνονται στον Πίνακα 2.5.

**Πίνακας 2.5.** Γενετικές αποστάσεις (βάσει του μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης των Tamura & Nei) των μιτοχονδριακών (*cyt b / 16S rRNA*, κάτω από τη διαγώνιο - αριστερά) και των πυρηνικών γενετικών τόπων (*Pod55 / Pod15b / MC1R*, πάνω από τη διαγώνιο - δεξιά) μεταξύ των κύριων φυλογενετικών υποκλάδων του taxon *Podarcis tauricus ionicus*.

Υποκλάδοι του <i>Podarcis tauricus ionicus</i>	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
(a) Νήσοι Ζάκυνθος και Κεφαλονιά	0,6/0,4/0,0/0,2/0,0	0,1/0,3/0,3	0,2/0,3/0,6	0,0/0,4/0,3	0,2/0,2/0,3
(b) Δυτική Στερεά Ελλάδα	5,6/3,3	0,7/0,2/0,1/0,0/0,1	0,2/0,1/0,4	0,0/0,4/0,2	0,1/0,1/0,1
(c) Βορειοανατολική Πελοπόννησος	9,4/2,7	10,4/3,7	0,1/0,0/0,2/0,8/0, 0	0,2/0,4/0,4	0,2/0,2/0,4
(d) Κεντρική & νοτιοανατολική Πελοπόννησος	8,1/2,7	8,4/3,2	8,4/1,2	0,2/0,0/0,0/0,00,1 /	0,1/0,2/0,2
(e) Βόρεια και νοτιοδυτική Πελοπόννησος, βορειοδυτική Ελλάδα, Νήσος Κέρκυρα και νότια-νοτιοδυτική Αλβανία	8,4/2,6	7,4/2,8	8,1/1,6	6,7/1,6	0,4/0,2/0,2/0,1/0, 0

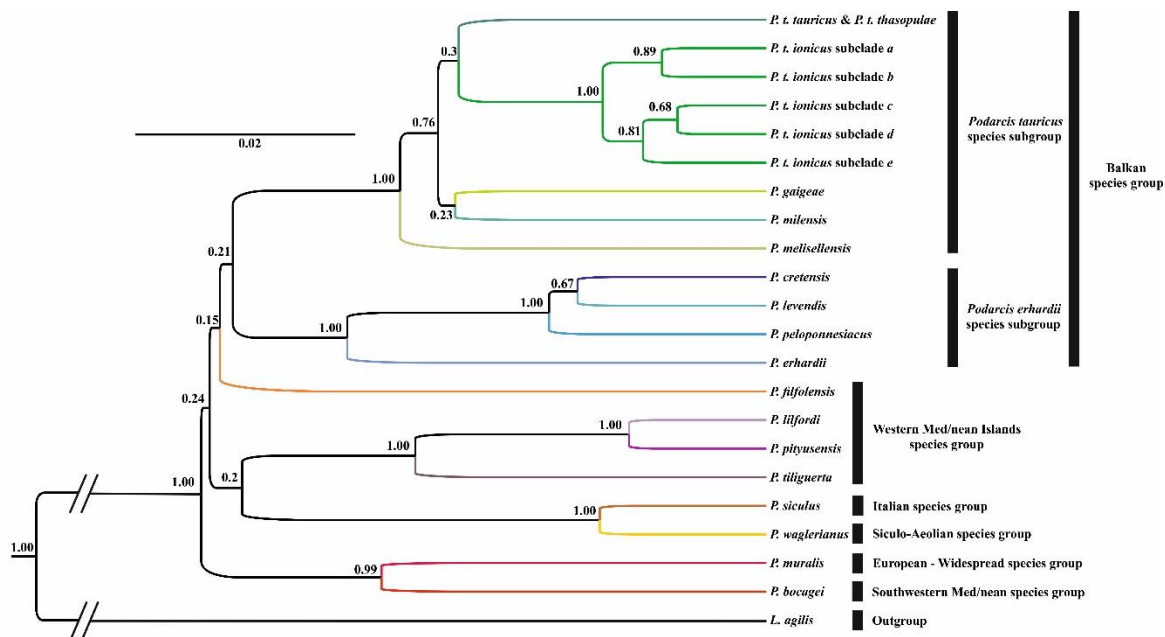
Οι τιμές στη διαγώνιο (πλάγια γραμματοσειρά) αντιστοιχούν στις εντός των υποκλάδων γενετικές αποκλίσεις των πέντε γενετικών τόπων (*cyt b / 16S rRNA / Pod55 / Pod15b / MC1R*).



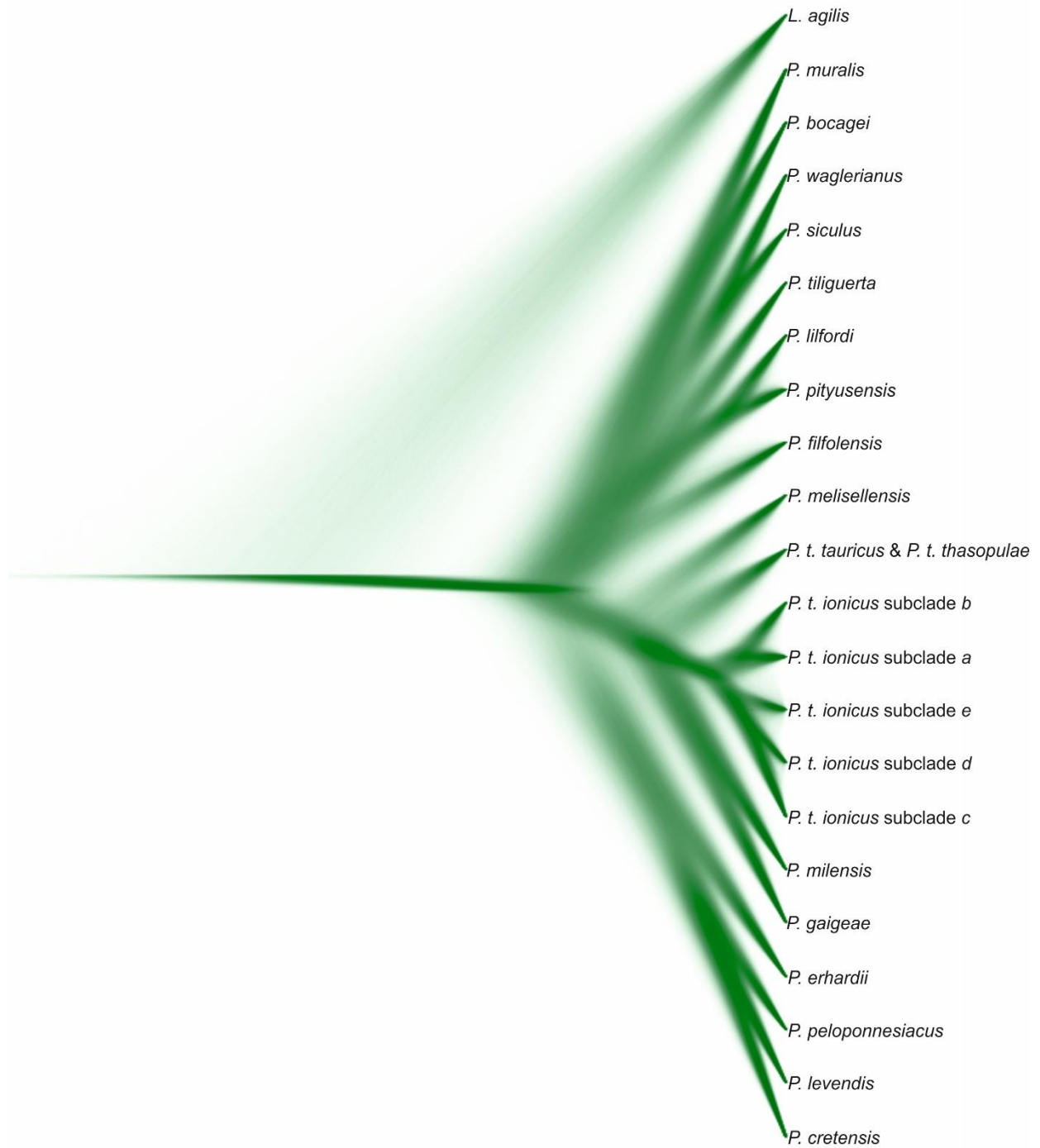
Εικόνα 2.4. Η τοπολογία του Bayesian Inference φυλογενετικού δέντρου βάσει των πέντε γενετικών τόπων (*cyt b*, *16S rRNA*, *MC1R*, *Pod55* και *Pod15b*). Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (>0,95) και οι τιμές bootstrap (>50%) όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται πάνω από το κάθε φυλογενετικό κλαδί. Στις περιπτώσεις που δεν δίνεται τιμή, η στατιστική υποστήριξη είναι μικρή, ενώ οι παύλες υποδηλώνουν διαφορετική τοπολογία. Τέλος, οι αστερίσκοι υποδεικνύουν απόλυτη στατιστική υποστήριξη από όλες τις μεθόδους.

#### 4.4. Το δέντρο των ειδών

Στην coalescent εκτίμηση του δέντρου των ειδών παρατηρήθηκαν καλές τιμές ESS (>224) με τιμή  $\ln L = -9.788,00$ . Το δέντρο των ειδών (Εικ. 2.5 και 2.6) είναι εν μέρει σε συμφωνία με το γονιδιακό δέντρο των πέντε γενετικών τόπων (Εικ. 2.4) υποστηρίζοντας (α) τη μονοφυλετικότητα της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», (β) τη μονοφυλετικότητα του taxon *P. t. ionicus*, (γ) το είδος *P. erhardii* ως το taxon που βρίσκεται στη βάση της ομώνυμης υποομάδας ειδών, (δ) το είδος *P. tiliguerta* ως στενά συγγενικό με τα αδελφά είδη *P. lilfordi* και *P. pityusensis*, και (ε) τη σχέση αδελφών ειδών μεταξύ *P. muralis* και *P. bocagei*. Αντίθετα, η πλειονότητα των φυλογενετικών κόμβων που βρίσκονται κοντά στη ρίζα είχαν χαμηλή στατιστική υποστήριξη. Το ίδιο παρατηρείται και για τις σχέσεις μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», καθώς και μεταξύ των φυλογενετικών υποκλάδων του taxon *P. t. ionicus*. Τέλος, η αδελφική σχέση μεταξύ των ειδών *P. cretensis* και *P. levendis* δεν υποστηρίζεται στατιστικά.



Εικόνα. 2.5. Η σύμφωνη τοπολογία του coalescent δέντρου των ειδών της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» και των συγγενικών της ειδών. Οι τιμές των εκ των υστέρων πιθανοτήτων δίνονται κοντά στους κλάδους. Τιμές άνω του 0.95 υποδεικνύουν στατιστική σημαντικότητα.



Εικόνα. 2.6. Το σύνολο όλων των πιθανών coalescent δέντρων των ειδών σε προβολή διάταξης αστεριού, για την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» και των συγγενικών της ειδών.

## 5. Συζήτηση

Οι αναλύσεις του παρόντος κεφαλαίου είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας φυλογενετικής αναπαράστασης των μελών του γένους *Podarcis* βάσει της οποίας μπορεί να γίνει διερεύνηση των δια- και ενδο-ειδικών φυλογενετικών σχέσεων και της βιολογικής ποικιλότητας της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ ξεχωρίζουν για την ενδελεχή δειγματοληψία των taxa της παραπάνω υποομάδας, με την συμπερίληψη αντιπροσώπων όλων των αναγνωρισμένων ειδών, αλλά και την πλειονότητα των υποειδών τους. Συμπεριλήφθηκαν δείγματα από όλο σχεδόν το εύρος της γεωγραφικής κατανομής των παραπάνω ειδών και εφαρμόστηκαν αρκετές φυλογενετικές μέθοδοι βάσει μόνο αλληλουχιών mtDNA αλλά και συνδυασμού mtDNA και nDNA αλληλουχιών, καθώς και μια coalescent μέθοδος για τη δημιουργία δέντρου ειδών. Τα παραγόμενα αποτελέσματα και ευρήματα υποστηρίζουν μερικώς την τρέχουσα ταξινόμηση της υπό εξέταση υποομάδας ειδών, ωστόσο αποκάλυψαν και μια σειρά συστηματικών ασυμφωνιών.

### 5.1. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των βαλκανικών

#### *Podarcis*

Εκκινώντας από τις ομάδες ειδών του γένους, είναι εμφανές ότι τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι μερικώς σύμφωνα με την τρέχουσα ταξινόμηση (Πίνακας 2.1). Ωστόσο, οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ομάδων ειδών είναι κατά κύριο λόγο μη επιλυμένες (Εικ. 2.3 - 2.5), ενώ το ίδιο ισχύει και για το δέντρο των ειδών (Εικ. 2.5 - 2.6). Η μη επιτυχής ανασύσταση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων του γένους *Podarcis* στη βάση του δέντρου μπορεί να οφείλεται στην ταχεία διαφοροποίηση που πιθανώς έλαβε χώρα κατά την έναρξη της εξελικτικής ιστορίας του γένους, με αποτέλεσμα την παραγωγή βραχέων, αλλά ταυτόχρονα αρχαίων κλάδων με χαμηλό φυλογενετικό «σήμα» (Oliverio et al., 2000). Η συγκεκριμένη υπόθεση έχει χρησιμοποιηθεί για να ερμηνεύσει την αντίστοιχη αδυναμία σχετικά με τη

διερεύνηση των σχέσεων όλης της οικογένειας Lacertidae (Pavlicev and Mayer, 2009). Από την άλλη, αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα δεδομένα μας δεν είναι τα κατάλληλα ή αρκετά για την επίλυση αυτών των σχέσεων, δεν περιλαμβάνονται δηλαδή στις αλληλουχίες αρκετές συναπωμορφίες για τη διάκριση των κλάδων στη βάση των δέντρων. Πιθανή αύξηση των δεδομένων με χρήση επιπλέον πυρηνικών γενετικών δεικτών ίσως αποφέρει καλύτερα αποτελέσματα.

Εντός της «Βαλκανικής» ομάδας ειδών αποκαλύφθηκαν δύο μονοφυλετικές υποομάδες ειδών («*P. tauricus*» και «*P. erhardii*»), γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Roulakakis et al., 2003; Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d). Παρόλα αυτά, αν και η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» φαίνεται να είναι πιο στενά συγγενική με την υποομάδα *P. erhardii*, η σχέση αυτή δεν υποστηρίζεται στατιστικά, υποδεικνύοντας ότι πρέπει να προστεθούν περισσότερα δεδομένα στα ήδη υπάρχοντα για να γίνει εφικτή η αξιολόγηση της παραπάνω φυλογενετικής εγγύτητας. Εντός της υποομάδας ειδών *P. erhardii* οι φυλογενετικές σχέσεις είναι πλήρως επιλυμένες με υψηλή στατιστική υποστήριξη, με το είδος *P. erhardii* να εμφανίζεται ως taxon που, φυλογενετικά, εντοπίζεται στη βάση της υποομάδας (Roulakakis et al., 2003; Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d). Επιπροσθέτως, τα είδη *P. cretensis* και *P. levendis* αποτελούν αδελφά taxa και ως ζεύγος ειδών είναι στενά συγγενικά με το είδος *P. peloropnesiacus*, επιλύοντας με αυτόν τον τρόπο τις φυλογενετικές σχέσεις αυτών των τεσσάρων ειδών.

Αναφορικά με τα υπόλοιπα είδη (ή ομάδες ειδών) του γένους, αξίζουν να αναφερθούν δύο ενδιαφέροντα ευρήματα. Το πρώτο σχετίζεται με τη φυλογενετική θέση του είδους *P. muralis*, ως κοντινό taxon σε ένα μέλος της Νοτιοδυτικής Μεσογειακής ομάδας ειδών (*P. bocagei*). Ωστόσο, λόγω της έλλειψης των υπόλοιπων ειδών-μελών της τελευταίας ομάδας, αυτό το συμπέρασμα πρέπει να ληφθεί υπόψιν με επιφυλακτικότητα. Να σημειωθεί ότι η παραπάνω σχέση υποστηρίζεται και από μια πρόσφατη μελέτη (Michaelides et al., 2015), στην οποία όμως γίνεται χρήση ενός άλλου μέλους της Νοτιοδυτικής Μεσογειακής ομάδας ειδών, του είδους *P. liolepis* (Boulenger, 1905), ενώ



παιλιότερες φυλογενετικές μελέτες θεωρούσαν το είδος *P. muralis* είτε ξεχωριστή ομάδα ειδών (Carranza et al., 2004; Harris et al., 2005; Vasconcelos et al., 2006) είτε αδελφό taxon του είδους *P. siculus* της Ιταλικής ομάδας ειδών (Arnold et al., 2007; Buades et al., 2013) ή αδελφό taxon του είδους *P. raffoneae* της Σικελο-αιολικής ομάδας ειδών (Harris and Arnold, 1999). Παρόλα αυτά, η πλειονότητα αυτών των μελετών στηρίζονταν σε mtDNA δίχως τη συμπερίληψη αντιπροσώπων της Νοτιοδυτικής Μεσογειακής ομάδας ειδών. Το δεύτερο εύρημα σχετίζεται με τη φυλογενετική θέση του είδους *P. siculus*, το οποίο εμφανίζεται πιο συγγενικό με το είδος *P. waglerianus* Gistel, 1868 της Σικελο-αιολικής ομάδας ειδών. Ακόμη, αν αποδεχτούμε ότι τα είδη *P. raffoneae* και *P. waglerianus* είναι αδελφά taxa ((Πίνακας 2.1, Harris et al., 2005; Vasconcelos et al., 2006), αυτά τα τρία είδη που είναι παρόντα στην ιταλική χερσόνησο, μπορούν να τοποθετηθούν στην ίδια ομάδα ειδών (Ιταλική ομάδα).

## 5.2. Οι φυλογενετικές σχέσεις εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*»

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανασύστασης των φυλογενετικών δέντρων, αλλά και του δέντρου των ειδών, υπάρχουν εννέα διακριτοί φυλογενετικοί κλάδοι και υποκλάδοι εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Οι δύο φυλογενετικοί κλάδοι του taxon *P. tauricus sensu stricto* είναι μορφολογικά, γεωγραφικά και φυλογενετικά διακριτοί κάτι που ενισχύει την άποψη διαίρεσης του taxon αυτού σε τουλάχιστον δύο διακριτά είδη. Το taxon *P. t. ionicus* χαρακτηρίζεται από υψηλή γενετική ποικιλότητα, αποτελούμενο από διακριτούς κλάδους βαθιάς εξελικτικής απόκλισης, προκαλώντας ερωτήματα σχετικά με το αν πρόκειται για ένα ή περισσότερα είδη. Αναφορικά με τα ελληνικά ενδημικά νησιωτικά είδη *P. milensis* και *P. gaigeae* είναι εμφανές ότι δεν παρουσιάζουν ανεπτυγμένη φυλογενετική δομή ή κάποιο ξεκάθαρο γεωγραφικό πρότυπο. Εντός αυτών των δύο ειδών οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ ατόμων διαφορετικών νησιών και νησίδων παραμένουν άλυτες εμφανίζοντας χαρακτηριστική θαμνοειδή φυλογενετική δομή, κάτι που υποδεικνύει είτε πρόσφατη ιστορία

αποίκισης/κατακερματισμού είτε υψηλή γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών νησιών και νησίδων. Ωστόσο, για το είδος *P. milensis*, θα πρέπει να συμπεριληφθούν δείγματα και από τα υπόλοιπα υποείδη (*P. m. adolfjordansi* και *P. m. gerakuniae*) σε μεταγενέστερες μελέτες ώστε να εξαχθούν πιο αξιόπιστα συμπεράσματα. Για το *P. gaigeae* η γεωγραφική κάλυψη είναι πλήρης. Σχετικά με το επίπεδο των υποειδών, φαίνεται ότι τα υποείδη *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae* δεν αποτελούν ξεχωριστές οντότητες, ενώ το ίδιο ισχύει και για τα υποείδη *P. g. weigandi* και *P. g. gaigeae*. Υπό το φως αυτών των ευρημάτων, η ταξινόμηση των παραπάνω υποειδών θα πρέπει να τροποποιηθεί. Κλείνοντας, το είδος *P. melisellensis* αντιπροσωπεύεται από τρεις υποκλάδους που έχουν ήδη αναγνωριστεί (Podnar et al., 2004; Podnar et al., 2014). Μια συνολική ταξινομική πρόταση παρουσιάζεται στο Έβδομο Κεφάλαιο.

## 6. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου και την επεξεργασία τους μπορούν να εξαχθούν αρκετά χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά τις φυλογενετικές σχέσεις και την ταξινόμηση της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Η υπό μελέτη υποομάδα ειδών είναι μονοφυλετική αποτελούμενη από πέντε κύριους εξελικτικούς κλάδους με άλυτες φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τους. Το είδος *P. melisellensis* αποτελεί το taxon που φυλογενετικά βρίσκεται στη βάση της υποομάδας. Η μονοφυλετικότητα του είδους *P. tauricus sensu stricto* δεν υποστηρίζεται, με το taxon *P. t. ionicus* να εμφανίζει υψηλά επίπεδα κρυμμένης ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας και να υποδιαιρείται σε πέντε φυλογενετικούς υποκλάδους, οι οποίοι επίσης χαρακτηρίζονται από μη επιλυμένες φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τους. Η γενετική διαφοροποίηση εντός των taxa *P. t. tauricus*, *P. g. gaegeae* και *P. m. milensis* εμφανίστηκε να είναι χαμηλή, ενώ η ταξινομική εγκυρότητα των υποειδών *P. t. tauricus*, *P. t. thasopulae*, *P. g. gaegeae* και *P. g. weigandi* αμφισβητείται ως αβάσιμη φυλογενετικά. Τα παραπάνω ευρήματα καθιστούν αναγκαία την ταξινομική αναθεώρηση εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Μεταγενέστερες μελέτες θα πρέπει να εστιάσουν στο σύμπλεγμα ειδών *P. ionicus*, όπως ορίστηκε παραπάνω, το οποίο θα πρέπει να θεωρείται είτε διακριτό είδος με υψηλή γενετική ποικιλότητα είτε σύμπλεγμα ειδών αποτελούμενο από πέντε μη περιεγραμμένα είδη. Εν κατακλείδι, κρίνεται αναγκαία μια αναλυτική μελέτη πληθυσμιακής γενετικής πυρηνικών γενετικών τόπων σε πιθανές ζώνες επαφής μεταξύ των παραπάνω φυλογενετικών κλάδων (μια τέτοια προσπάθεια γίνεται στο Τέταρτο Κεφάλαιο), καθώς και μελέτες μορφολογίας και οικολογίας που θα εστιάζουν σε αυτούς τους κλάδους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

---

### Φυλογενωμικές σχέσεις μεταξύ των ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»

Τα δεδομένα είναι μέρος της υπό προετοιμασία εργασίας (Παράρτημα IV):

*Psonis et al. (2017) Genomic phylogeography and species distribution modelling of the Podarcis tauricus (Sauria: Lacertidae) species subgroup. (In preparation).*

## 1. Περίληψη κεφαλαίου

Η υποομάδα ειδών «*Podarcis tauricus*» περιλαμβάνει τέσσερα είδη, τα οποία αποτελούνται στο σύνολό τους από αρκετούς κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη άλυτων φυλογενετικών σχέσεων. Η Νέας Γενιάς Αλληλούχησης μέθοδος ddRADseq έχει χαρακτηριστεί ως μια από τις πολλά υποσχόμενες στην επίλυση δύσκολων φυλογενετικών ερωτημάτων. Χρησιμοποιώντας δείγματα που αντιπροσωπεύουν τους κύριους φυλογενετικούς κλάδους/ υποκλάδους της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» και εφαρμόζοντας τη μέθοδο ddRADseq, έγινε εφικτή η παραγωγή χιλιάδων γενετικών τόπων γενωμικού επιπέδου. Η κατασκευή φυλογενωμικού δέντρου κάνοντας χρήση αυτών των δεδομένων είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση σχεδόν όλων των παραπάνω φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων και την επίλυση των πολυτομιών που υπήρχαν. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η σειρά με την οποία διαφοροποιήθηκαν οι κύριοι φυλογενετικοί κλάδοι της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» είχε ως εξής: αρχικά διαφοροποιήθηκε το είδος *P. melisellensis*, μετά το είδος *P. milensis*, στη συνέχεια το είδος *P. gaegeae* και ύστερα τα αδελφά taxa *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae*. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν σημαντική γνώση στην προσπάθεια διερεύνησης της εξελικτικής ιστορίας των taxa που μελετώνται.

**Λέξεις κλειδιά:** ddRADseq, ExaML, Γενωμική βιβλιοθήκη, Νέας Γενιάς Αλληλούχηση, Φυλογενωμικό δέντρο.

## 2. Εισαγωγή κεφαλαίου

### 2.1. Νέας Γενιάς Αλληλούχηση (Next Generation Sequencing)

Ο όρος Επόμενης ή Νέας Γενιάς Αλληλούχηση (ΝΓΑ, Next Generation Sequencing, NGS) αναφέρεται στις τεχνολογίες που δεν βασίζονται στην παραδοσιακή διδεοξυ-νουκλεοτιδική αλληλούχηση (dideoxy-nucleotide Sanger sequencing), στην οποία θραύσματα DNA διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω ηλεκτροφόρησης. Οι τεχνολογίες αυτές βασίζονται η κάθε μία σε διαφορετικές στρατηγικές και τεχνικές, αλλά ουσιαστικά το κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η συλλογή σε πραγματικό χρόνο (real-time) δεδομένων μέσω πολυάριθμων (της τάξης των εκατομμυρίων) αντιδράσεων προσθήκης μιας νουκλεοτιδικής βάσης (Richardson, 2010). Η χρήση αυτών των τεχνολογιών έχει ανοίξει νέες επιστημονικές οδούς διερεύνησης βιολογικών φαινομένων, διαδικασιών και μηχανισμών, όπως είναι για παράδειγμα η αναγνώριση σημείων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, ενώ έχουν αρχίσει και χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε κλάδους της Εξελικτικής Βιολογίας όπως η Επιγενετική, η Μεταγενωμική και η μελέτη αρχαίου DNA (ancient DNA). Οι κύριες διαθέσιμες πλατφόρμες ΝΓΑ είναι οι: (α) 454 Genome Sequencer (Roche), (β) Illumina (γνωστή προηγουμένως ως Solexa) Genome analyzer, (γ) SOLiD system (Applied Biosystems/Life Technologies), (δ) Heliscope (Helicos Corporation) και (ε) Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific). Μια ανασκόπηση των διαφορετικών τεχνικών και στρατηγικών που ακολουθούνται από τις παραπάνω πλατφόρμες μπορεί κανείς να διαβάσει στην εργασία των Knapp and Hofreiter (2010). Η δυναμική των τεχνολογιών ΕΓΑ μπορεί να φανεί από το γεγονός ότι, επί του παρόντος, μπορεί να γίνει αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος 25-50 φορές σε μία μόνο μέρα με ατομικό κόστος ~4.000 δολάρια Αμερικής, το οποίο είναι εντυπωσιακό αν αναλογιστεί κανείς ότι χρειάστηκαν 13 χρόνια και ~3 δις δολάρια για την πρώτη αλληλούχισή του με τη μέθοδο Sanger. Συνεπώς, δεν είναι υπερβολικό να ειπωθεί ότι η ΝΓΑ έφερε τεχνολογική επανάσταση στον κλάδο της Εξελικτικής Βιολογίας.

## 2.2. Η ενσωμάτωση της Επόμενης Γενιάς Αλληλούχησης στη Φυλογένεση και τη Φυλογεωγραφία

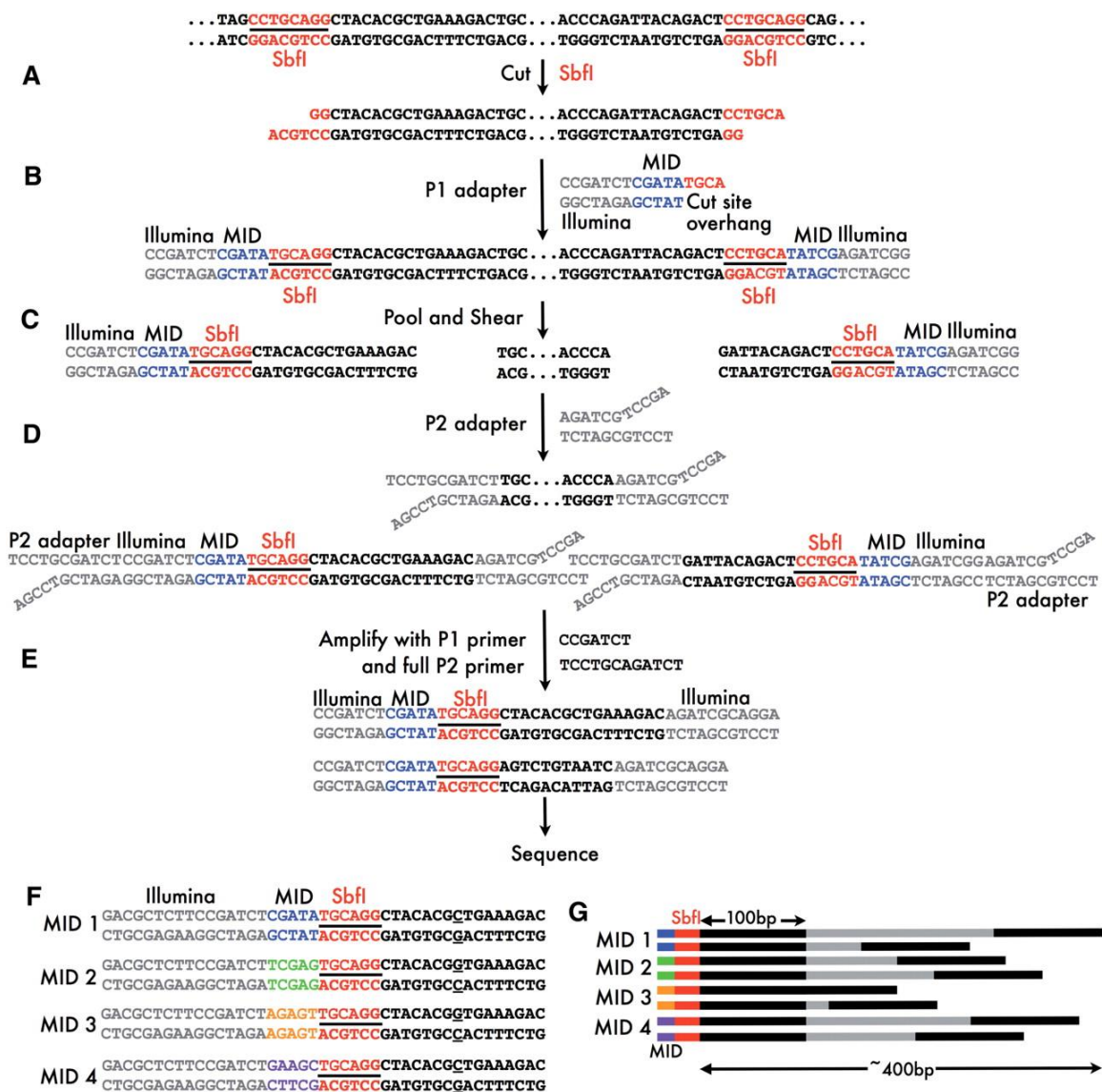
Είναι πλέον αποδεκτό ότι για την κατανόηση και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την εξελικτική ιστορία των πληθυσμών και των ειδών είναι αναγκαία η χρήση πολλαπλών γενετικών τόπων. Ο κυριότερος λόγος σχετίζεται με τη μεταβλητότητα και τη στοχαστικότητα των προτύπων κληρονομησης που εμφανίζουν διαφορετικοί τόποι (coalescent stochasticity) (McCormack et al., 2013). Ωστόσο, η παραγωγή δεδομένων από πολλαπλούς γενετικούς δείκτες αποτελεί επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία και ειδικά σε οργανισμούς που δεν είναι μοντέλα απαιτούνται πολλά βήματα σχεδιασμού, παραγωγής δεδομένων και αξιολόγησης. Η ανάπτυξη των τεχνολογιών ΝΓΑ φέρεται να έχει καλή προοπτική όσον αφορά την επιτάχυνση αυτής της διαδικασίας. Ωστόσο, συγκριτικά με άλλους τομείς (π.χ. γενετική ασθενειών, μικροβιακή Μεταγενωμική), στη Φυλογένεση και τη Φυλογεωγραφία η ΝΓΑ δεν έχει ενσωματωθεί τόσο γρήγορα όσο αναμενόταν. Αυτό οφείλεται σε τέσσερις παράγοντες, σύμφωνα με τους McCormack et al. (2013): (α) στο ότι σε αυτούς τους κλάδους το ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε οργανισμούς που δεν είναι μοντέλα και πολλές φορές σε ελάχιστα μελετημένους οργανισμούς, κάτι που απαιτεί ρύθμιση των γενικών πρωτοκόλλων ή τροποποίηση όλης της στρατηγικής, (β) στην ανάγκη αλληλούχησης πολλών δειγμάτων ανά πληθυσμό και ανά είδος, αυξάνοντας δραματικά το κόστος, (γ) στην έλλειψη καθολικής ισχύος πρωτοκόλλων προετοιμασίας γενωμικών «βιβλιοθηκών» που αφορούν συγκεκριμένα ερωτήματα, και (δ) στη μεταβατική κατάσταση της υπάρχουσας τεχνολογίας, αφού για τη Φυλογένεση και τη Φυλογεωγραφία, η αλληλούχηση του πλήρους γονιδιώματος, παρότι είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί, δεν έχει ούτε το επιθυμητό κόστος ούτε και απόλυτη χρησιμότητα. Το τελευταίο οφείλεται στο ότι ο ελάχιστος όγκος πληροφοριών που επιτρέπει την απάντηση ενός εξελικτικού ερωτήματος μπορεί να είναι μικρότερος από τον όγκο των πληροφοριών που βρίσκονται εντός ολόκληρου του γονιδιώματος, αφαιρώντας έτσι την ανάγκη χρήσης όλου αυτού του

τεράστιου όγκου πληροφορίας, με συνέπεια τη μείωση της απαιτούμενη υπολογιστική ισχύς και ψηφιακού αποθηκευτικού χώρου.



### 2.3. Η μέθοδος RADseq

Μια πρώτη απάντηση στους περιορισμούς της χρήσης των τεχνικών ΝΓΑ στη Φυλογένεση και τη Φυλογεωγραφία που αναφέρθηκαν παραπάνω ήρθε να δώσει μια εναλλακτική προσέγγιση που βασίζεται στην τυχαία, ανεξάρτητη, επιλεκτική και σποραδική συλλογή πληροφοριών από όλο το μήκος του γονιδιώματος, ανακτώντας έτσι μόνο την απαιτούμενη και αναγκαία αντιπροσωπευτική γονιδιωματική πληροφορία για την απάντηση φυλογενετικών/φυλογεωγραφικών ερωτημάτων. Η προσέγγιση αυτή γνωστή ως «reduced representation NGS for genotyping» έχει διάφορες εκφάνσεις (π.χ. Reduced Representation Library, RRL - Genotyping By Sequencing, GBS - Complexity Reduction of Polymorphic Sequences, CRoPS - Multiplex Shotgun Genotyping, MSG), αλλά όλες βασίζονται σε πέψη του γονιδιώματος με περιοριστικά ένζυμα. Σε αυτό το χαρακτηριστικό, η προσέγγιση αυτή είναι παρόμοια με τις τεχνικές RFLPs και AFLPs. Η μέθοδος «Restriction site Associated DNA» (Miller et al., 2007; Baird et al., 2008), γνωστή ως RAD-tag, RAD-Seq (RAD-seq) ή RADSeq (RADseq), είναι και αυτή μια τέτοια έκφανση της παραπάνω προσέγγισης, η οποία χρησιμοποιεί την πλατφόρμα Illumina [αν και ο αρχικός σχεδιασμός έγινε για χρήση σε μικροσυστοιχίες (Miller et al., 2007)] και μπορεί ταυτόχρονα να βρει και να «διαβάσει» δεκάδες έως εκατοντάδες χιλιάδες πολυμορφισμούς νουκλεοτιδικής θέσης - δηλαδή τα λεγόμενα SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται η δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων στο ίδιο «τρέξιμο», το χαμηλό κόστος σε σχέση με την αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος και η μη απαίτηση γονιδιώματος αναφοράς (McCormack et al., 2013). Εκτός από τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, η μέθοδος RADseq χρησιμοποιεί μια άλλη απλή τεχνική Μοριακής Βιολογίας που είναι οι μοριακοί ταυτοποιητές (molecular identifiers, MID) έτσι ώστε να είναι εφικτή η αντιστοίχιση κάθε τμήματος DNA που αλληλουχήθηκε (από εδώ και στο εξής read) με συγκεκριμένα άτομα. Η διαδικασία της μεθόδου RADseq φαίνεται στην Εικόνα 3.1. και περιλαμβάνει μια ακολουθία βημάτων από την πέψη του γονιδιώματος με περιοριστικά ένζυμα έως την τελική αλληλούχιση στην πλατφόρμα Illumina (Davey and Blaxter, 2010).



Εικόνα 3.1. Η διαδικασία της μεθόδου RADseq (Davey and Blaxter, 2010). (A) Πέψη περιοριστικών ενζύμων. (B) Προσθήκη (ligation) του προσαρμογέα P1 που φέρει το μοριακό ταυτοποιητή (MID) και τον εκκινητή (primer) της Illumina. (C) Σημασμένα δείγματα από διαφορετικά άτομα τοποθετούνται στο ίδιο μίγμα και κατακερματίζονται (shear) σε τυχαία θραύσματα. Δεν έχουν όλα τα θραύσματα σήμανση. (D) Προσθήκη του προσαρμογέα P2 που φέρει μη συμπληρωματικά άκρα σε όλα τα θραύσματα. (E) PCR με τους εκκινητές P1 και P2 για την επιμήκυνση μόνο των θραυσμάτων που περιέχουν και τους δύο προσαρμογείς P1 και P2 και εν συνεχεία αλληλούχιση. (F) Διαχωρισμός, βιοπληροφοριακά, των ατόμων βάσει των MID και γονοτύπιση SNPs. (G) Λόγω του τυχαίου κατακερματισμού λαμβάνονται διαφορετικού μήκους τελικά προϊόντα αλληλούχισης.

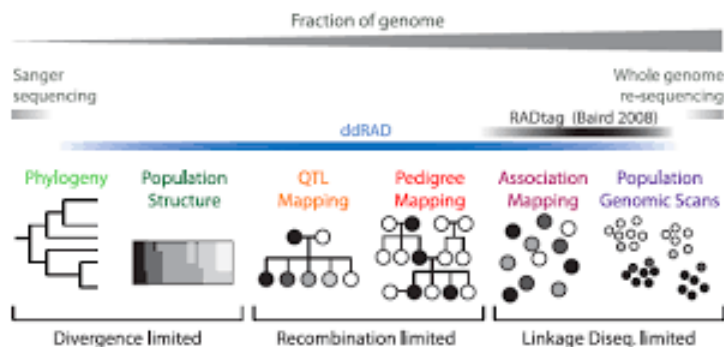
Το ολικό γενωμικό DNA ενός ατόμου πέπτεται με ένα περιοριστικό ένζυμο και δημιουργούνται θραύσματα DNA με μη συμπληρωμένα άκρα (sticky-ends) (Εικ. 3.1A). Για την αλληλούχιση αυτών των τμημάτων πρέπει να προστεθούν προσαρμογείς (adaptors) που θα τα προσδέσει σε κελί ροής (flow cell) της Illumina. Η μέθοδος RADseq χρησιμοποιεί τροποποιημένους προσαρμογείς που επιτρέπουν την πρόσδεση και τον πολλαπλασιασμό μόνο των θραυσμάτων πέψης. Τα sticky-ends άκρα των θραυσμάτων ενώνονται συμπληρωματικά με τα sticky-ends του προσαρμογέα P1 (ligation), ο οποίος περιέχει επίσης και τον μοριακό ταυτοποιητή (MID), μια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία που ταυτοποιεί (tag) μοναδικά το άτομο (Εικ. 3.1B). Διαφορετικά σημασμένα άτομα (έως 12) αναμιγνύονται και κατακερματίζονται τυχαία (sheared) σε ακόμη μικρότερα θραύσματα με μήκος κάποιες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων (Εικ. 3.1C). Μόνο κάποια από αυτά έχουν πλέον σήμανση. Σε όλα τα κατακερματισμένα θραύσματα (σημασμένα και μη) προστίθεται ένας δεύτερος προσαρμογέας (P2), ο οποίος φέρει μη συμπληρωματικά άκρα μορφής «Υ» (Εικ. 3.1D). Στη συνέχεια ακολουθεί αντίδραση PCR με τους εκκινητές (primers) P1 και P2 που είναι συμπληρωματικοί των προσαρμογέων P1 και P2, αντίστοιχα (Εικ. 3.1E). Λόγω της παραπάνω διχαλωτής δομής του προσαρμογέα P2, δεν είναι δυνατή η αναγνώρισή του από τον εκκινητή P2, παρά μόνο εφόσον έχει ολοκληρωθεί μέσω επιμήκυνσης από τον εκκινητή P1. Αυτό αυτόματα σημαίνει ότι θραύσματα που δεν έχουν τον προσαρμογέα P1, δεν έχουν την κατάλληλη θέση πρόσδεσης του εκκινητή P1 και έτσι, εντέλει, δε γίνεται ολοκλήρωση του προσαρμογέα P2 για να δημιουργηθεί η θέση πρόσδεσης του εκκινητή P2. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται ότι όλα τα θραύσματα που πολλαπλασιάζονται και είναι έτοιμα για αλληλούχιση περιέχουν τον προσαρμογέα P1, τον MID, ένα τμήμα ποικιλόμορφης αλληλουχίας και τον προσαρμογέα P2. Αυτό γίνεται για την αποφυγή αλληλούχισης μη σημασμένων θραυσμάτων, μειώνοντας έτσι τον όγκο της άχρηστης πληροφορίας και αυξάνοντας τον αριθμό των reads. Τα έτοιμα για αλληλούχιση θραύσματα περνάνε από διαλογή (size selection) όπου επιλέγονται τα θραύσματα εκείνα που έχουν μήκος περίπου 200 με 500 ζεύγη βάσεων και στη συνέχεια αυτή η έτοιμη «βιβλιοθήκη» RADseq δίνεται

για αλληλούχιση στην πλατφόρμα Illumina. Οι αλληλουχίες δημιουργούνται από το άκρο που περιέχει τον MID και επιμηκώνονται κατά μήκος της κάθε μιας συμπληρωματικής αλυσίδας του θραύσματος. Τελικό βήμα αποτελεί ο διαχωρισμός (demultiplex) με βιοπληροφοριακά μέσα των σημασμένων αλληλουχιών ανά άτομο και εν συνεχεία η γονοτύπωση των SNPs (Εικ. 3.1F). Να σημειωθεί ότι επί του παρόντος, η πλατφόρμα Illumina επιτρέπει την αλληλούχιση περίπου 150 ζ.β., και με βάση τη συμπληρωματικότητα των δύο αλυσίδων λαμβάνεται, εν τέλει, ένα τμήμα γονιδιώματος ~300 ζ.β (λόγω αυτού γίνεται επίσης και διαλογή με βάση το μήκος στο προηγούμενο βήμα). Το τελικό μήκος μπορεί να είναι μικρότερο λόγω του τυχαίου κατακερματισμού σε προηγούμενο βήμα (Εικ. 3.1G).

Ένα από τα αρνητικά χαρακτηριστικά της παραπάνω μεθόδου και γενικά όλης της προσέγγισης «reduced representation NGS for genotyping», όπου απαιτείται η χρήση περιοριστικών ενζύμων, είναι η περίπτωση των «μηδενικών αλληλομόρφων» (null alleles). Αυτά αναφέρονται στις περιπτώσεις όπου μεταλλαγές θέσεων στο σημείο πέψης των περιοριστικών ενζύμων έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια ολόκληρου θραύσματος από μερικά άτομα του πληθυσμού/είδους υπό μελέτης. Το πρόβλημα επικεντρώνεται σε πληθυσμούς όπου υπάρχει ετεροζυγωτία ως προς την ύπαρξη ή όχι της μεταλλαγής θέσης, με αποτέλεσμα την αυξημένη δυσκολία αναγνώρισης των ομοζυγωτικών ατόμων από εκείνα των ετεροζυγωτικών. Η αποτυχία διάκρισής τους, ειδικά σε πληθυσμούς αυξημένης ετεροζυγωτίας, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μη αντικειμενική εξαγωγή συμπερασμάτων φυλογεωγραφικής φύσης (McCormack et al., 2013). Ένα δεύτερο μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι η παραπάνω μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για μελέτη taxa βαθιάς εξελικτικής απόκλισης. Αυτό συμβαίνει διότι μεταλλαγές σε σημεία πέψης περιοριστικών ενζύμων μειώνουν γρήγορα τον αριθμό ομόλογων περιοχών όσο αυξάνεται η εξελικτική απόσταση (Althoff et al., 2007) και ταυτόχρονα, μέθοδοι όπως η RAD-tags βασίζονται στη γονοτύπωση SNPs, κάτι που δεν είναι ιδανικό για τη μελέτη γονιδιακών δέντρων (McCormack et al., 2013). Τροποποιήσεις της παραπάνω μεθόδου φαίνεται να οδηγούν στη λύση αυτού του προβλήματος.

### 2.3.1. Η εναλλακτική μέθοδος ddRADseq

Από την περιγραφή της έως σήμερα η μέθοδος RADseq έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες Εξελικτικής Βιολογίας, ωστόσο ελάχιστες είναι αυτές που σχετίζονται με τη Φυλογένεση και τη Φυλογεωγραφία (π.χ. Emerson et al., 2010). Όπως αναφέρεται παραπάνω, αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι η μέθοδος αυτή περιορίζεται σημαντικά όσον αφορά τη μελέτη εξελικτικών διεργασιών που συμβαίνουν σε μεγάλη χρονική κλίμακα, όπως η ειδογένεση κ.λπ. Για την προσπέλαση αυτού του περιορισμού περιγράφηκε μια εναλλακτική μέθοδος, η οποία αποτελεί τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου RADseq. Η νέα αυτή μέθοδος ονομάζεται «double digest RAD sequencing» ή απλά ddRADseq (Peterson et al., 2012) και η ουσιαστική διαφορά της είναι ότι γίνεται χρήση δύο διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων αντί ενός. Η μέθοδος αυτή έχει σχεδιαστεί με την προοπτική να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτη εξελικτικών διεργασιών σε μεγάλο εύρος χρονικής κλίμακας, καθιστώντας την έτσι πιο ευέλικτη σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο Sanger και τις πιο μοντέρνες όπως η μέθοδος RADseq και η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Αυτή η ευελιξία προέρχεται από το γεγονός ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε να βελτιστοποιηθεί η αλληλούχιση του αναγκαίου αριθμού γενετικών τόπων μιας συγκεκριμένης πειραματικής προσέγγισης ενός δεδομένου βιολογικού συστήματος (Εικ. 3.2) (Peterson et al., 2012).



Εικόνα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση του εύρους γενετικών τόπων που μπορεί να χρησιμοποιήσουν κάποιες από τις διαθέσιμες μέθοδοι αλληλούχισης (Peterson et al., 2012).

Η διαδικασία προετοιμασίας «βιβλιοθήκης» ddRADseq έχει αρκετά κοινά σημεία με την αντίστοιχη της RADseq με βασική διαφορά την αφαίρεση του σταδίου τυχαίου κατακερματισμού (shearing) των σημασμένων θραυσμάτων. Αντί αυτού, γίνεται χρήση δύο περιοριστικών ενζύμων με ταυτόχρονη πέψη. Η χρήση δύο περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορεί να δημιουργήσει πολλές διαφορετικές κατανομές μήκους θραυσμάτων εξαρτώμενες από τη συχνότητα των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων. Ένζυμα με μικρές σε μήκος αλληλουχίες αναγνώρισης (4 ή 6 ζ.β.) κόβουν συχνά, δημιουργώντας έτσι τη δυνατότητα «δειγματοληψίας» μεγαλύτερου ποσοστού του γονιδιώματος σε σχέση με λιγότερο άφθονες αλληλουχίες (8 ζ.β.). Καθώς υπάρχει ανάλογη σχέση μεταξύ του αριθμού μοναδικών θραυσμάτων στην τελική «βιβλιοθήκη» και του αριθμού των απαιτούμενων reads για τον κορεσμό της «βιβλιοθήκης», και καθώς κάθε λωρίδα Illumina δημιουργεί σχετικά σταθερό αριθμό reads, υπάρχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του ποσοστού του γονιδιώματος που γίνεται «δειγματοληψία» και του αριθμού των ατόμων που μπορούν να αλληλουχηθούν στην ίδια λωρίδα. Αυτό πρακτικά μεταφράζεται στο ότι ένα ζευγάρι ενζύμων με συχνές θέσεις πέψης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνει «δειγματοληψία» πολλών γενετικών τόπων σε κάθε άτομο αλλά σε μικρό αριθμό ατόμων, ενώ αντίθετα ένα ζευγάρι ενζύμων που πέπτει σπάνια θα επιτρέψει τη «δειγματοληψία» σε λιγότερους γενετικούς τόπους, αλλά σε περισσότερα άτομα. Συνήθως επιλέγεται ένα «συχνό» και ένα «λιγότερο συχνό» περιοριστικό ένζυμο για ενδιάμεσα αποτελέσματα (Peterson et al., 2012).

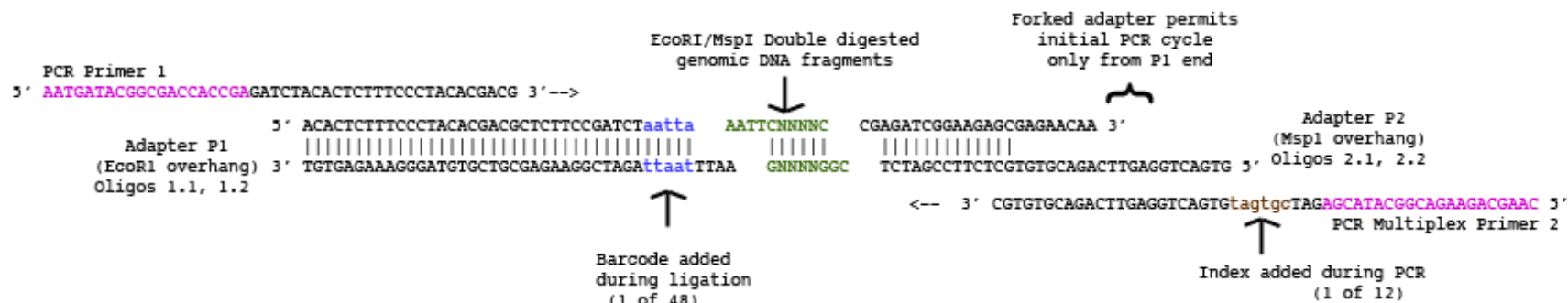
Μια δεύτερη βασική διαφορά μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων είναι ότι σε αυτό της ddRADseq χρησιμοποιείται μια προσέγγιση συνδυαστικής σήμανσης των ατόμων για ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλαπλών ατόμων (multiplex), η οποία περιλαμβάνει δύο ταυτοποιητές: το sequence barcode (αντίστοιχο του MID), το οποίο μπορεί να διαχωρίσει μέχρι και 12 άτομα, είναι ενσωματωμένο στον προσαρμογέα P1 και προστίθεται στη διαδικασία στο δεύτερο βήμα (ligation) μετά την πέψη μαζί με τον κοινό για όλα τα άτομα προσαρμογέα P2, και (β) το Illumina read index, το οποίο βρίσκεται ενσωματωμένο στον εκκινητή (όχι προσαρμογέα) P2 και προστίθεται στη διαδικασία στο

βήμα της PCR. Επειδή η αντίδραση PCR συνήθως γίνεται σε ειδικό δοχείο 96 θέσεων (PCR plate), συνήθως χρησιμοποιούνται 12 διαφορετικοί εκκινητές P2, ώστε τελικά κάθε μία από τις οκτώ κάθετες στήλες να έχει το ίδιο index και κάθε μία από τις οκτώ οριζόντιες γραμμές να έχει το ίδιο barcode, δημιουργώντας, εντέλει, 96 διαφορετικά σημασμένα άτομα. Στην αντίδραση της PCR, λόγω του ότι ο προσαρμογέας P2 είναι διχαλωτός στο ένα άκρο του, στον πρώτο κύκλο γίνεται πρόσδεση μόνο του εκκινητή P1 και μέσω της επιμήκυνσης της αλυσίδας DNA ολοκληρώνεται ο προσαρμογέας P2. Σε αυτόν, από τον επόμενο κύκλο θα μπορεί να προσδεθεί ο εκκινητής P2 και να γίνει επιμήκυνση της αλληλουχίας στόχου και προσθήκη του index. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται αλληλούχιση μόνο των θραυσμάτων που έχουν και barcode και index (Peterson et al., 2012).

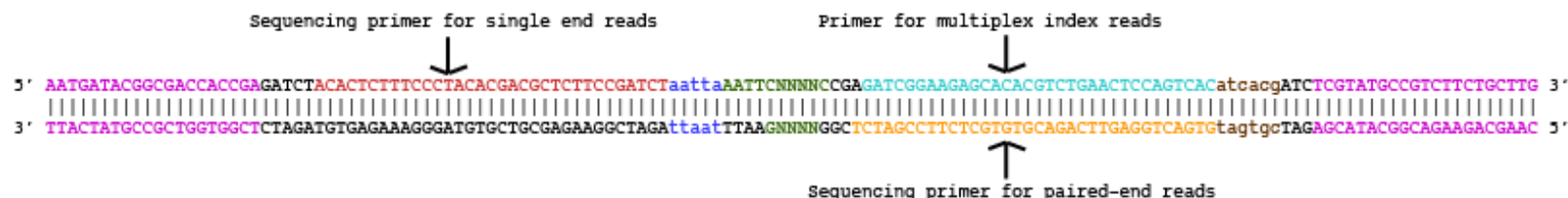
Μια τρίτη βασική διαφορά είναι η ακριβής, επαναλαμβανόμενη χρήση της διαλογής θραυσμάτων βάσει μήκους αλληλουχίας (size selection) για την ανάκτηση του επιθυμητού αριθμού γενετικών τόπων που βρίσκονται διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα. Αυτό συμβαίνει πριν από το στάδιο της PCR και το τελικό αποτέλεσμα στη «βιβλιοθήκη» ddRADseq είναι τα έτοιμα προς αλληλούχιση θραύσματα όχι μόνο να έχουν μοναδικό barcode και index, αλλά και συγκεκριμένο εύρος μήκους. Ένα πλεονέκτημα αυτού είναι η μείωση της πιθανότητας διπλού «διαβάσματος» του ίδιου θραύσματος και από τα δύο άκρα της περιοριστικής θέσης, που σημαίνει μείωση στο μισό των απαιτούμενων reads για καλής στατιστικής υποστήριξης «δειγματοληψία» ενός SNP (Peterson et al., 2012).

Συνοπτικά, τα πρώτα βήματα της διαδικασίας ddRADseq (Εικ. 3.3) περιλαμβάνουν (α) την πέψη του δείγματος ενός ατόμου με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, (β) την προσθήκη (ligation) του προσαρμογέα P1 που φέρει το barcode, και του κοινού προσαρμογέα P2, ο οποίος είναι διχαλωτός στο ένα άκρο, (γ) την τοποθέτηση των 12 ατόμων με διαφορετικό barcode στο ίδιο μίγμα (8 μίγματα), (δ) τη διαλογή θραυσμάτων με βάση το μήκος σε κάθε μίγμα, (ε) την αντίδραση της PCR με τους εκκινητές P1 και P2 (οκτώ διαφορετικοί/οκτώ μίγματα) (στ) την αλληλούχιση Illumina και εν συνεχεία τον διαχωρισμό (demultiplex) των 96 ατόμων με βιοπληροφοριακά μέσα, και τη γονοτύπηση (Peterson et al., 2012).

### Oligos; Adapters; Digested genomic DNA



### Final sequencing library



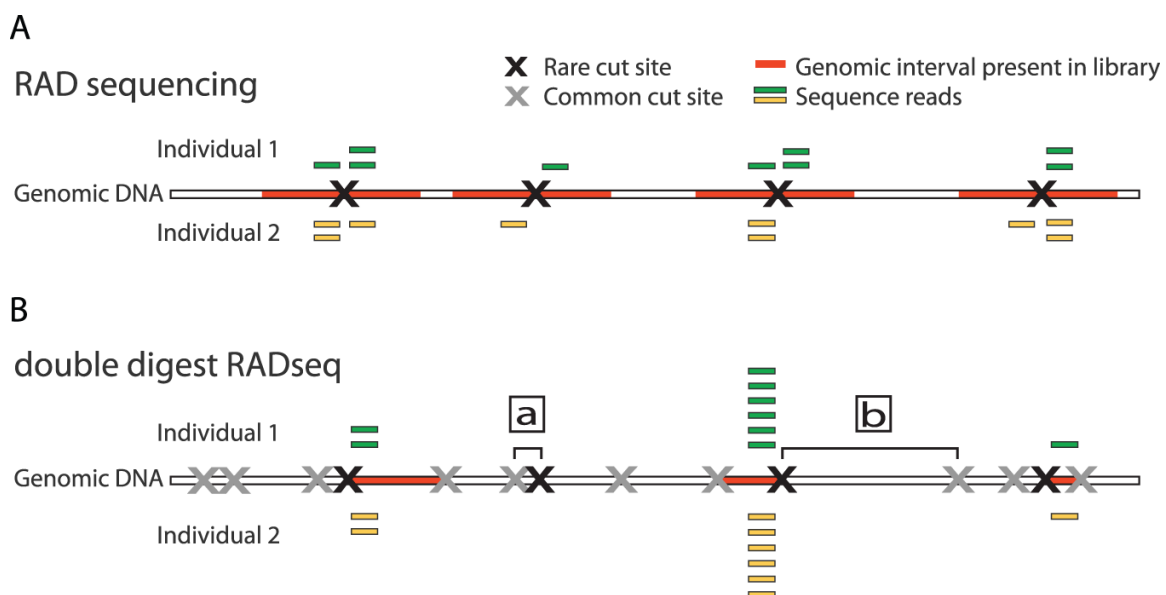
DNA Sequence Legend	
READ 1 primer	(Red)
READ 2 primer	(Orange)
MULTIPLY READ primer	(Cyan)
genomic DNA	(Grey)
barcode (aatta) - inline	(Green)
index (atcaog) - multiplex	(Purple)
flowcell annealing	(Pink)

Εικόνα 3.3. Διαγραμματική απεικόνιση των κύριων στοιχείων δημιουργίας μιας «βιβλιοθήκης» ddRADseq και η τελική μορφή της έτοιμη για αλληλούχηση Illumina (Peterson et al., 2012). Λεπτομέρειες εντός του κειμένου.



Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου ddRADseq έναντι της RADseq συμπεριλαμβάνεται η πολύ καλή αποδοτικότητα με την οποία λειτουργούν τα υπάρχοντα υπολογιστικά εργαλεία ανάλυσης δεδομένων ΕΓΑ. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε δημοσιευμένα παραδείγματα χρήσης της μεθόδου RADseq (π.χ. Emerson et al., 2010) περίπου τα μισά δεδομένα αλληλούχισης απορρίφθηκαν επειδή η ανάλυση δεν μπορούσε να διαχειριστεί σωστά τα πιθανά λάθη στα reads, ενώ ένα επιπλέον ~30-50% των γενετικών τόπων δεν χρησιμοποιήθηκαν λόγω της ύπαρξης περισσότερων των 1-3 πολυμορφικών θέσεων σε κάθε τόπο (Peterson et al., 2012).

Τέλος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4, ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου ddRADseq σχετίζεται με το βήμα της ακριβούς, επαναληπτικής διαλογής θραυσμάτων βάσει μήκους. Στη μέθοδο RADseq λόγω του μεγάλου εύρους διαλογής δημιουργούνται «βιβλιοθήκες» αποτελούμενες από όλες τις γειτνιαζουσες περιοχές της περιοριστικής θέσης, με πιθανή έλλειψη ομολογίας μεταξύ ατόμων. Αντίθετα στη μέθοδο ddRADseq, η διαλογή απορρίπτει τα θραύσματα που βρίσκονται είτε πολύ κοντά είτε πολύ μακριά από τη θέση κοπής των δύο ενζύμων, με αποτέλεσμα η «βιβλιοθήκη» να περιέχει θραύσματα μεγάλης ομολογίας μεταξύ ατόμων (Peterson et al., 2012).



Εικόνα 3.4. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ των μεθόδων RADseq και ddRADseq (Peterson et al., 2012). Λεπτομέρειες εντός του κειμένου.

## 2.4. Παραδείγματα ddRADseq φυλογενωμικών μελετών σε σαύρες

Παρά τις υψηλές προσδοκίες η ενσωμάτωση της τεχνολογίας ΝΓΑ στη Φυλογένεση και τη Φυλογεωγραφία άργησε να γίνει για τους λόγους που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Κάποιες από τις πρώτες εργασίες με βάση τη μέθοδο RADseq που σχετιζόνταν με τη φυλογεωγραφία κουνουπιών (Emerson et al., 2010) και μικροθηλαστικών (Jezkova et al., 2015) ύστερα από την τελευταία παγετώδη περίοδο ανέδειξαν τη δυναμική αυτού του τύπου μεθόδων αλλά και τους περιορισμούς που έχει η μέθοδος RADseq.

Από την περιγραφή της μεθόδου ddRADseq από τους Peterson et al. (2012) και μέχρι σήμερα δεν είναι πολλές οι φυλογενωμικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο. Για παράδειγμα, τρεις από αυτές, εστιαζόμενες σε σαύρες (Leaché et al., 2015), νυχτερίδες (Chattopadhyay et al., 2016) και πουλιά (DaCosta and Sorenson, 2016), έφτασαν στο κοινό συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μια φθηνή (αναλογικά με τον όγκο των δεδομένων) μέθοδο για την παραγωγή απόλυτα πληροφοριακών φυλογενετικών δέντρων και ενδείκνυται ειδικά για αναλύσεις στενά συγγενικών ειδών και γενών που δεν αποτελούν απαραίτητα οργανισμούς-μοντέλα. Ο αριθμός αντίστοιχων μελετών μόνο για ερπετά είναι ακόμα μικρότερος με παραδείγματα να αποτελούν πρόσφατες μελέτες πάνω σε βόδες (Card et al., 2016), οχιές (Zinenko et al., 2016), σαύρες της οικογένειας Phrynosomatidae (Leaché et al., 2015) και σαύρες του γένους *Tribolonotus* (Rittmeyer and Austin, 2015), με την τελευταία να αποτελεί περισσότερο μελέτη πληθυσμιακής γενετικής.

Στη μοναδική μέχρι σήμερα καθαρά φυλογενωμική μελέτη σαυρών βάσει ddRADseq (Leaché et al., 2015) έγινε και σύγκριση με μια άλλη φυλογενωμική μέθοδο που ονομάζεται «Σύλληψη Αλληλουχίας» (Sequence Capture) (Gnirke et al., 2009; Mamanova et al., 2010). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτίδια που υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένες γενωμικές περιοχές, στις οποίες στη συνέχεια γίνεται

αλληλούχηση. Χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι απαραίτητη η *a priori* γνώση των συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος και ότι χρησιμοποιούνται πολύ συντηρημένες περιοχές (ultraconserved elements, UCEs) του γονιδιώματος. Τα χαρακτηριστικά των δύο μεθόδων τις κάνουν κατάλληλες για μελέτες διαφορετικής χρονικής κλίμακας, με τη μέθοδο ddRADseq να χρησιμοποιείται για αποκλίσεις ειδών έως τα 50-60 εκατομμύρια χρόνια πριν και τη μέθοδο Σύλληψης Αλληλουχίας για επίλυση πολύ βαθιών αποκλίσεων (Faircloth et al., 2012). Ακολουθώντας και τις δύο μεθόδους και χρησιμοποιώντας σαύρες της αμερικάνικης οικογένειας Phrynosomatidae, η μελέτη κατέληξε σε μια σχεδόν επιλυμένη φυλογένεση, την τοπολογία της οποίας υποστήριζαν και οι δύο μέθοδοι, με τη διαφορά ότι στη μέθοδο ddRADseq τα μήκη των εσωτερικών κλάδων ήταν πολύ μικρά, με αποτέλεσμα την ύπαρξη αντικρουόμενων τοπολογιών από την επιλογή διαφορετικών παραμέτρων καθορισμού ομολογίας, ανίχνευσης παραλογιών και φιλτραρίσματος δεδομένων (missing data) στα διάφορα βιοπληροφοριακά στάδια.

## 2.5. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου

Ο στόχος του παρόντος κεφαλαίου είναι παρόμοιος με αυτόν του Δεύτερου Κεφαλαίου με τη διαφορά ότι ως μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται γενωμικά δεδομένα τύπου ddRADseq και ότι, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα από το προηγούμενο κεφάλαιο, επιλέχθηκαν αντιπρόσωποι των κύριων εξελικτικών γραμμών. Έτσι, κάνοντας χρήση διαφορετικού τύπου δεδομένων και επιλέγοντας ένα πληροφοριακό υποσύνολο δεδομένων γίνεται μια προσπάθεια επίτευξης δύο παρόμοιων στόχων με το προηγούμενο κεφάλαιο: (α) την επίλυση της φυλογένεσης των βαλκανικών *Podarcis* σε επίπεδο υποομάδων και ομάδων ειδών, και (β) την επίλυση της φυλογένεσης της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» και των φυλογενετικών υποκλάδων του *P. t. ionicus*.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Δείγματα και εξαγωγή DNA

Για τις γενωμικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το Σύνολο Δειγμάτων III (119 δείγματα, Παράρτημα II), το οποίο αποτελείται από αντιπροσώπους των κύριων φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων των βαλκανικών *Podarcis*, όπως αυτοί εκτιμήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Απαραίτητη προϋπόθεση για την προετοιμασία «βιβλιοθήκης» ddRADseq και την αλληλούχηση Illumina αποτελεί τα δείγματα εξαγωγής ολικού DNA να είναι υψηλής ποιότητας, δηλαδή να έχουν μεγάλο μοριακό βάρος χωρίς ταυτόχρονα να είναι κατακερματισμένα σε μικρά θραύσματα (< 400 ζ.β.). Για τον λόγο αυτόν, ολικό γενωμικό DNA απομονώθηκε από μυ, σκώτι ή αίμα δειγμάτων, τα οποία διατηρούνταν είτε στους -80 °C, είτε σε RNA Later, είτε σε αιθανόλη 96%, χρησιμοποιώντας το πακέτο αντιδραστηρίων εξαγωγής DNA ονόματι DNeasy Blood & Tissue Extraction kit (Qiagen®, Hilden, Germany). Στη συνέχεια γινόταν πιστοποίηση της ποιότητας του DNA με δύο τρόπους: (α) ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε TAE gel αгарόζης 1,5%, κατά την οποία ιδανική περίπτωση αποτελούσε η ύπαρξη μιας ζώνης DNA μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς την ένδειξη ύπαρξης κατακερματισμένου DNA (smear), και (β) ποσοτικά με ποσοτικοποίηση του DNA χρησιμοποιώντας τη συσκευή Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®, Carlsbad, California, USA), κατά την οποία στόχος ήταν τα δείγματα να έχουν την απαραίτητη συγκέντρωση και όγκο ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν 500 ng (0,5 μg) σε 43 μl (αυτός ο αριθμός οφείλεται στην αντίδραση πέψης με ενδονουκλεάσες των 50 μl, όπου 7 μl είναι τα αντιδραστήρια) που απαιτεί το πρωτόκολλο. Για την επιλογή κατάλληλου όγκου είτε γινόταν αραιώση του αρχικού διαλύματος στις περιπτώσεις που υπήρχε περίσσεια DNA είτε γινόταν συμπύκνωση με τη συσκευή κενού αέρος Vacufuge® (Eppendorf®, Hamburg, Germany) στις περιπτώσεις που υπήρχε έλλειψη επαρκούς ποσότητας DNA αλλά ταυτόχρονα περίσσεια όγκου. Σε περίπτωση που ένα δείγμα απορριπτόταν, ακολουθούσε νέα εξαγωγή DNA είτε από το ίδιο, είτε από άλλο άτομο του ίδιου πληθυσμού. Συνολικά,

έγινε εξαγωγή DNA σε 241 άτομα *Podarcis* (μαζί με τα δείγματα των εξωομάδων *Lacerta trilineata* και *Hellenolacerta graeca*), από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα 120 που αντιστοιχούν στο Σύνολο Δεδομένων III.

### 3.2. Προετοιμασία «βιβλιοθήκης» ddRADseq και αλληλούχηση Illumina

Για την προετοιμασία «βιβλιοθηκών» ddRADseq\* ακολουθήθηκαν τα βήματα που περιγράφονται αναλυτικά στην εργασία των Peterson et al. (2012). Ακολουθούν συνοπτικά τα βήματα για «βιβλιοθήκη» 96 ατόμων (μία πλάκα PCR) και οι επιλογές, χειρισμοί και τροποποιήσεις που έγιναν στην παρούσα διατριβή:

1. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα (20 units ανά αντίδραση). Επιλέχθηκαν τα SbfI (5'-CCTGCAGG-3') και MspI (5'-CCGG-3') των 20.000 units/mL (Leaché et al., 2015), ενώ για ρυθμιστικό διάλυμα πέψης χρησιμοποιήθηκε το CutSmart 10x Buffer (New England Biolabs). Η διαδικασία πέψης έγινε με overnight επώαση στους 37 °C, χωρίς να γίνει θερμική απενεργοποίηση των ενζύμων (heatkill). Η επιτυχία της πέψης και η διάκριση μεταξύ πέψης και κατακερατισμένου DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε TAE gel αгарόζης 1,5% κάνοντας σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων στα οποία έγινε πέψη και των αρχικών DNA εξαγωγών τους και βαθμονομημένου μάρτυρα (100bp ladder).

2. Αναδιευθέτηση δειγμάτων. Αφού προηγηθεί βήμα καθαρισμού με μαγνητικά σφαιρίδια (magnetic beads) Agencourt AMPure σε συγκέντρωση 2,5x ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, γίνεται εκ νέου ποσοτικοποίηση με τη συσκευή Qubit, ακολουθώντας και εδώ τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με βάση τα αποτελέσματα της μέτρησης της συγκέντρωσης DNA, γίνεται αναδιευθέτηση των δειγμάτων στην πλάκα PCR με αύξουσα σειρά (1A, 1B, ..., 12G, 12H). Αυτό γίνεται ώστε

---

\* Η προετοιμασία πραγματοποιήθηκε ανά ομάδες δειγμάτων α) στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης, β) στο Department of Ecology & Evolutionary Biology, Yale University, Connecticut, U.S.A.

σε επόμενο βήμα, όπου ενώνονται δείγματα με διαφορετικό sequence barcode στο ίδιο διάλυμα, να μην υπάρχει υπερκερασμός ποσοτικά κάποιου δείγματος έναντι άλλου.

3. Δημιουργία και προσθήκη προσαγωγέων (adapter ligation). Οι προσαγωγείς σχεδιάστηκαν (Peterson et al., 2012) έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί με τα sticky end άκρα των θραυσμάτων που δημιουργήθηκαν από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SbfI και MspI. Οι προσαρμογείς P1 που φέρουν το sequence barcode (οκτώ προσαρμογείς με τα αντίστοιχα μοναδικά sequence barcodes) είναι συμπληρωματικοί με τον SbfI που «κόβει» λιγότερο συχνά, ενώ ο προσαρμογέας P2 είναι συμπληρωματικός με τον MspI που είναι συχνός και φέρει στο άλλο άκρο του μια δομή διχάλας (για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή του κεφαλαίου). Ο κάθε προσαρμογέας αποτελείται από δύο κατάλληλα σχεδιασμένες, μερικώς συμπληρωματικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (oligos) ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα συμπληρωματικά άκρα με τα ένζυμα περιορισμού και η κατάλληλη δομή διχάλας. Η συγκόλληση των oligos προς δημιουργία των προσαρμογέων γίνεται σε αναλογία 1:1, κάνοντας χρήση annealing buffer και με επώαση στους 97,5 °C για 2,5 λεπτά και βαθμιαία ψύξη 3 °C ανά λεπτό μέχρι τη θερμοκρασία των 21 °C. Για την επιτυχή συγκόλληση των προσαρμογέων στα θραύσματα χρησιμοποιείται τουλάχιστον δεκαπλάσια ποσότητα προσαρμογέων σε σχέση με την ποσότητα των θραυσμάτων. Κάθε οριζόντια σειρά της πλάκας PCR αντιστοιχίζεται και με διαφορετικό προσαρμογέα P1, άρα και διαφορετικό sequence barcode. Η συγκόλληση γίνεται χρησιμοποιώντας το ένζυμο T4 DNA λιγάση και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα 10X ligase buffer, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά, θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου (heatkill) με επώαση στους 65 °C για 10 λεπτά και σταδιακή ψύξη 2 °C ανά 90 δευτερόλεπτα μέχρι τη θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

4. Ένωση δειγμάτων (Pooling) με διαφορετικό sequence barcode. Σε αυτό το βήμα γίνεται ένωση των δειγμάτων κάθε στήλης της πλάκας PCR και δημιουργία 12 διαλυμάτων (pools). Στη συνέχεια αυτά περνούν σε άλλο ένα διπλό στάδιο καθαρισμού με μαγνητικά σφαιρίδια (Agencourt AMPure).

5. Διαλογή θραυσμάτων βάσει μεγέθους (Size Selection). Η διαλογή θραυσμάτων σε κάθε ένα από τα 12 pools έγινε αυτόματα χρησιμοποιώντας τη συσκευή Pippin® (Sage Science®, Beverly, MA, USA) και τα αντιδραστήριά της (elution buffer, cassettes, R2 loading solution) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως «παράθυρο» επιλογής θραυσμάτων επιλέχθηκε το εύρος 415 - 515 ζ.β. (Leaché et al., 2015), ενώ το τελικό διάλυμα ποσοτικοποιήθηκε με χρήση της συσκευής Qubit.

6. Αντίδραση PCR. Σε αυτό το βήμα προστίθενται τα μοναδικά Illumina indices χρησιμοποιώντας 12 διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών, όπου ο εκκινητής P2 περιέχει το index και ο εκκινητής P2 είναι κοινός. Αυτό όπως αναφέρθηκε γίνεται ώστε σε ένα «τρέξιμο» αλληλούχισης Illumina να αναλυθούν 96 διαφορετικά άτομα (8 sequence barcodes × 12 Illumina indices). Για την αντίδραση PCR τελικού όγκου 50 μl χρησιμοποιήθηκε το πακέτο αντιδραστηρίων Phusion® Polymerase kit (New England BioLabs®, Ipswich, MA, USA). Οι συνθήκες ήταν οι ακόλουθες: αρχικό βήμα στους 98 °C για 30 δευτερόλεπτα, δεύτερο βήμα 11 κύκλων και τριών σταδίων που αποτελείται από αποδιάταξη αλυσίδων DNA στους 98 °C για 10 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 58 °C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα και τέλος ένα επιπλέον βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά και παραμονή στους 12 °C. Την αντίδραση PCR ακολούθησε άλλο ένα στάδιο καθαρισμού με μαγνητικά σφαιρίδια (Agencourt AMPure) και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του προϊόντος με χρήση της συσκευής Qubit.

7. Τελική Ποσοτικοποίηση. Πριν από την αλληλούχιση Illumina χρειάζεται η πληροφορία σχετικά με το πόσο DNA και τι μέγεθος θραυσμάτων περιέχει το κάθε pool. Αυτό γίνεται αυτόματα κάνοντας χρήση της συσκευής Agilent 2100 Bioanalyser® ή 2200 TapeStation® (Agilent Technologies®, Santa Clara, California, USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το αποτέλεσμα μας δείχνει τόσο τη συγκέντρωση του DNA όσο και την κατανομή του μεγέθους των θραυσμάτων. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση με qPCR έτσι ώστε να καθοριστούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις της «βιβλιοθήκης» προς αλληλούχιση. Τέλος ενώθηκαν ισοποσα σε ένα διάλυμα όλα τα pool και δημιουργήθηκε η «βιβλιοθήκη» έτοιμη για αλληλούχιση Illumina.

8. Αλληλούχηση Illumina. Η Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς έγινε χρησιμοποιώντας τη συσκευή αλληλούχησης Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, California, USA) με το τελικό μήκος του προϊόντος να είναι 100 ζ.β. και κάνοντας αλληλούχηση μόνο της μιας αλυσίδας DNA (single-end). Η αλληλούχηση 96 ατόμων έγινε στις εγκαταστάσεις QB3 του πανεπιστημίου Berkeley (Washington, USA), ενώ η αλληλούχηση 24 ακόμη ατόμων, μαζί με άλλα δείγματα (του προγράμματος EcoGenoDiv) έγινε στο πανεπιστήμιο Yale (Connecticut, USA).

### 3.3. Φιλτράρισμα, διαχωρισμός ατόμων, γονοτύπιση και στοίχιση θραυσμάτων ddRADseq

Η επεξεργασία των ανακτηθέντων θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού pyRAD (v. 3.0, Eaton, 2014). Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα του λογισμικού αυτού έναντι άλλων εργαλείων χειρισμού δεδομένων RADseq, όπως για παράδειγμα το λογισμικό Stacks (Catchen et al., 2013), αποτελεί η επιπλέον δυνατότητα νουκλεοτιδικής στοίχισης δεδομένων απομακρυσμένων ειδών χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο τύπου «global alignment clustering», ο οποίος επιτρέπει την ύπαρξη ποικιλομορφίας λόγω μίας ή διαδοχικών κενών θέσεων στα στοιχισμένα δεδομένα. Ο διαχωρισμός (demultiplex) των δειγμάτων έγινε κάνοντας χρήση των μοναδικών sequence barcodes και Illumina indices, ενώ στο βήμα του αρχικού φιλτραρίσματος κάνοντας χρήση του ποιοτικού δείκτη Phred, οι νουκλεοτιδικές θέσεις με τιμή <20 μετατράπηκαν σε ακαθόριστη βάση (χαρακτήρας N) και τα θραύσματα με  $\geq 14$  N απορρίφθηκαν. Κάθε τόπος μειώθηκε σε μήκος κατά έντεκα θέσεις μετά την αφαίρεση των sequence barcodes και της δομής διχάλας νουκλεοτιδίων (overhang). Τα φιλτραρισμένα θραύσματα ομαδοποιήθηκαν με βάση το λογισμικό VSEARCH v. 2.01 (<https://github.com/torognes/vsearch>) και στοιχήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού MUSCLE (Edgar, 2004). Σε αυτό το βήμα στοίχισης καθορίζεται η ομολογία μεταξύ των θραυσμάτων για κάθε άτομο. Η τιμή που επιλέχθηκε ήταν clustering = 90% και ουσιαστικά αποτελεί την κατώτερη τιμή ομοιότητας που επιτρέπεται να έχουν οι



αλληλουχίες ενός τόπου για να εξακολουθεί να θεωρείται ένας τόπος. Ως επιπλέον βήμα φιλτραρίσματος αφαιρέθηκαν οι «consensus» αλληλουχίες τόπων που αποτελούνταν από μικρό αριθμό θραυσμάτων\* (depth coverage<6), περίσσεια ακαθόριστων ή ετερόζυγων θέσεων (>5) ή πολλούς απλότυπους (>2 για διπλοειδία). Στη συνέχεια, οι «consensus» αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους χρησιμοποιώντας το ίδιο όριο ομοιότητας με το προηγούμενο βήμα (90%). Ουσιαστικά, σε αυτό το βήμα καθορίζεται η ομολογία μεταξύ των ατόμων. Κάθε τόπος στοιχήθηκε με το λογισμικό MUSCLE και χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο για τον αποκλεισμό πιθανά παράλογων θέσεων, με την απόρριψη τόπων που χαρακτηρίζονται από περίσσεια κοινής ετεροζυγωτίας μεταξύ ατόμων. Αυτό βασίζεται στη θεώρηση ότι κοινά ετεροζυγωτικά SNPs μεταξύ ατόμων είναι πιο πιθανό να αντιπροσωπεύουν μια εγκαθιδρυμένη διαφορά μεταξύ παράλογων θέσεων αντί πραγματική κοινή ετεροζυγωτία εντός ομόλογων θέσεων μεταξύ ατόμων. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ένα φίλτρο που επιτρέπει το πολύ τρία άτομα να είναι ετερόζυγα σε μία συγκεκριμένη θέση (paralog = 3). Οι τελικοί ddRADseq γενετικοί τόποι στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας την τιμή «MinCon=4», η οποία καθορίζει τον ελάχιστο αριθμό ατόμων που απαιτείται να έχει δεδομένα παρόντα σε έναν τόπο ώστε να γίνει χρήση αυτού του τόπου στην τελική μήτρα δεδομένων.

Επόμενο βήμα μετά την παραπάνω επεξεργασία των δεδομένων με το λογισμικό pyRAD ήταν το περαιτέρω φιλτράρισμα ώστε να πραγματοποιηθούν σωστά οι φυλογενετικές αναλύσεις της ενότητας που ακολουθεί. Στόχος ήταν να μειωθεί ο όγκος της ακαθόριστης πληροφορίας (missing data) και της μη χρήσιμης πληροφορίας όσον αφορά τη φυλογενετική συμπερασματολογία (phylogenetic inference). Έτσι, πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση τω πανομοιότυπων αλληλουχιών ανά γενετικό τόπο και εφαρμόστηκαν δύο φίλτρα ώστε να χρησιμοποιηθεί ο ελάχιστος αριθμός πληροφοριακών (informative) και ποικιλόμορφων (variable) θέσεων που είναι ικανός να διαχωρίσει

---

\* ο απαιτούμενος αριθμός πανομοιότυπων θραυσμάτων που ανακτήθηκαν για ένα συγκεκριμένο τόπο ώστε να θεωρηθεί έγκυρο το θραύσμα και ότι δεν αποτελεί τυχαίο «διάβασμα».

φυλογενετικά ένα συγκεκριμένο ελάχιστο αριθμό αλληλουχιών ανά τόπο (min\_taxa). Η παράμετρος αυτή εξετάστηκε για ένα εύρος επτά διαφορετικών τιμών (4\*, 9, 14, 18, 22, 26 και 29) που είχαν ως αποτέλεσμα ο αριθμός των γενετικών τόπων να διαφέρει στο μισό μεταξύ δύο διαδοχικών τιμών (ως ελάχιστος αριθμός ορίστηκε οι 100 γενετικοί τόποι).

---

\* Ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός αλληλουχιών ώστε να δημιουργείται ένα φυλογενετικό δέντρο είναι τρεις, ενώ για να είναι εφικτή η επίλυση της φυλογένεσής του είναι τέσσερις.

### 3.4. Φυλογενωμικές αναλύσεις

Οι τελικές αναλύσεις\* για την κατασκευή φυλογενωμικών δέντρων πραγματοποιήθηκαν αφού έγινε ο έλεγχος της επιρροής της παραμέτρου *min\_taxa* στη φυλογένεση. Ο έλεγχος έγινε κάνοντας χρήση των επτά διαφορετικών συνόλων δεδομένων (αποτέλεσμα των επτά διαφορετικών τιμών *min\_taxa*) και μέσω της κατασκευής φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο Maximum Likelihood και τη στατιστική σύγκριση της τοπολογίας τους. Η κατασκευή των δέντρων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ExaML (Kozlov et al., 2015) και η σύγκρισή τους έγινε με βάση το δείκτη RF distance, ο οποίος υπολογίστηκε κάνοντας χρήση του λογισμικού RAxML (v.8.1.21, Stamatakis, 2014). Για κάθε ένα από τα επτά σύνολα δεδομένων η ανάλυση ExaML πραγματοποιήθηκε 100 φορές (100 starting trees), εφαρμόζοντας το μοντέλο εξέλιξης Generalized time-reversible + gamma (+G) και το δέντρο με τη μέγιστη πιθανοφάνεια (best scoring tree) επιλέχθηκε για τη σύγκριση μεταξύ των συνόλων δεδομένων (σύγκριση μεταξύ επτά best scoring trees). Επιπλέον έγινε σύγκριση των 100 δέντρων εντός κάθε συνόλου για να ελεγχθεί η επιρροή του αρχικού δέντρου (starting tree) στην κατασκευή του ML δέντρου. Για το τελικό σύνολο δεδομένων που επιλέχθηκε έγινε στατιστικός έλεγχος με ταχείς ψευδο-επαναλήψεις bootstrap (rapid bootstrap) υπό το εξελικτικό μοντέλο GTRCAT. Ο απαιτούμενος αριθμός των επαναλήψεων υπολογίστηκε αυτόματα (επιλογή autoMRE).

Χρησιμοποιώντας το σύνολο δεδομένων που ήταν αποτέλεσμα της καταλληλότερης τιμής *min\_taxa*, έγινε επιπλέον κατασκευή δέντρου με βάση τη μέθοδο Bayesian Inference. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό ExaBayes (Aberer et al., 2014) υπό του μοντέλου GTR + G, κάνοντας δύο «τρεξίματα» (runs), στο κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ανεξάρτητες «αλυσίδες αναζήτησης» (chains) και

---

\* Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές συστοιχίες υπολογιστών των εγκαταστάσεων του Heidelberg Institute of Theoretical Studies, Heidelberg, Germany. Οι αναλύσεις ML έγιναν στον cluster magny (112 nodes, 1792 cores), ενώ οι αναλύσεις BI έγιναν στον cluster 109 (48 cores).

τουλάχιστον 500.000 «βήματα αναζήτησης/γενιές» (generations), ενώ αποθήκευση δέντρου γινόταν ανά 500 «γενιές». Επιπλέον εφαρμόστηκε το τεστ σύγκλισης ASDSF (όριο 3,50%), το οποίο μετά τις 500.000 «γενιές» εξετάζει αν οι «αλυσίδες» έχουν φτάσει σε κατάσταση σταθερότητας γύρω από μια τιμή πιθανοφάνειας. Στην περίπτωση που κάτι τέτοιο δεν έχει επιτευχθεί, η ανάλυση συνεχίζει έως ότου αυτό πραγματοποιηθεί. Επίσης, το 25% των αρχικών εκτιμώμενων δέντρων απορρίφθηκε (burn-in). Το τελικό BI δέντρο (majority rule consensus tree) παρήχθη από την εκ των υστέρων κατανομή των παραγόμενων βέλτιστων δέντρων, ενώ για την στατιστική υποστήριξη της τοπολογίας χρησιμοποιήθηκαν οι εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities), οι οποίες υπολογίστηκαν ως το ποσοστό δειγμάτων (δέντρων) που έφερε μια συγκεκριμένη τοπολογία. Τιμές άνω του 95% υποδεικνύουν στατιστική σημαντικότητα.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος mPTP (Karli et al., 2016) για την εύρεση του αριθμού διακριτών μονάδων (entities) εντός του φυλογενωμικού δέντρου. Χρησιμοποιήθηκε η επιλογή «multi rate» και χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο διαθέσιμες φυλογενετικές μέθοδοι, ML και BI, με την τελευταία να «τρέχει» τέσσερις ανεξάρτητες φορές για  $10^7$  «γενιές» με 25% περίοδο burn-in.

Ορίζοντας ως «είδη» κάθε έναν από τους κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους του φυλογενωμικού δέντρου των ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*» πραγματοποιήθηκε η ανάλυση SVDquartets (Chifman and Kubatko, 2014), η οποία είναι ενσωματωμένη στο πρόγραμμα PAUP (v.4.0.a150, Swofford, 2002), με σκοπό την κατασκευή δέντρου των ειδών (species tree). Αυτή η μέθοδος κάνει εκτίμηση των σχέσεων μεταξύ τετράδων (quartets) αλληλουχιών χρησιμοποιώντας ένα coalescent μοντέλο και στη συνέχεια δημιουργεί το δέντρο των ειδών, το οποίο όμως δεν περιέχει μήκη κλάδων. Χρησιμοποιήθηκαν όλες οι πιθανές τετράδες και επιπλέον έγινε μη παραμετρικός έλεγχος bootstrap 100 επαναλήψεων.

Τέλος, χρησιμοποιώντας την ίδια ομαδοποίηση σε «είδη» πραγματοποιήθηκε επιπλέον η «Διακριτική Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών, Discriminant Analysis of Principal Components, DAPC» (Jombart et al., 2010) κάνοντας χρήση της πληροφορίας

των biallelic SNPs δεδομένων. Αυτή η πολυπαραγοντική διακρινούσα μέθοδος εφαρμόστηκε με τη βοήθεια του πακέτου adegenet (v. 1.3.1, Jombart and Ahmed, 2011), εντός του πλατφόρμας R ©, κρατώντας 11 PC (στις οδηγίες του λογισμικού προτείνεται η χρήση  $<1/3$  του αριθμού των δειγμάτων -στην περίπτωση μας 36- για αποφυγή μη αξιόπιστων αποτελεσμάτων) από τις 100 που έγινε προσομοίωση.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Αποτελέσματα αλληλούχισης Illumina και εφαρμογής παραμέτρων

Συνολικά ανακτήθηκαν 115.074.553 καλής ποιότητας θραύσματα (reads) με μέσο όρο 967.013 ανά δείγμα και εύρος 41.313 – 6.663.197. Ο όγκος των δεδομένων που ανακτήθηκαν είναι κατά εκατοντάδες φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των γενετικών δεδομένων που παράγονται με συμβατικές μεθόδους. Ο αριθμός των γενετικών τόπων που προσδιορίστηκαν ανά άτομο διαφέρει τόσο μεταξύ των ατόμων όσο και ανάλογα με τις ρυθμίσεις που επιλέχθηκαν κατά την εφαρμογή των πρώτων βημάτων του προγράμματος PyRAD. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι υπήρχαν άτομα στα οποία προσδιορίστηκαν έως και 11.346 γενετικοί τόποι, ωστόσο κατά μέσο όρο προσδιορίστηκαν 4.692 γενετικοί τόποι, με κάθε τόπο να περιέχει τουλάχιστον ένα SNP.

Το φιλτράρισμα των δεδομένων είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των γενετικών τόπων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των φυλογενετικών αναλύσεων. Ο συνολικός αριθμός των γενετικών τόπων με δεδομένα για τουλάχιστον τέσσερα άτομα (MinCov=4) ήταν 44.086, ενώ ύστερα από την εφαρμογή του φίλτρου paralogs=3 ο αριθμός τους μειώθηκε σε 38.948. Τέλος, μετά την εφαρμογή του φίλτρου min\_taxa=9 παρέμειναν 4.100 γενετικοί τόποι. Το τελικό σύνολο δεδομένων αποτελούταν από 369.167 στοιχισμένες νουκλεοτιδικές θέσεις.

## 4.2. Οι φυλογενωμικές σχέσεις εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*»

Στον Πίνακα 3.1 φαίνεται ο αριθμός των γενετικών τόπων και των νουκλεοτιδικών θέσεων που παρέμειναν σε κάθε περίπτωση μετά την εφαρμογή των επτά τιμών της παραμέτρου *min\_taxa*. Επίσης, δηλώνεται ο αριθμός των διαφορετικών δέντρων από το σύνολο των *resulting trees* για κάθε σύνολο δεδομένων και η αντίστοιχη μέση σχετική τιμή RF distance. Επιπλέον, παρουσιάζεται η μέση σχετική τιμή RF distance των επτά διαφορετικών *best scoring* δέντρων, αλλά και επιλεγμένων συνδυασμών τους.

Η ανάλυση ML (*min\_taxa*=9) είχε ως τελικό αποτέλεσμα μία τοπολογία (Εικ. 3.5) με τιμή  $\ln L = -917.698,21$  (τελικές εκτιμήσεις παραμέτρων: συχνότητα βάσεων A=0,26, C=0,26, G=0,14, T=0,34, shape value (a)=0,25, A/C=1,35, A/G=6,03, A/T=0,94, C/G=0,25, C/T=11,08 και G/T=1). Η ανάλυση BI ύστερα από περίπου >2.000.000 «γενιές» που απαιτήθηκαν για τη σύγκλιση των δύο ανεξάρτητων αναλύσεων κατέληξε στην τοπολογία με μέση τιμή  $\ln L = -917.815,79$  και τιμές ESS>1.223. Πανομοιότητες τοπολογίες ανακτήθηκαν από κάθε ένα από τα δύο «τρεξίματα» και το τελικό BI δέντρο (*extended majority-rule consensus tree*) εκτιμήθηκε από τα τελικά 8.000 δέντρα.

**Πίνακας 3.1.** Αποτελέσματα της εφαρμογής του φίλτρου *min\_taxa* και σύγκριση των δέντρων (*resulting / best scoring*) της ανάλυσης ML.

<i>min_taxa</i>	$N_{loci}^a$	$N_{sites}^b$	$N_{res}^c$	$RF_{res}^d$	$RF_{score}^e$ (all)	$RF_{score}$ (4 first)	$RF_{score}$ (3 first)
4	8.000	710.754	62	0,097			
9	4.100	369.167	45	0,082			0,256
14	2.170	196.412	55	0,098		0,277	
18	1.088	97.209	54	0,108	0,451		
22	556	49.005	86	0,140			
26	226	19.606	99	0,234			
29	108	8.564	100	0,264			

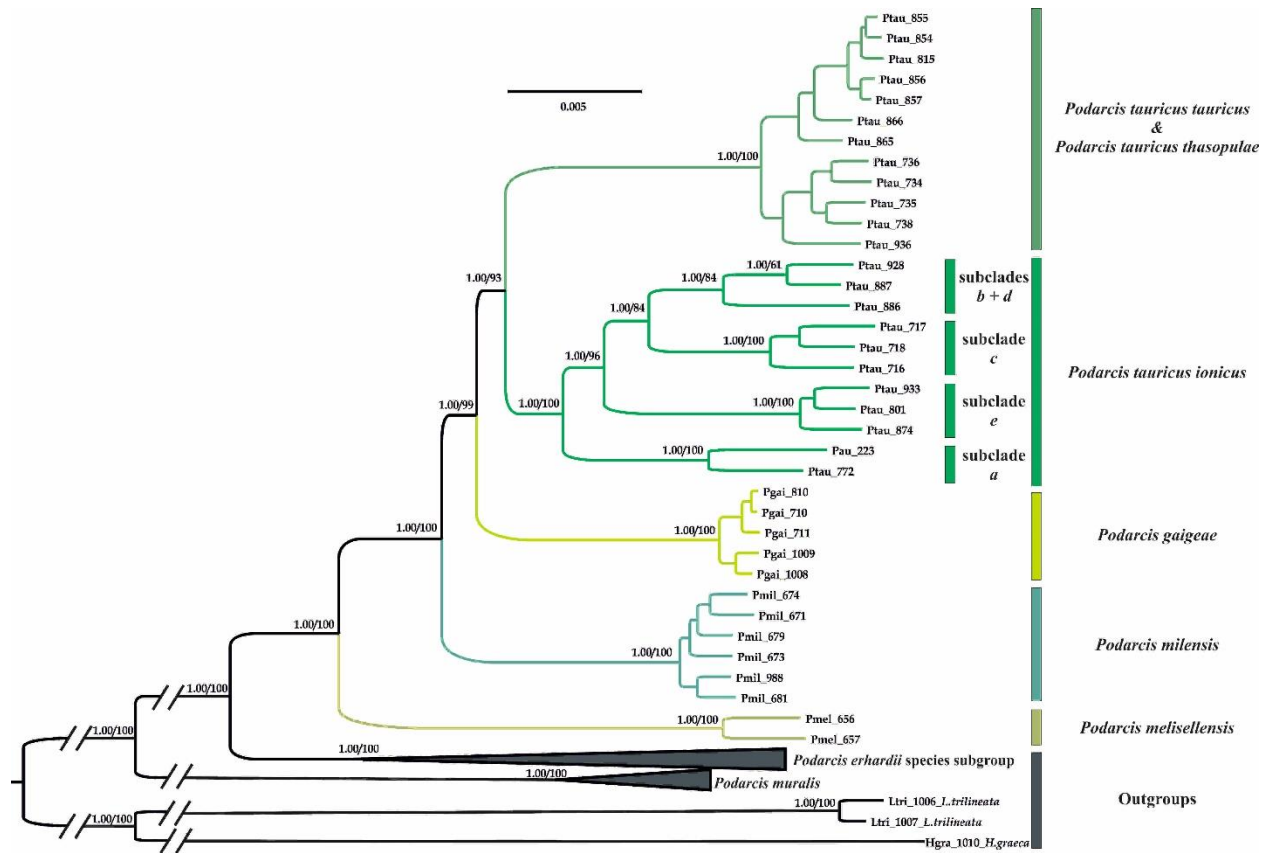
a: αριθμός γενετικών τόπων

b: αριθμός νουκλεοτιδικών θέσεων

c: αριθμός διαφορετικών *resulting trees* στο σύνολο των 100

d: μέση σχετική τιμή RF distance μεταξύ των *resulting trees*

e: μέση σχετική τιμή RF distance μεταξύ των *best scoring trees*

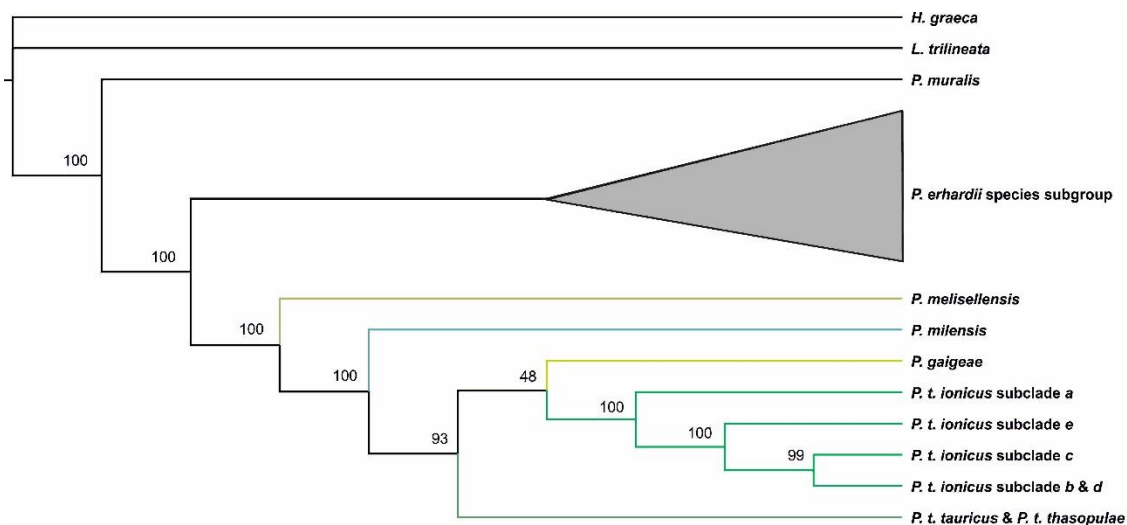
Φυλογενωμικές σχέσεις μεταξύ των ειδών  
της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»

Εικόνα 3.5. Το φυλογενωμικό (ddRADseq) δέντρο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» με βάση τη μέθοδο Maximum Likelihood. Στους κλάδους εμφανίζονται οι τιμές της στατιστικής υποστήριξης των μεθόδων BI και ML, αντιστοίχα (εκ των υστέρων πιθανότητες > 0,95, bootstrap >75). Η στατιστική υποστήριξη για τα εξωτερικά κλαδιά δεν παρουσιάζεται παρότι ήταν υψηλή.



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης mPTP (βάσει και των δύο φυλογενετικών μεθόδων) εντός του φυλογενωμικού δέντρου της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» υπάρχουν πέντε διακριτές ομάδες. Αυτές αντιστοιχούν στους πέντε κύριους φυλογενωμικούς κλάδους όπως φαίνονται στο φυλογενωμικό δέντρο της Εικόνας 3.5.

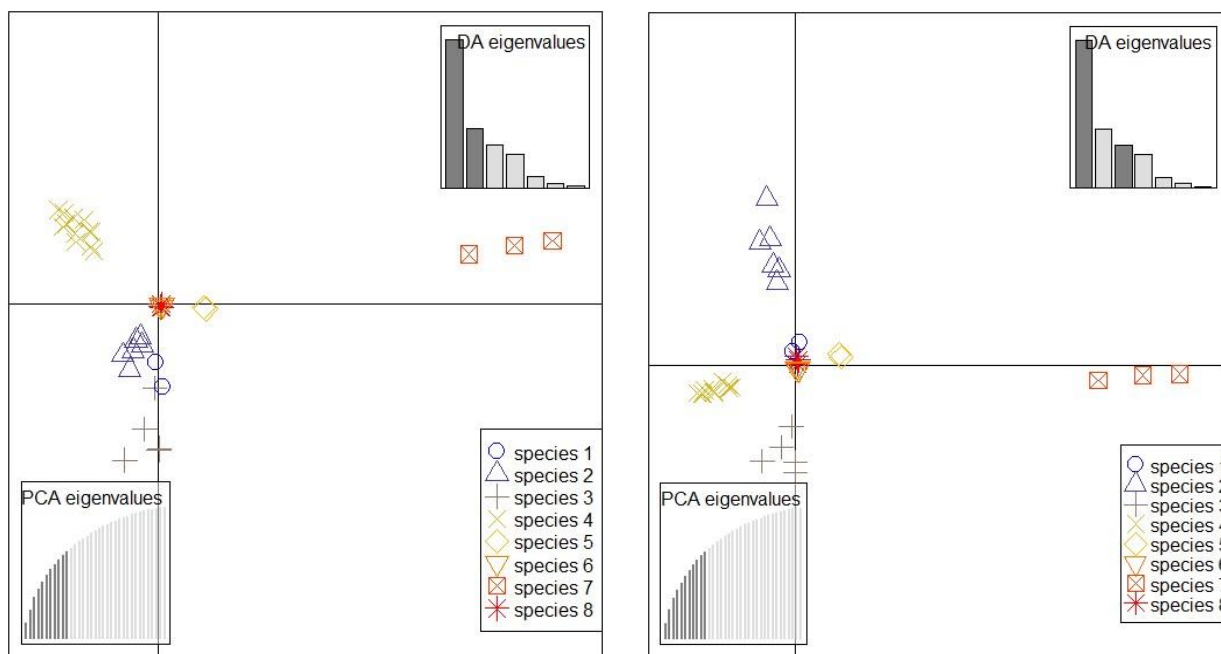
Το δέντρο των ειδών όπως εκτιμήθηκε από την ανάλυση SVDquartets παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.6. και φαίνεται να ταυτίζεται σε μεγάλο βαθμό με το concatenated φυλογενωμικό δέντρο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αντιστοίχιση των κύριων κλάδων και υποκλάδων του φυλογενωμικού δέντρου σε «είδη» λαμβάνει υπόψιν το αποτέλεσμα της ανάλυσης mPTP μιας και τα επιπλέον «είδη» που χρησιμοποιούνται αποτελούν υποομάδες μιας από τις εκτιμώμενες διακριτές οντότητες (entities).



Εικόνα 3.6. Το δέντρο των ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*» όπως εκτιμήθηκε από την ανάλυση SVDQuartets. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές του στατιστικού ελέγχου bootstrap (τιμές >75 θεωρούνται στατιστικά σημαντικές).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της ανάλυσης dAPC, επτά κύριες συναρτήσεις διάκρισης (discriminant function, DF) φαίνεται να περιγράφουν την παρατηρούμενη ποικιλομορφία των συγκεκριμένων SNPs δεδομένων. Στις Εικόνα 3.7A φαίνονται αποτελέσματα της ανάλυσης DAPC για τις δύο σημαντικότερες συναρτήσεις, ενώ αντίστοιχα στην Εικόνα 3.7B παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βάσει της πρώτης και της

τρίτης κύριας συνάρτησης. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα «DA eigenvalues» που είναι ενσωματωμένο στις δύο παραπάνω εικόνες, το μεγαλύτερο ποσοστό της ποικιλότητας περιγράφεται από την πρώτη συνάρτηση. Στην Εικόνα 3.7Α φαίνεται ότι υπάρχει διάκριση μεταξύ των περισσότερων «ειδών», χωρίς όμως να μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ της ομάδας που περιλαμβάνει τον υποκλάδο *e* του taxon *P. t. ionicus* και της ομάδας που περιλαμβάνει τους υποκλάδους *b* και *d*, ενώ φαίνεται να υπάρχει και μια μικρή επικάλυψη μεταξύ *P. melisellensis* και *P. gaigeae*. Ωστόσο, ως ένα βαθμό η διάκριση των δύο τελευταίων επιτυγχάνεται όταν συγκρίνεται η πρώτη συνάρτηση με την τρίτη (Εικ. 3.7Β). Σε αυτήν την περίπτωση οι ομάδες *e* και *b & d* παραμένουν επικαλυπτόμενες, αν και σε μικρότερο βαθμό.



Εικόνα 3.7. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC με βάση Α. την πρώτη (άξονας x) και τη δεύτερη (άξονας y) σημαντικότερη συνάρτηση διάκρισης (discriminant function, DF) στην περιγραφή της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας και Β. την πρώτη και την τρίτη σημαντικότερη συνάρτηση διάκρισης. Η επίδραση της κάθε συνάρτησης στο σύνολο της ποικιλομορφίας φαίνεται στο διάγραμμα ιδιοτιμών «DA eigenvalues». 1: *P. melisellensis*, 2: *P. milensis*, 3: *P. gaigeae*, 4: *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae*, 5: *P. t. ionicus* subclade *a*, 6: *P. t. ionicus* subclade *e*, 7: *P. t. ionicus* subclade *c*, 8: *P. t. ionicus* subclade *b&d*.

## 5. Συζήτηση

Οι φυλογενετικές σχέσεις που εκτιμήθηκαν με βάση δεδομένα γενωμικού επιπέδου (ddRADseq) φαίνεται να συμφωνούν ως επί το πλείστον με τα αποτελέσματα των αναλύσεων βάσει γενετικών δεδομένων τύπου αλληλούχισης Sanger (Δεύτερο Κεφάλαιο). Η επιπλέον πληροφορία φαίνεται να αποτελεί τη λύση στη διαλεύκανση των άλυτων φυλογενετικών σχέσεων που παρατηρήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Η Βαλκανική ομάδα ειδών, η οποία είχε χαμηλή στατιστική υποστήριξη προηγουμένως, πλέον αποκαλύφθηκε ότι αποτελεί μονοφυλετική ομάδα με τις δύο μονοφυλετικές υποομάδες ειδών («*P. tauricus*» και «*P. erhardii*») να αποτελούν αδελφά taxa. Ωστόσο η μονοφυλετικότητα της Βαλκανικής ομάδας δεν πρέπει να θεωρηθεί αδιάψευστο γεγονός αφού από το συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων απουσιάζουν αντιπρόσωποι των υπόλοιπων ομάδων ειδών.

Εντός της υπό εξέταση υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», η οποία εμφανίζεται μονοφυλετική, αναγνωρίζονται οι πέντε κύριοι φυλογενετικοί κλάδοι του προηγούμενου κεφαλαίου, οι οποίοι αντιστοιχούν στα taxa *P. melisellensis*, *P. milensis*, *P. gaiageae*, *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus* - *P. t. thasopulae*. Το είδος *P. melisellensis* παραμένει το είδος που τοποθετείται πιο κοντά στη ρίζα της υποομάδας. Ωστόσο, σε αντίθεση με το Δεύτερο Κεφάλαιο οι σχέσεις των υπόλοιπων taxa φαίνεται να έχουν επιλυθεί (Εικ. 5.3) με τα taxa *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus* - *P. t. thasopulae* να έχουν σχέση αδελφών κλάδων, με πιο συγγενικό αυτών το είδος *P. gaiageae* και εν συνεχεία η ομάδα αυτών των τριών να συνδέεται τοπολογικά με το είδος *P. milensis*. Παρόλα αυτά, η σχέση μεταξύ των τριών πρώτων δεν αναγνωρίζεται από το δέντρο των ειδών.

Εντός του taxon *P. t. ionicus* αναγνωρίζονται ως διακριτοί οι τέσσερις από τους πέντε φυλογενετικούς υποκλάδους (Εικ. 5.3). Οι υποκλάδοι *b* και *d* εμφανίζονται ως μη ξεχωριστοί λόγω της χαμηλής στατιστικής υποστήριξης. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αναγνωρισμένων υποκλάδων φαίνεται να είναι επιλυμένες, με την υποομάδα *a* να είναι η πιο κοντινή στη ρίζα της υποομάδας και στη συνέχεια να διαφοροποιούνται κατά

σειρά η υποομάδα *e*, η υποομάδα *c* και ο κλάδος που περιέχει της υποομάδες *b* και *d*. Να επισημανθεί, ωστόσο, ότι με βάση μόνο τα SNPs δεδομένα (ανάλυση dAPC) η υποομάδα *e* δεν ήταν δυνατό να διακριθεί από τις υποομάδες *b* και *d*. Οι σχέσεις αυτές έρχονται μερικώς σε ασυμφωνία με αυτές που παρήχθησαν βάσει των δεδομένων Sanger, όπου με υψηλή στατιστική υποστήριξη είχε εκτιμηθεί η σχέση αδελφών γενεαλογιών μεταξύ των υποκλάδων *a* - *b*, ενώ με μέτρια έως καλή η κοντινή σχέση των υπόλοιπων τριών υποκλάδων και η αδελφή σχέση μεταξύ των υποκλάδων *c* και *d*. Ουσιαστικά η κύρια διαφορά αποτελεί η τοποθέτηση της υποομάδας *b* στον ίδιο κλάδο με την υποομάδα *d*. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποτελεί ένδειξη διαφορετικής εξελικτικής ιστορίας μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων που μελετώνται, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν διαφορετικού τύπου γενετικούς δείκτες (Whitfield, 2007 και αναφορές εκεί). Ωστόσο επειδή η υποομάδα *b* αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο δείγμα, η υπόθεση αυτή θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με προσοχή μιας και η ύπαρξη λάθους σε κάποιο από τα στάδια της προετοιμασίας ddRADseq βιβλιοθήκης είναι επίσης πιθανή. Μη λαμβάνοντας υπόψιν την υποομάδα *b* η διαφοροποίηση των υποκλάδων έγινε με την εξής σειρά: αρχικά ο υποκλάδος *a*, στη συνέχεια ο υποκλάδος *e* και τέλος οι υποκλάδοι *c* και *d*.

Συζήτηση για τις σχέσεις εντός κάθε φυλογενωμικού κλάδου/υποκλάδου δεν κρίνεται σκόπιμη μιας δεν έγινε χρήση δειγμάτων από όλη την κατανομή του κάθε κλάδου και υποκλάδου αφού κύριος σκοπός ήταν η επίλυση των πιο εσωτερικών μη επιλυμένων σχέσεων.

Η μέθοδος ddRADseq φαίνεται να αποτελεί όντως μια από τις καλύτερες επιλογές όσον αφορά την επίλυση δύσκολων φυλογενετικών προβλημάτων, όπως είναι η περίπτωση της ραγδαίας διαφοροποίησης των *Podarcis* εντός μικρής χρονικής περιόδου. Η παρούσα μελέτη έρχεται να προστεθεί σε αυτές (Leaché et al., 2015; Chattopadhyay et al., 2016; DaCosta and Sorenson, 2016) που υποστηρίζουν ότι η μέθοδος αυτή είναι ιδανική όσον αφορά το κόστος και τον χρόνο που απαιτείται για την παραγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων για οργανισμούς που δεν είναι μοντέλα. Η χρήση της μεθόδου αυτής

θα πρέπει να περιορίζεται, ωστόσο, σε στενά συγγενικά είδη μιας και το ποσοστό των ομόλογων θέσεων που ανακτάται είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη γενετική απόσταση μεταξύ των taxa (DaCosta and Sorenson, 2016).

## 6. Συμπεράσματα

Η μέθοδος ddRADseq αποτέλεσε ιδανική επιλογή στην επίλυση ενός δύσκολου φυλογενετικού ερωτήματος όπως είναι αυτό της διασαφήνισης των φυλογενετικών σχέσεων των μελών της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», οι οποίες είναι αποτέλεσμα ραγδαίας εξελικτικής διαφοροποίησης (Oliverio et al., 2000). Ανακτήθηκαν χιλιάδες γενετικοί τόποι από όλο το γονιδίωμα κάνοντας χρήση της παραπάνω μεθόδου, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενωμικού δέντρου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η σειρά με την οποία διαφοροποιήθηκαν οι κύριοι φυλογενετικοί κλάδοι της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» είχε ως εξής: αρχικά διαφοροποιήθηκε το είδος *P. melisellensis*, μετά το είδος *P. milensis*, στη συνέχεια το είδος *P. gaiageae* και ύστερα τα αδελφά taxa *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae*. Εντός του taxon *P. t. ionicus* οι σχέσεις επίσης επιλύθηκαν σε μεγάλο βαθμό με μοναδική αντίθεση σε σχέση με τα δεδομένα Sanger την ομαδοποίηση του υποκλάδου *b* εντός του υποκλάδου *d* (Εικ. 3.5). Η χρήση όμως ενός μόνο ατόμου ως αντιπροσώπου της υποομάδας *b* αφήνει ερωτήματα όσον αφορά την ισχύ αυτής της σχέσης. Μη λαμβάνοντας υπόψιν την υποομάδα *b*, η διαφοροποίηση των υποκλάδων έγινε με την εξής σειρά: αρχικά ο υποκλάδος *a*, στη συνέχεια ο υποκλάδος *e* και τέλος οι υποκλάδοι *c* και *d*.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

---

### Πληθυσμιακή γενετική της υποομάδας ειδών «*Podarcis tauricus*»

Τα δεδομένα είναι μέρος της υπό προετοιμασία εργασίας (Παράρτημα IV):

*Psonis et al. (2017) Genomic phylogeography and species distribution modelling of the Podarcis tauricus (Sauria: Lacertidae) species subgroup. (In preparation).*

## 1. Περίληψη κεφαλαίου

Η υποομάδα ειδών «*Podarcis tauricus*» αποτελείται από τέσσερα μορφολογικώς αναγνωρισμένα είδη και από αρκετούς κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους. Ωστόσο, η γενετική δομή των πληθυσμών που απαρτίζουν τις παραπάνω ομάδες δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Η μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής των ειδών αυτών αναμένεται να δώσει επιπλέον στοιχεία όσο αφορά τη γενετική δομή της συγκεκριμένης υποομάδας ειδών. Χρησιμοποιώντας 17 μικροδορυφορικούς γενετικούς τόπους και εφαρμόζοντας μια σειρά από αναλύσεις ανίχνευσης πληθυσμιακής δομής, έγινε εκτίμηση του πιθανού αριθμού διαφορετικών ομάδων εντός των συγγενικών ειδών της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Επιπλέον, κάνοντας χρήση της ανάλυσης DAPC έγινε εκτίμηση του πόσο διακριτοί είναι οι κλάδοι και οι υποκλάδοι της υποομάδας ειδών που μελετάται. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε γενικές γραμμές οι ομαδοποιήσεις που αναγνωρίστηκαν αντιστοιχούν στους κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους (ή ομάδες αυτών) που φανέρωσαν τα δεδομένα αλληλουχιών σε προηγούμενο κεφάλαιο. Τέλος, η ανάλυση DAPC έδειξε ότι οι περισσότεροι κλάδοι και υποκλάδοι της υποομάδας είναι διακριτές ομάδες με εξαίρεση τους υποκλάδους *a*, *b* και *c* του taxon *P. t. ionicus*.

**Λέξεις κλειδιά:** Ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE, Μικροδορυφορικά, Πληθυσμιακή δομή, dAPC



## 2. Εισαγωγή κεφαλαίου

### 2.1. Η χρήση των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων στην Εξελικτική Βιολογία

Στην Πληθυσμιακή Γενετική γίνεται χρήση από ευρύ φάσμα μοριακών δεικτών (για επισκόπηση βλ. Agarwal et al., 2008; Arif et al., 2010) που μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες (Hoshino et al., 2012), οι οποίες βασίζονται: (α) στη χρήση της μεθόδου υβριδοποίησης νουκλεϊκών οξέων, π.χ. πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος περιοριστικών ενδονουκλεασών (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs), (β) στη χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), π.χ., πολυμορφισμοί DNA μετά από τυχαίο πολλαπλασιασμό (random amplification of polymorphic DNAs, RAPD), πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος μετά από πολλαπλασιασμό (amplified fragment length polymorphisms, AFLP), μικροδορυφορικές ή απλές αλληλουχικές επαναλήψεις (microsatellites or simple sequence repeats, SSRs\*), και (γ) πολυμορφισμοί νουκλεοτιδικής θέσης (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Η πρώτη κατηγορία χρησιμοποιείται όλο και λιγότερο λόγω δυσκολιών στον χειρισμό πολλών δειγμάτων και άλλων μειονεκτημάτων (π.χ. συγκυριαρχία δείκτη), ενώ η τρίτη αποτελεί κοστοβόρα επιλογή, επί του παρόντος, αν και όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, το κόστος διαρκώς μειώνεται. Αντίθετα, οι τεχνικές που βασίζονται στη μέθοδο PCR παρουσιάζουν μικρό κόστος και λόγω αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τις τελευταίες τρεις δεκαετίες.

Οι μικροδορυφόροι είναι πολυμορφικοί γενετικοί τόποι του DNA αποτελούμενοι από διαδοχικές επαναλήψεις αλληλουχιών (πρότυπα μήκους 1-6 ζ.β.). Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία είναι συχνά απλή, αποτελούμενη από δι-, τρι- και τετρα-νουκλεοτιδικό πρότυπο. Αυτοί οι δείκτες συχνά παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα

---

\* Γνωστά και ως short tandem repeats (STR's), simple sequence tandem repeats (SSTR), variable number tandem repeats (VNTR), simple sequence length polymorphisms (SSLP), sequence tagged microsatellites (STMS).

ενδο- και δια-ειδικής ποικιλομορφίας, ειδικά όταν ο αριθμός των επαναλήψεων ξεπερνά τις 10 (Arif et al., 2010). Οι μικροδορυφόροι είναι κατανεμημένοι σε όλο το ευκαρυωτικό γονιδίωμα, τόσο σε κωδικές όσο και σε μη κωδικές περιοχές (Jarne and Lagoda, 1996). Είναι παρόντες επίσης και στα προκαρυωτικά γονιδιώματα και ως εκ τούτου στους ευκαρυώτες εντοπίζονται και στο γονιδίωμα οργανιδίων, όπως οι χλωροπλάστες (Powell et al., 1995) και τα μιτοχόνδρια (Soranzo et al., 1999). Οι μικροδορυφόροι τείνουν να είναι πολύ ποικιλόμορφοι λόγω του υψηλού ρυθμού εισαγωγής λαθών προσθήκης ή αφαίρεσης επαναλήψεων κατά την αντιγραφή του DNA (slipped-strand mispairing, Levinson and Gutman, 1987). Εξαιτίας του υψηλού μεταλλακτικού ρυθμού τους, οι μικροδορυφόροι αποτελούν πιθανώς τους πιο πληροφοριακούς μοριακούς δείκτες με πλεονέκτημά τους την ευκολία και το χαμηλό κόστος της μεθόδου PCR. Σημαντικό μειονέκτημα αποτελούσε για χρόνια η δυσκολία απομόνωσης νέων μικροδορυφορικών τόπων, ωστόσο μέσω της εδραίωσης νέων τεχνολογιών αλληλούχισης (Fernandez-Silva et al., 2013), έχει πλέον καταστεί μία πολύ πιο απλή και φθηνή διαδικασία. Τέλος, ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το ότι είναι συγκυρίαρχοι μοριακοί δείκτες. Αντίθετα με τους δείκτες τύπου RAPD και AFLP, οι οποίοι είναι κυρίαρχοι και εντοπίζουν μόνο την παρουσία ή την απουσία ενός γενετικού τύπου, οι μικροδορυφόροι μπορούν και εντοπίζουν τόσο ομοζυγώτες όσο και ετεροζυγώτες (Hoshino et al., 2012).

## 2.2. Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» με χρήση μικροδορυφόρων

Οι μικροδορυφορικοί τόποι ως κατάλληλοι μοριακοί δείκτες για τη μελέτη της πληθυσμιακής δομής, της ποικιλομορφίας, της δημογραφίας και της εξελικτικής ιστορίας των ειδών του γένους *Podarcis* και των πληθυσμών τους έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα στο παρελθόν. Μίας και η μέθοδος των μικροδορυφορικών τόπων απαιτεί ειδικούς εκκινητές για το στάδιο της μεθόδου PCR, έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα μελετών τις τελευταίες δύο δεκαετίες για την εξειδικευμένη ανάπτυξή τους (π.χ., Boudjemadi et al., 1999; Nembrini and Oppliger, 2003; Pinho et al., 2004; Poulakakis et al., 2005a; Runemark et al., 2008; Huyghe et al., 2009; Wellenreuther and Runemark, 2009; Bloor et al., 2011; Heathcote et al., 2015). Προσπάθειες χρήσης μικροδορυφορικών τόπων με στόχο τη μελέτη της εξελικτικής ιστορίας των μη βαλκανικών *Podarcis* έχουν γίνει για τα είδη *P. bocagei* και *P. carbonelli* (Pinho et al., 2009), *P. filfolensis* (Rodríguez et al., 2013b), *P. hispanicus* (Harris et al., 2002), *P. pityusensis* (Rodríguez et al., 2013a), *P. siculus* (Fulgione et al., 2004; Fulgione et al., 2008) και *P. vaucheri* (Harris et al., 2002), ενώ για τα βαλκανικά είδη οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί κατά κύριο λόγο στο είδος *P. muralis* (Schulte et al., 2012; Gassert et al., 2013; Schulte et al., 2013; Michaelides et al., 2015) και εν συνεχεία στα είδη *P. erhardii* (Hurstun et al., 2009), *P. gaigeae* (Runemark et al., 2010; Runemark et al., 2012) και *P. melisellensis* (Huyghe et al., 2010), με τα δύο τελευταία να αφορούν άμεσα την παρούσα εργασία. Τα είδη *P. tauricus* και *P. milensis* δεν έχουν ακόμα εξεταστεί με χρήση τέτοιων δεικτών. Η πλειονότητα των παραπάνω μελετών αφορά νησιωτικούς πληθυσμούς, ενώ συχνά οι μελέτες αυτές αφορούν συνδυαστικά και μελέτη φαινοτυπικής διαφοροποίησης.

Η μελέτη πάνω στο είδος *P. melisellensis* (Huyghe et al., 2010) φανέρωσε την πιθανή ύπαρξη φραγμών στη γονιδιακή ροή μεταξύ τριών διαφορετικών χρωματικών μορφοτύπων, το οποίο θεωρήθηκε ένδειξη προσαρμοστικής διαφοροποίησης και συμπατρικής εξέλιξης, χωρίς ωστόσο να γίνεται εξέταση της επίδρασης της τυχαίας

γενετικής παρέκκλισης. Αντίθετα, στην περίπτωση του είδους *P. gaiageae*, παρόμοια μελέτη της χρωματικής και της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών νησιών και νησίδων (Runemark et al., 2010) φανέρωσε ότι η φαινοτυπική διαφοροποίηση οφείλεται στη συνδυαστική επίδραση τυχαίας γενετικής παρέκκλισης και εξισορροπούσας επιλογής.

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δεύτερη μελέτη πάνω στο είδος *P. gaiageae* (Runemark et al., 2012), όπου εξετάζεται η αλλοπατρική ειδογένεση του είδους. Πιο συγκεκριμένα, διερευνάται κατά πόσο η διασπορά ή ο βικαριανισμός αποτελεί τον βασικό μηχανισμό αυτού του τύπου διαφοροποίησης. Χρησιμοποιώντας 11 μικροδορυφορικούς τόπους και δείγματα από έξι τοποθεσίες του κεντρικού νησιού του συγκροτήματος της Σκύρου και οκτώ δορυφορικές νησίδες, συμπεριλαμβανομένης της νησίδας Πιπέρι που φιλοξενεί το υποείδος *P. g. weigandi*, έγινε εκτίμηση της ύπαρξης και της κατεύθυνσης της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών. Τα αποτελέσματα έδειξαν έλλειψη γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών του υποείδους *P. g. gaiageae*, τόσο μεταξύ των νησίδων όσο και μεταξύ των νησίδων και του κεντρικού νησιού. Ωστόσο γίνεται αναφορά για ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ των δύο υποειδών, με μονόδρομη κατεύθυνση από το *P. g. weigandi* της νησίδας Πιπέρι προς το *P. g. gaiageae* της τοποθεσίας Παλαμάρι του κεντρικού νησιού της Σκύρου. Αυτό θεωρήθηκε ένδειξη για το ότι είναι εφικτή σε μικρό βαθμό η διασπορά μεταξύ νησίδων και κεντρικού νησιού, παρά τη μειωμένη ικανότητα διασποράς του είδους. Στο σύνολό τους, ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κύριος μηχανισμός διαφοροποίησης των πληθυσμών αποτελεί ο βικαριανισμός που οφείλεται στον κατακερματισμό των νησίδων που έλαβε χώρα μετά το τέλος των πλειστοκαινικών παγετώνων. Σε αντίστοιχο συμπέρασμα έφτασε και η μελέτη των *P. erhardii* των Κυκλάδων (Hurston et al., 2009), όπου φάνηκε ότι ο κατακερματισμός των νησιών και της προϋπάρχουσας ποικιλότητας, με έντονη τη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης, και ο συνδυασμός της έκτασης και του χρόνου απομόνωσης των νησιών αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που εξηγούν τη γενετική ποικιλότητα.

### 2.3. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται χρήση 17 μικροδορυφορικών τόπων και ενός συνόλου δειγμάτων 365 ατόμων που αντιπροσωπεύουν όλα τα είδη και σχεδόν όλους τους κύριους φυλογενετικούς κλάδους της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Κύριος στόχος του παρόντος κεφαλαίου είναι η διερεύνηση της πληθυσμιακής δομής των ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*» καθώς και η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητάς τους, κάνοντας χρήση nDNA δεδομένων.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Δείγματα, Εξαγωγή DNA και PCR

Για τις αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής χρησιμοποιήθηκε το Σύνολο Δειγμάτων IV (Παράρτημα II) που περιλαμβάνει 361 δείγματα της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Το σύνολο αυτό περιλαμβάνει σχεδόν όλα τα άτομα από κάθε σταθμό δειγματοληψίας (βλ. Δεύτερο Κεφάλαιο) μιας και απατούνται πολλαπλοί αντιπρόσωποι κάθε πληθυσμού, ωστόσο δεν περιλαμβάνει τα δείγματα με κωδικούς 898 έως 953, τα οποία συλλέχθηκαν μετά το πέρας της γονοτύπισης. Το αρχικό σύνολο δειγμάτων περιλάμβανε 419 άτομα, αλλά 57 από αυτά δεν παρήγαγαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Πληροφορίες για τα δείγματα ιστών μπορούν να αναζητηθούν στο Παράρτημα I. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 53 άτομα του είδους *P. gaiageae*, 8 άτομα του είδους *P. melisellensis*, 53 άτομα του είδους *P. milensis*, 167 άτομα από το taxon *P. t. tauricus*, 14 άτομα από το taxon *P. t. thasopulae* και 71 από το taxon *P. t. ionicus*. Στο τελευταίο, τα δείγματα αντιστοιχούν σε επτά άτομα του υποκλάδου *a*, πέντε άτομα του υποκλάδου *b*, 18 άτομα του υποκλάδου *c*, 10 άτομα του υποκλάδου *d* και 31 άτομα του υποκλάδου *e*.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ως μήτρα DNA για την PCR χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις (1:50) του ολικού γενωμικού DNA που είχε απομονωθεί από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις. Νέες εξαγωγές DNA από μυ, σκώτι ή αίμα δειγμάτων (συντήρηση σε 96% αιθανόλη ή στους -80°C), χρησιμοποιώντας τυπικό πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με βάση τη δραστική ουσία οξικού αμμωνίου (*ammonium acetate*) και ένζυμο πέψης ιστού (Πρωτεΐνάση K), πραγματοποιήθηκαν μόνο για τα επιπλέον δείγματα από κάθε δειγματοληπτικό σταθμό.

Η μέθοδος της PCR εφαρμόστηκε για τον στοχευμένο πολλαπλασιασμό 17 μικροδορυφορικών τόπων, των οποίων οι εκκινητές και οι συνθήκες πολλαπλασιασμού της μεθόδου PCR δίνονται στον Πίνακα 4.1. Σε όλα τα ζεύγη εκκινητών,

χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες χρωστικές (βλ. Πίνακα 4.1 για τις πέντε διαφορετικές χρωστικές) στο έναν (forward) από τους δύο εκκινήτες στο 5' άκρο του.

Πίνακας 4.1 Εκκινητές και συνθήκες πολλαπλασιασμού της τεχνικής PCR<sup>a</sup>.

Όνομα Τύπου	Ζεύγος Εκκινητών (χρωστική)	Αλληλουχία (5' - 3')	Multiplex-loading	Θερμοκρασία Annealing (°C) <sup>b</sup>	Συγκέντρωση MgCl <sub>2</sub> (mM)	Βιβλιογραφική Αναφορά
B6	B6-F (ROX) B6-R	CTGCTGCTTCAATCACACTC GCCTTGCCCTCTCCAGAAC	M5	50	1,5	(Nembrini and Oppliger, 2003)
C9	C9-F (TAMRA) C9-R	CATTGCTGGTTCCTGGAGAAAG CCTGATGAAGGGAAGTGGTG	M1	57,4	1,5	(Nembrini and Oppliger, 2003)
Lv3-19	Lv3-19-F (TAMRA) Lv3-19-R	CTGTTGCTATTTTGTATGCTTAC CCTGTGACTGTCCCTCAGAGG	M3	47	1,5	(Boudjemadi et al., 1999)
Lv4-72	Lv4-72-F (ROX) Lv4-72-R	CCCTACTTGAGTTGCCGTC CTTTCAGGTAACAGAGTAG	M3	47	1,5	(Boudjemadi et al., 1999)
Pb10	Pb10-F (ROX) Pb10-R	AGTGGAATCGGCTGCAATAC ACCAGTCCCAGGAATTTAGG	M1	50	1,5	(Pinho et al., 2004)
Pb47	Pb47-F (FAM) Pb47-R	CTTGGTGGTTAACAATGTTGGC GTGAGCTAATACAACCTCTCCAC	M4	48	3	(Pinho et al., 2004)
Pb50	Pb50-F (TET) Pb50-R	GGATGTTTCAGCATGCTTGG AGACCTCACTGGGCCATTAC	M3	58	1,5	(Pinho et al., 2004)
Pli4	Pli4-F (FAM) Pli4-R	TCAGTTCATGCATAAGGTCCA TTCGGCATTTTTCTTCAGGT	M2	57,4	1,5	(Bloor et al., 2011)
Pm16	Pm16- (TAMRA) Pm16-R	GGGATGGAGAAAGATGGCG GCACTTGCCTACTGGTCATAC	M4	57,4	1,5	(Richard et al., 2012)
Pm27	Pm27-F (HEX) Pm27-R	TCCATGAGCTCCACACACG TCCACAGCCACTTACGGAC	M4	57,4	1,5	(Richard et al., 2012)
Pmeli02	Pmeli02-F (TAMRA) Pmeli02-R	AGTGGAAATCGGCTGCAATAC ACCAGTCCCAGGAATTTAGG	M5	47	1,5	(Huyghe et al., 2009)
Pmeli19	Pmeli19-F (FAM) Pmeli19-R	TTCCAAGTCTGATTCACCTCCAA AGCTGCAAGCACCTAGCAAT	M5	57,4	1,5	(Huyghe et al., 2009)
Pod1A	Pod1A-F (FAM) Pod1A-R	TGAGAAGCACATCTGCACAC TGAACGCATAATGGCTGAAGG	M1	47	1,5	(Poulakakis et al., 2005a)
Pod1B	Pod1B-F (FAM) Pod1B-R	CCTTCAGCCATTATGCGTTCATC AGGATGGGGGATAACCCAGT	M3	50	1,5	(Poulakakis et al., 2005a)
Pod3	Pod3-F (TET) Pod3-R	TTATCAGACGTGGGGAAAG GCACCTCAACCCGAGGTCTG	M2	45	3	(Poulakakis et al., 2005a)
Pod2	Pod2-F (FAM) Pod2-R	GGCAATGTTCTGCATGACG TGGGACAAAAGGCAGAACG	M2	55	1,5	(Poulakakis et al., 2005a)
Pod8	Pod8-F (TET) Pod8-R	CCCTAACTATCTGTTGCTGCTG CACAAAGGGTATCGAAGGAGG	M5	57,4	1,5	(Poulakakis et al., 2005a)

<sup>a</sup> κάνοντας χρήση του ενζύμου DNA Πολυμεράσης τύπου *Taq* (KAPA BIOSYSTEMS®)<sup>b</sup> Πρόγραμμα: 94°C/1min, 45 - 58°C/1min, 72°C/1min x35 cycles



Ο διαχωρισμός των αλληλομόρφων πραγματοποιήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης στον αυτόματο αλληλουχητή ABI3730), ύστερα από ένωση προϊόντων της μεθόδου PCR (multiplex-loading) για διαφορετικούς μικροδορυφορικούς τόπους (βλ. Πίνακα 4.1 για τα πέντε multiplex M1 - M5). Η ομαδοποίηση έγινε βάσει της χρωστικής και του εύρους μεγέθους των προϊόντων, προς αποφυγή αλληλεπικάλυσης και μπερδεμένου σήματος. Οι γονότυποι καθορίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού STRand Analysis Software (v. 2.4.0.59, Toonen and Hughes, 2001), ενώ για την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων όσον αφορά τη στρογγυλοποίηση των τιμών και την αντιστοίχισή τους σε κατηγορίες αλληλομόρφων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό FLEXIBIN 2 (v.2, Amos et al., 2007).

## 3.2. Αναλύσεις Δεδομένων

### 3.2.1. Ισορροπία Hardy-Weinberg και γενετική ποικιλότητα

Το λογισμικό MICRO-CHECKER (v.2.2.3, van Oosterhout et al., 2004) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων (null alleles), της απώλειας αλληλομόρφων μεγάλου μήκους (large allele dropout) και πιθανών λαθών κατά τη γονοτύπωση. Το λογισμικό Genepop (v.3.4, Raymond and Rousset, 1995) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των δεικτών γενετικής ποικιλότητας υπό τη μορφή του αριθμού των αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο ( $A$ ), του συντελεστή ομομιξίας  $F_{IS}$  (Weir and Cockerham, 1984) και της αναμενόμενης ( $H_e$ ) και παρατηρούμενης ( $H_o$ ) ετεροζυγωτίας ανά γενετικό τόπο. Με το ίδιο πρόγραμμα ελέγχθηκε η απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg (HW). Οι αναλύσεις με αυτά τα υπολογιστικά προγράμματα έγιναν τόσο στο σύνολο των δεδομένων όσο και σε υποσύνολα που είτε αντιστοιχούν στους κύριους φυλογενετικούς κλάδους είτε αντιστοιχούν στις τελικές ομαδοποιήσεις (clusters) που προέκυψαν από την ανάλυση εκτίμησης πληθυσμιακής δομής (βλ. παρακάτω). Τέλος, μέσω του λογισμικού GENETIX (Belkhir et al., 2001) έγινε ο υπολογισμός του συντελεστή διαφοροποίησης  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham, 1984) ανά ζεύγος τελικών ομαδοποιήσεων εφαρμόζοντας 1000 permutations ως στατιστική υποστήριξη.

### 3.2.2. Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής

Ο έλεγχος ύπαρξης πληθυσμιακής δομής πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού STRUCTURE (v.2.3.4, Pritchard et al., 2000) στο οποίο έγινε αντιστοίχιση των ατόμων σε πληθυσμούς με βάση μόνο τη γενετική πληροφορία των μικροδορυφορικών τόπων χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η χωρική κατανομή τους (Guillot et al., 2009). Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο συσχετιζόμενων αλληλικών συχνοτήτων (correlated allele frequency model, F-model) με δυνατότητα ανάμειξης, το οποίο αντιστοιχεί σε ένα δημογραφικό σενάριο ταυτόχρονης διαφοροποίησης υποπληθυσμών από έναν προγονικό πληθυσμό, με τις αλληλικές συχνότητες κάθε υποπληθυσμού να υπόκεινται στη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης με μοναδικό ρυθμό, ο οποίος είναι αντιστρόφως ανάλογος με το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος του υποπληθυσμού (Falush et al., 2003), επιτρέποντας ταυτόχρονα την ύπαρξη ατόμων μικτής καταγωγής (Pritchard et al., 2000). Δεδομένου του αριθμού των ομαδοποιήσεων (clusters)  $K$ , το παραπάνω μοντέλο ψάχνει για λύσεις, στις οποίες οι ομαδοποιήσεις βρίσκονται όσο το δυνατόν πλησιέστερα σε ισορροπία Hardy-Weinberg και σε ισορροπία σύνδεσης. Στην παρούσα μελέτη, διεξήχθησαν πέντε επαναληπτικές αναλύσεις για κάθε  $K$ , το οποίο είχε εύρος από 1 έως 10, χωρίς εκ των προτέρων χρήση γεωγραφικής καταγωγής. Κάθε «τρέξιμο» αποτελούνταν από 200.000 «γενεές» ως περίοδος «burn-in», ακολουθούμενες από 800.000 «γενεές» στις οποίες γινόταν η καταγραφή των αποτελεσμάτων της MCMC διαδικασίας. Η εκτίμηση της τιμής  $K$  αξιολογήθηκε με βάση τη μέθοδο  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005) και του διαδικτυακού λογισμικού STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt, 2012), η οποία επιλέγει το μοντέλο με τον μεγαλύτερο ρυθμό αλλαγής (second-order rate of change) στην τιμή  $\ln Pr(X|K)$ . Για κάθε επιλεγμένο  $K$  υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων μέσω του λογισμικού CLUMPP (v.1.1.2, Jakobsson and Rosenberg, 2007), στο οποίο έγινε και ο έλεγχος της σύγκλισης της MCMC ανάλυσης. Η δημιουργία των διαγραμμάτων πληθυσμιακής δομής έγινε κάνοντας χρήση του λογισμικού Distruct (Rosenberg, 2004). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Clumpak (Kopelman et al.,

2015) για τη διαγραμματική απεικόνιση κάθε τιμής του  $K$  ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση φαινομένων πολλαπλών ισοπίθανων λύσεων δεδομένης μιας τιμής  $K$  (multimodality) ή φαινομένων διαφορετικού ποσοστού συμμετοχής  $q$  (label switching) για την ίδια τιμή  $K$ , αλλά και η σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφορετικών τιμών  $K$ .

Σύμφωνα με τους Pritchard et al. (2004), η ανάλυση πληθυσμιακής δομής με το πρόγραμμα STRUCTURE θα πρέπει να εφαρμόζεται επιπλέον σε κάθε συναθροίση που ανιχνεύεται, με σκοπό την περαιτέρω εύρεση πληθυσμιακής δομής. Αυτή η διαδοχική ανάλυση σε επίπεδα διαφοροποίησης χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα υποσύνολα των αρχικών δεδομένων έχει ονομαστεί «ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE» (hierarchical STRUCTURE analysis; Vähä et al., 2007). Ουσιαστικά, μετά την πρώτη εφαρμογή της ανάλυσης STRUCTURE και με προϋπόθεση ότι ανιχνεύεται γενετική δομή, διαιρείται το αρχικό σύνολο δεδομένων σε νέα υποσύνολα, τα οποία αντιστοιχούν στις συναθροίσεις που ανιχνεύτηκαν, αφαιρώντας όμως τα άτομα εκείνα που δεν είχαν υψηλή τιμή αντιστοίχισης (π.χ.  $q \geq 0,90$ , το όριο αυτό επιλέγεται ανάλογα με τα ερωτήματα που προσπαθούμε να απαντήσουμε) σε κάποια από τις συναθροίσεις. Έτσι το κάθε υποσύνολο αποτελείται από αμιγή (pure) άτομα της κάθε συναθροίσης. Αυτή η διαδικασία γίνεται σε κάθε επακόλουθη ανάλυση STRUCTURE, έως ότου να μην είναι εφικτή η περαιτέρω διαίρεση για κάποιον από τους ακόλουθους λόγους: (α) μη ανίχνευση πληθυσμιακής δομής (δηλαδή  $K=1$ ), (β) ανίχνευση πολλαπλών ισοπίθανων λύσεων δεδομένης μιας τιμής  $K$ , με τις οποίες λύσεις να δίνουν διαφορετικό πρότυπο αντιστοίχισης των ατόμων σε ομάδες, και (γ) υπερβολικά μικρός αριθμός ατόμων.

Η παραπάνω ιεραρχική διαδικασία χαρακτηρίζεται από το μειονέκτημα πιθανής αφαίρεσης πολλών ατόμων τα οποία δεν αντιστοιχίζονται με ασφάλεια σε κάποια ομαδοποίηση, ιδιαίτερα στα πρώτα βήματα. Αυτό έχει ως συνέπεια στα χαμηλότερα επίπεδα να μην επαρκούν τα άτομα για την εφαρμογή της ανάλυσης. Για τον λόγο αυτόν η ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE εφαρμόστηκε επίσης ξεχωριστά, σε κάθε έναν από τους κύριους φυλογενετικούς κλάδους της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» (βλ. Δεύτερο Κεφάλαιο).

### 3.2.3. Διερεύνηση σχέσεων

Με σκοπό τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ ομάδων ατόμων, εφαρμόστηκε επιπλέον η «Διακριτική Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών, Discriminant Analysis of Principal Components, DAPC» (Jombart et al., 2010). Αυτή η πολυπαραγοντική μέθοδος διάκρισης δε βασίζεται σε κάποιο μοντέλο, όπως π.χ. η ανάλυση STRUCTURE. Η μέθοδος DAPC εφαρμόστηκε κάνοντας χρήση του πακέτου adegenet (v. 1.3.1, Jombart and Ahmed, 2011) εντός του πλατφόρμας R © και πιο συγκεκριμένα του εργαλείου «DAPC web server». Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψιν εννέα αρχικούς πληθυσμούς ( $K=9$ ), οι οποίοι αντιστοιχούν στους κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους της υποομάδας *P. t. tauricus*, όπως ανακτήθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο. Αρχικά έγινε η εύρεση του βέλτιστου αριθμού κύριων συνιστωσών (PC) ύστερα από 100 επαναλήψεις προσομοίωσης μιας αρχικής DAPC ανάλυσης και στη συνέχεια ο βέλτιστος αυτός αριθμός PC χρησιμοποιήθηκε για την τελική ανάλυση DAPC.

## 4. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης για τρεις (Pb47, Pod3 και Pod8) από τους 17 γενετικούς τόπους δεν ήταν ικανοποιητικά διότι ήταν δύσκολη ή αβέβαιη η γονοτύπηση λόγω ύπαρξης παραπροϊόντων (ασυνέπεια γονοτύπησης). Συνεπώς, οι αναλύσεις που ακολουθούν πραγματοποιήθηκαν μόνο στα δεδομένα των υπόλοιπων 14 γενετικών τόπων.

### 4.1. Περιγραφικά στοιχεία Πληθυσμιακής Γενετικής

Οι 14 μικροδορυφορικοί τόποι που αναλύθηκαν παρουσίασαν πολυμορφισμό, έχοντας μέσο αριθμό αλληλομόρφων ανά τόπο ίσο με 29,8, κυμαινόμενος από 15 (Pb50) έως και 45 (Pmeli02 & Pmeli09) (Πίνακας 4.1). Για το σύνολο των ατόμων (θεωρώντας τα ως έναν πληθυσμό), η μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία ( $H_o$ ) και η εκτίμηση της αντίστοιχης αναμενόμενης ( $H_e$ ) (Nei, 1987) είχαν τιμές 0,566 και 0,841, αντίστοιχα (Πίνακας 4.2). Όλοι οι γενετικοί τόποι παρέκκλιναν από την ισορροπία Hardy-Weinberg με υψηλή στατιστική υποστήριξη ( $P < 0,001$ ), ενώ κανένας γενετικός τόπος δεν εμφάνισε αρνητική τιμή  $F_{IS}$ . Απώλεια αλληλομόρφων μεγάλου μήκους (large allele dropout) δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν από τους 14 γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν.

Τα αντίστοιχα περιγραφικά στοιχεία πληθυσμιακής γενετικής ανά κύριο φυλογενετικό κλάδο (πλην του είδους *P. melisellensis*) της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» δίνονται στον Πίνακα 4.2. Η μέση τιμή  $H_o$  για τους φυλογενετικούς κλάδους (α) *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae*, (β) *P. t. ionicus*, (γ) *P. gaegeae* και (δ) *P. milensis* ήταν 0,524, 0,491, 0,617 και 0,697, αντίστοιχα, ενώ η μέση τιμή  $H_e$  ήταν 0,698, 0,923, 0,796 και 0,869, αντίστοιχα. Οι έλεγχοι ισορροπίας HW για τους παραπάνω φυλογενετικούς κλάδους έδειξαν ότι κανένας γενετικός τόπος δε βρίσκεται σε ισορροπία HW ( $P < 0,001$ ) εκτός του Pm16 για τις περιπτώσεις α και β, των Pmeli19 και Pod2 για την περίπτωση γ και των Pmeli19, Pli4 και C9 για την περίπτωση δ. Αντίστοιχα, απουσία αλληλομόρφων (null alleles) παρατηρήθηκε σε όλους τους γενετικούς τόπους για κάθε φυλογενετικό κλάδο εκτός από τις περιπτώσεις των τόπων που δε βρίσκονται σε ισορροπία HW. Αρνητική

τιμή  $F_{IS}$  δεν παρατηρήθηκε για κανένα τόπο σε κανένα φυλογενετικό κλάδο. Απώλεια αλληλομόρφων μεγάλου μήκους (allele dropout) δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν από τους 14 γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν για κανένα φυλογενετικό κλάδο.

Πίνακας 4.2. Περιγραφικά στοιχεία πληθυσμιακής γενετικής για όλα τα δεδομένα και ανά κύριο φυλογενετικό κλάδο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», με εξαίρεση το είδος *P. melisellensis*, το οποίο αποτελείται από μικρό αριθμό δειγμάτων.

Τόπος	N <sub>A</sub> <sup>α</sup>	Όλα τα δεδομένα			<i>P. t. tauricus</i> & <i>P. t. thasopulae</i>			<i>P. t. ionicus</i>			<i>P. gaegeae</i>			<i>P. milensis</i>		
		H <sub>o</sub> <sup>β</sup>	H <sub>e</sub> <sup>γ</sup>	F <sub>IS</sub> <sup>δ</sup>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>
<b>B6</b>	28	0,722	0,921	0,217	0,661	0,837	0,211	0,729	0,947	0,232	0,730	0,914	0,204	0,906	0,909	0,004
<b>C9</b>	31	0,417	0,763	0,454	0,263	0,410	0,359	0,426	0,930	0,544	0,490	0,739	0,339	0,885	0,893	0,001
<b>Lv3-19</b>	22	0,732	0,919	0,204	0,728	0,889	0,181	0,618	0,848	0,273	0,773	0,923	0,164	0,846	0,911	0,072
<b>Lv4-72</b>	26	0,629	0,883	0,291	0,529	0,719	0,2641	0,642	0,923	0,306	0,727	0,924	0,215	0,823	0,895	0,081
<b>Pb10</b>	36	0,655	0,938	0,302	0,715	0,922	0,225	0,191	0,384	0,504	0,686	0,854	0,198	0,708	0,941	0,250
<b>Pb50</b>	15	0,329	0,683	0,609	0,174	0,386	0,549	0,157	0,674	0,768	0,520	0,735	0,295	0,189	0,595	0,685
<b>Pli4</b>	34	0,726	0,949	0,235	0,748	0,931	0,197	0,672	0,942	0,288	0,750	0,947	0,211	0,729	0,898	0,189
<b>Pm16</b>	24	0,776	0,904	0,151	0,819	0,857	0,045	0,717	0,876	0,183	0,704	0,854	0,177	0,769	0,889	0,136
<b>Pm27</b>	36	0,616	0,918	0,329	0,716	0,860	0,168	0,449	0,927	0,517	0,680	0,882	0,231	0,461	0,886	0,481
<b>Pmeli02</b>	45	0,588	0,941	0,375	0,609	0,922	0,340	0,364	0,955	0,623	0,600	0,921	0,352	0,721	0,947	0,241
<b>Pmeli19</b>	45	0,781	0,965	0,191	0,741	0,918	0,193	0,735	0,949	0,227	0,844	0,902	0,065	0,923	0,948	0,027
<b>Pod1A</b>	20	0,136	0,493	0,724	0,045	0,320	0,860	0,191	0,384	0,504	0,038	0,146	0,7381	0,417	0,597	0,304
<b>Pod1B</b>	23	0,329	0,683	0,518	0,214	0,310	0,310	0,380	0,784	0,517	0,333	0,533	0,378	0,674	0,943	0,287
<b>Pod2</b>	32	0,495	0,819	0,395	0,378	0,494	0,235	0,596	0,923	0,356	0,762	0,869	0,126	0,706	0,915	0,230
<b>Μ.Ο. μεταξύ τόπων</b>		0,566	0,841		0,524	0,698		0,491	0,923		0,617	0,796		0,697	0,869	

<sup>α</sup> Για όλα τα δεδομένα<sup>β</sup> H<sub>o</sub>: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία<sup>γ</sup> H<sub>e</sub>: εκτιμώμενη αναμενόμενη ετεροζυγωτία (Nei, 1987)<sup>δ</sup> F<sub>IS</sub>: συντελεστής ομομιξίας βάσει τους Weir and Cockerham (1984)

## 4.2. Πληθυσμιακή δομή

### 4.2.1. Ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE στο σύνολο των δεδομένων

Η στρατηγική ιεραρχικής ανεύρεσης πιθανών ομαδοποιήσεων ανέδειξε το μεγαλύτερο μέρος της πληθυσμιακής δομής και οι αντίστοιχες ομαδοποιήσεις (clusters) αντιστοιχούν σε ικανοποιητικό βαθμό με τους φυλογενετικούς κλάδους και τους δειγματοληπτικούς σταθμούς (Εικ. 4.1). Να σημειωθεί εδώ ότι οι παρακάτω ομαδοποιήσεις που περιγράφονται βασίζονται μονάχα στα άτομα που αντιστοιχούν με μεγάλη πιθανότητα σε κάποια ομαδοποίηση ( $q > 90$ ).

Η πρώτη φάση της ιεραρχικής ομαδοποίησης για το σύνολο των δεδομένων (All\_Data) έδωσε τιμή  $K=2$  (Εικ. 4.1), με την πρώτη ομαδοποίηση (All\_Data\_1) να αντιστοιχεί με τον φυλογενετικό κλάδο *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae* και με τη δεύτερη (All\_Data\_2) να αντιστοιχεί στους υπόλοιπους φυλογενετικούς κλάδους.

Στη δεύτερη φάση, η ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE πραγματοποιήθηκε για κάθε μία από τις δύο ομαδοποιήσεις ξεχωριστά. Η πρώτη διαχωρίστηκε περαιτέρω σε τρεις επιμέρους ομάδες ( $K=3$ ), ενώ η δεύτερη διαιρέθηκε σε τέσσερις ( $K=4$ ) (Εικ. 4.1). Οι τρεις ομάδες της πρώτης ομαδοποίησης, ως επί το πλείστον, αντιστοιχούν σε γεωγραφικά καλά διακριτές ομάδες. Η πρώτη (All\_Data\_1\_1) περιλαμβάνει όλα τα άτομα από τη νησίδα Θασοπούλα που αντιστοιχούν μορφολογικά στο υποείδος *P. t. thasopulae*, καθώς και ένα άτομο *P. t. tauricus* από την ηπειρωτική Ελλάδα (Φέρρες, δείγμα 078). Η δεύτερη (All\_Data\_1\_2) περιλαμβάνει άτομα του υποείδους *P. t. tauricus* που προέρχονται από τα Βαλκάνια (Αλβανία, Βουλγαρία, ΠΓΔΜ, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ρουμανία και Σερβία) και την Τουρκία (Εικ. 4.1). Τέλος, η τρίτη (All\_Data\_1\_3) περιλαμβάνει άτομα του υποείδους *P. t. tauricus* από την ανατολική Ευρώπη (Κριμαία, Ουκρανία και Μολδαβία). Μεταξύ και εντός των δύο τελευταίων ομάδων διακρίνονται άτομα που αντιστοιχούν με χαμηλή τιμή αντιστοίχισης ( $q < 90$ ) στη μία υποομάδα, αλλά γεωγραφικά ανήκουν στην άλλη. Όσον αφορά την ομαδοποίηση All\_Data\_2, οι τέσσερις ομάδες αντιστοιχούν (Εικ. 4.1):

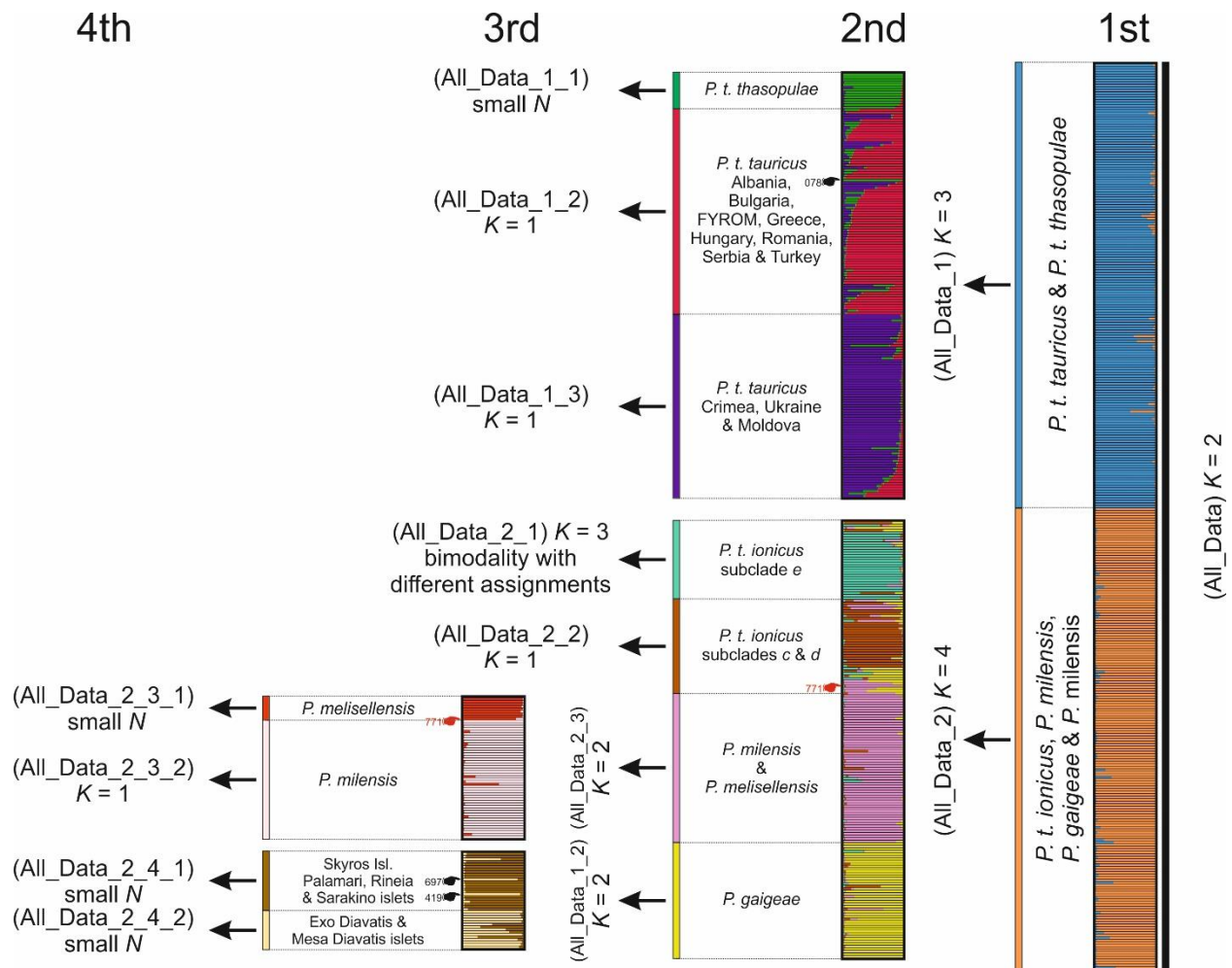


(α) στον υποκλάδο *e* του taxon *P. t. ionicus* (All\_Data\_2\_1), (β) στους υποκλάδους *c* και *d* του taxon *P. t. ionicus* (All\_Data\_2\_2), (γ) στα είδη *P. milensis* και *P. melisellensis* (All\_Data\_2\_3), στο οποίο cluster συμπεριλαμβάνεται και ένα άτομο του υποκλάδου *a* του taxon *P. t. ionicus* (Ζάκυνθος, δείγμα 771), και (δ) στο είδος *P. gaigeae* (All\_Data\_2\_4). Να σημειωθεί ότι κανένα άτομο που ανήκει στους φυλογενετικούς υποκλάδους *a* και *b* του taxon *P. t. ionicus* δεν αντιστοιχεί με μεγάλο συντελεστή συμμετοχής  $q$  σε κάποια από τις παραπάνω ομάδες (σε όλες τις περιπτώσεις  $q < 90$ ). Στην Εικόνα 4.1 τα άτομα αυτά, με ενδιάμεσες τιμές  $q$ , διακρίνονται εντός της ομάδας All\_Data\_2\_2.

Το τρίτο βήμα της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE που πραγματοποιήθηκε μόνο για όσες ομάδες αποτελούνταν από ικανοποιητικό αριθμό ατόμων, είχε ως αποτέλεσμα, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τη μη περαιτέρω ανεύρεση πληθυσμιακής δομής ( $K=1$ ). Εξαιρέση αποτέλεσαν οι υποομάδες All\_Data\_2\_1, All\_Data\_2\_3 και All\_Data\_2\_4. Η πρώτη φαίνεται να αποτελείται από τρεις επιμέρους ομάδες ( $K=3$ ), ωστόσο υπήρξαν περισσότερες της μίας ισοπίθανες λύσεις όσον αφορά την αντιστοίχιση ατόμων στις ομάδες αυτές (multimodality). Η δεύτερη διχοτομήθηκε σε δύο επιμέρους ομάδες ( $K=2$ ), οι οποίες αντιστοιχούν στα είδη *P. melisellensis* (All\_Data\_2\_3\_1) και *P. milensis* (All\_Data\_2\_3\_2), με το δείγμα 771 του υποκλάδου *a* του taxon *P. t. ionicus* να τοποθετείται με τιμή  $q < 90$  στην επιμέρους ομάδα All\_Data\_2\_3\_1 (Εικ. 4.1). Ομοίως, η υποομάδα All\_Data\_2\_4 που ταυτίζεται με το είδος *P. gaigeae*, διαχωρίστηκε επίσης σε δύο επιμέρους ομάδες ( $K=2$ ) με την πρώτη (All\_Data\_2\_4\_1) να αποτελείται από δείγματα προερχόμενα από τη Σκύρο και τις νησίδες Παλαμάρι, Ρήνεια και Σαρακινό και τη δεύτερη (All\_Data\_2\_4\_2) από δείγματα των νησίδων Έξω και Μέσα Διαβάτης, καθώς επίσης και από ένα δείγμα από τη νησίδα Παλαμάρι (δείγμα 419) και ένα δείγμα από τη Σκύρο από μια περιοχή απέναντι από τη νησίδα Παλαμάρι (δείγμα 697) (Εικ. 4.1).

Τέλος, το τέταρτο βήμα της παραπάνω ανάλυσης πραγματοποιήθηκε μόνο για την επιμέρους ομάδα All\_Data\_2\_3\_2 που αποτελείτο από επαρκή αριθμό ατόμων, ωστόσο το αποτέλεσμα έδειξε ότι δεν ήταν δυνατή η εύρεση πληθυσμιακής δομής εντός αυτής ( $K=1$ ).

Οι τιμές  $H_o$ ,  $H_e$  και  $F_{IS}$  για κάθε μία από τις εννέα τελικές συναθροίσεις (All\_Data\_1\_1, All\_Data\_1\_2, All\_Data\_1\_3, All\_Data\_2\_1, All\_Data\_2\_2, All\_Data\_2\_3\_1, All\_Data\_2\_3\_2, All\_Data\_2\_4\_1 και All\_Data\_2\_4\_2) της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE με βάση το σύνολο των δεδομένων δίνονται στους Πίνακες 4.3 – 4.3. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι τιμές  $F_{IS}$  ήταν θετικές, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Απόκλιση από την ισορροπία HW παρατηρήθηκε στην πλειονότητα των παραπάνω ομαδοποιήσεων με καλή στατιστική υποστήριξη ( $P < 0,05$ ). Ο αριθμός των γενετικών τόπων όπου παρατηρήθηκαν μηδενικά αλληλόμορφα κυμάνθηκε από δύο (All\_Data\_1\_1) έως εννιά (All\_Data\_2\_1). Τέλος, απώλεια μεγάλου μήκους αλληλομόρφων δεν παρατηρήθηκε σε κανένα γενετικό τόπο σε καμία από τις παραπάνω τελικές συναθροίσεις. Οι ανά ζεύγη τιμές  $F_{ST}$  των τελικών ομαδοποιήσεων δίνονται στον Πίνακα 4.5.



Εικόνα 4.1 Η εκτιμώμενη πληθυσμιακή δομή για το σύνολο των δεδομένων της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» έπειτα από τέσσερα βήματα ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE. Κάθε άτομο αντιπροσωπεύεται από μια λεπτή οριζόντια γραμμή, η οποία αποτελείται από K αριθμό χρωμάτων, αντιπροσωπεύοντας το ποσοστό εκτιμώμενης αντιστοιχίας του ατόμου σε κάθε μια από τις K ομάδες. Τα βέλη οριοθετούν τη διαδικασία της ιεραρχικής προσέγγισης, όπου υποομάδες δεδομένων αναλύονται περαιτέρω. Τα σύμβολα τύπου «δείκτης» υποδεικνύουν συγκεκριμένα δείγματα με ενδιαφέρουσα ομαδοποίηση, τα οποία συζητούνται εντός του κειμένου.

Πίνακας 4.3. Περιγραφικά στοιχεία πληθυσμιακής γενετικής για πέντε από τις τελικές συναθροίσεις της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE με βάση το σύνολο των δεδομένων.

Τόπος	All_Data_1_1			All_Data_1_2			All_Data_1_3			All_Data_2_1			All_Data_2_2		
	H <sub>o</sub> <sup>α</sup>	H <sub>e</sub> <sup>β</sup>	F <sub>IS</sub> <sup>γ</sup>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>
<b>B6</b>	0,461	0,735	0,382	0,523	0,587	0,111	0,781	0,898	0,132	0,809	0,912	0,115	0,800	0,929	0,142
<b>C9</b>	0,538	0,471	-0,151	0,067	0,066	-0,015	0,364	0,663	0,456	0,091	0,922	0,906	0,611	0,913	0,337
<b>Lv3-19</b>	0,538	0,452	-0,200	0,717	0,869	0,176	0,697	0,905	0,232	0,238	0,226	-0,053	0,684	0,796	0,144
<b>Lv4-72</b>	0,385	0,415	0,077	0,289	0,335	0,139	0,75	0,873	0,143	0,454	0,831	0,459	0,889	0,873	-0,0187
<b>Pb10</b>	0,667	0,783	0,154	0,714	0,900	0,208	0,800	0,907	0,120	0,235	0,902	0,745	0,454	0,385	-0,190
<b>Pb50</b>	0,308	0,674	0,553	0,089	0,874	-0,017	0,212	0,402	0,477	0,000	0,241	1,000	0,368	0,698	0,479
<b>Pli4</b>	0,538	0,898	0,410	0,703	0,880	0,204	0,833	0,934	0,109	0,524	0,835	0,378	0,789	0,872	0,097
<b>Pm16</b>	0,615	0,689	0,111	0,930	0,840	-0,109	0,788	0,824	0,045	0,818	0,871	0,062	0,600	0,867	0,333
<b>Pm27</b>	0,846	0,843	-0,004	0,75	0,804	0,068	0,667	0,861	0,228	0,364	0,738	0,513	0,500	0,782	0,367
<b>Pmeli02</b>	0,500	0,574	0,135	0,571	0,941	0,396	0,808	0,918	0,123	0,583	0,909	0,369	0,000	0,714	1,000
<b>Pmeli19</b>	0,846	0,791	-0,073	0,622	0,722	0,139	0,818	0,892	0,084	0,619	0,920	0,332	0,947	0,929	-0,020
<b>Pod1A</b>	0,000	0,000	n.a.	0,068	0,382	0,823	0,069	0,222	0,693	0,071	0,204	0,658	0,454	0,385	-0,190
<b>Pod1B</b>	0,077	0,077	0,000	0,109	0,142	0,237	0,364	0,570	0,366	0,454	0,626	0,278	0,000	0,097	1,000
<b>Pod2</b>	0,385	0,560	0,322	0,395	0,414	0,045	0,4375	0,691	0,371	0,474	0,806	0,419	0,778	0,9142	0,153
<b>M.O. μεταξύ τόπων</b>	0,479	0,569		0,468	0,414		0,599	0,754		0,410	0,710				

<sup>α</sup> H<sub>o</sub>: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία<sup>β</sup> H<sub>e</sub>: εκτιμώμενη αναμενόμενη ετεροζυγωτία (Nei, 1987)<sup>γ</sup> F<sub>IS</sub>: συντελεστής ομομιξίας βάσει τους Weir and Cockerham (1984)<sup>δ</sup> n.a.: μη δυνατός υπολογισμός

Πίνακας 4.4. Περιγραφικά στοιχεία πληθυσμιακής γενετικής για τέσσερις από τις τελικές συναθροίσεις της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE με βάση το σύνολο των δεδομένων.

Τόπος	All_Data_2_3_1			All_Data_2_3_2			All_Data_2_4_1			All_Data_2_4_2		
	H <sub>o</sub> <sup>α</sup>	H <sub>e</sub> <sup>β</sup>	F <sub>IS</sub> <sup>γ</sup>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>
B6	0,875	0,933	0,067	0,930	0,918	-0,014	0,900	0,888	-0,013	0,750	0,735	-0,021
C9	0,000	0,500	1,000	0,884	0,912	0,031	0,526	0,603	0,130	0,500	0,580	0,143
Lv3-19	0,875	0,833	-0,054	0,884	0,901	0,020	0,750	0,919	0,189	1,000	0,884	-0,139
Lv4-72	0,600	0,844	0,314	0,837	0,892	0,062	0,706	0,877	0,200	0,636	0,835	0,247
Pb10	0,167	0,924	0,833	0,732	0,940	0,224	0,842	0,866	0,029	0,583	0,496	-0,185
Pb50	0,500	0,442	-0,143	0,186	0,588	0,686	0,684	0,750	0,089	0,417	0,594	0,308
Pli4	0,500	0,833	0,500	0,775	0,887	0,128	0,750	0,960	0,224	0,571	0,736	0,238
Pm16	0,750	0,875	0,151	0,860	0,892	0,035	0,789	0,789	0,000	0,667	0,686	0,030
Pm27	0,500	0,883	0,451	0,512	0,884	0,424	0,600	0,922	0,355	0,750	0,670	-0,125
Pmeli02	0,600	0,822	0,294	0,735	0,942	0,222	0,800	0,940	0,154	0,500	0,816	0,400
Pmeli19	0,875	0,942	0,075	0,930	0,944	0,015	0,850	0,883	0,039	0,900	0,821	-0,102
Pod1A	0,500	0,608	0,188	0,461	0,525	0,1225	0,000	0,000	n.a. <sup>δ</sup>	0,454	0,498	0,091
Pod1B	0,429	0,681	0,390	0,703	0,936	0,252	0,235	0,456	0,492	0,083	0,083	0,000
Pod2	0,500	0,825	0,410	0,732	0,928	0,213	0,900	0,858	-0,052	1,000	0,833	-0,333
Μ.Ο. μεταξύ τόπων	0,548	0,782		0,726	0,863		0,667	0,765		0,629	0,833	

<sup>α</sup> H<sub>o</sub>: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία<sup>β</sup> H<sub>e</sub>: εκτιμώμενη αναμενόμενη ετεροζυγωτία (Nei, 1987)<sup>γ</sup> F<sub>IS</sub>: συντελεστής ομομιξίας βάσει τους Weir and Cockerham (1984)<sup>δ</sup> n.a.: μη δυνατός υπολογισμός

Πίνακας 4.5. Συντελεστής διαφοροποίησης  $F_{st}$  (Weir and Cockerham, 1984) ανά ζεύγος τελικών ομαδοποιήσεων της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE για το σύνολο των δεδομένων. Οι αστερισκοί δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικής υποστήριξης (\*\* $P < 0,001$ , \* $P < 0,01$ ) ύστερα από 1.000 permutations.

Τελική Ομαδοποίηση	1	2	3	4	5	6	7	8
1.All_Data_2_4_2								
2.All_Data_2_4_1	0,099***							
3.All_Data_2_3_2	0,154***	0,127***						
4.All_Data_2_3_1	0,244**	0,165**	0,125***					
5.All_Data_2_2	0,165***	0,138***	0,130***	0,192**				
6.All_Data_2_1	0,213**	0,146***	0,148***	0,154**	0,187***			
7.All_Data_1_1	0,272**	0,194***	0,200***	0,257**	0,203***	0,254***		
8.All_Data_1_3	0,273***	0,217***	0,223***	0,306***	0,226***	0,295***	0,202***	
9.All_Data_1_2	0,148***	0,101***	0,118***	0,168***	0,116***	0,150***	0,116***	0,090***

#### 4.2.2. Ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE ανά φυλογενετικό κλάδο

Η ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE πραγματοποιήθηκε για κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο ξεχωριστά, με εξαίρεση το είδος *P. melisellensis*, το οποίο δεν αποτελούταν από επαρκή αριθμό ατόμων. Στην Εικόνα 4.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όλων των βημάτων για τους υπόλοιπους κύριους φυλογενετικούς κλάδους, με εξαίρεση το είδος *P. milensis*, για το οποίο το αποτέλεσμα του πρώτου βήματος ήταν  $K=1$ .

Το πρώτο βήμα ιεραρχικής ομαδοποίησης για το είδος *P. gaiageae* έδωσε ως πιο πιθανή λύση την τιμή  $K=3$  (Εικ. 4.2). Η ομαδοποίηση που προέκυψε έχει μικρές διαφορές με αυτή της δεύτερης φάσης της προηγούμενης ανάλυσης, με κάποια επιπλέον άτομα που προηγουμένως είχαν αφαιρεθεί να προστίθενται στις δύο υποομάδες (Gaiageae\_1 και Gaiageae\_3) και τρία επιπλέον άτομα να διαμορφώνουν μια διακριτή υποομάδα (Gaiageae\_2). Η δεύτερη φάση της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε μόνο για την υποομάδα Gaiageae\_1 (Εικ. 4.2), η οποία αποτελούταν από επαρκή αριθμό ατόμων, ωστόσο το αποτέλεσμα της έδειξε ότι στη συγκεκριμένη υποομάδα δε διακρίνεται περαιτέρω πληθυσμιακή δομή ( $K=1$ ).

Ομοίως, για τον φυλογενετικό κλάδο *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae* το πρώτο βήμα της παραπάνω ανάλυσης έδωσε ως βέλτιστη λύση την τιμή  $K=3$  (Εικ. 4.2). Οι τρεις υποομάδες (Tauricus\_1, Tauricus\_2 και Tauricus\_3) ταυτίζονται με τις τρεις υποομάδες της δεύτερης φάσης της προηγούμενης ανάλυσης (All\_Data\_1\_1, All\_Data\_1\_2, και All\_Data\_1\_3) με τη διαφορά ότι έχει προστεθεί μικρός αριθμός ατόμων που είχαν αφαιρεθεί σε προηγούμενο στάδιο. Στη δεύτερη φάση της ανάλυσης, η οποία δεν πραγματοποιήθηκε για την υποομάδα Tauricus\_1 λόγω μικρού μεγέθους δείγματος, το αποτέλεσμα έδειξε την έλλειψη πληθυσμιακής δομής εντός της υποομάδας Tauricus\_2 ( $K=1$ ) (Εικ. 4.2), αλλά την ύπαρξη δύο επιμέρους ομάδων εντός της υποομάδας Tauricus\_3 (Εικ. 4.2) με ασαφή γεωγραφική κατανομή. Η πρώτη (Tauricus\_3\_1)

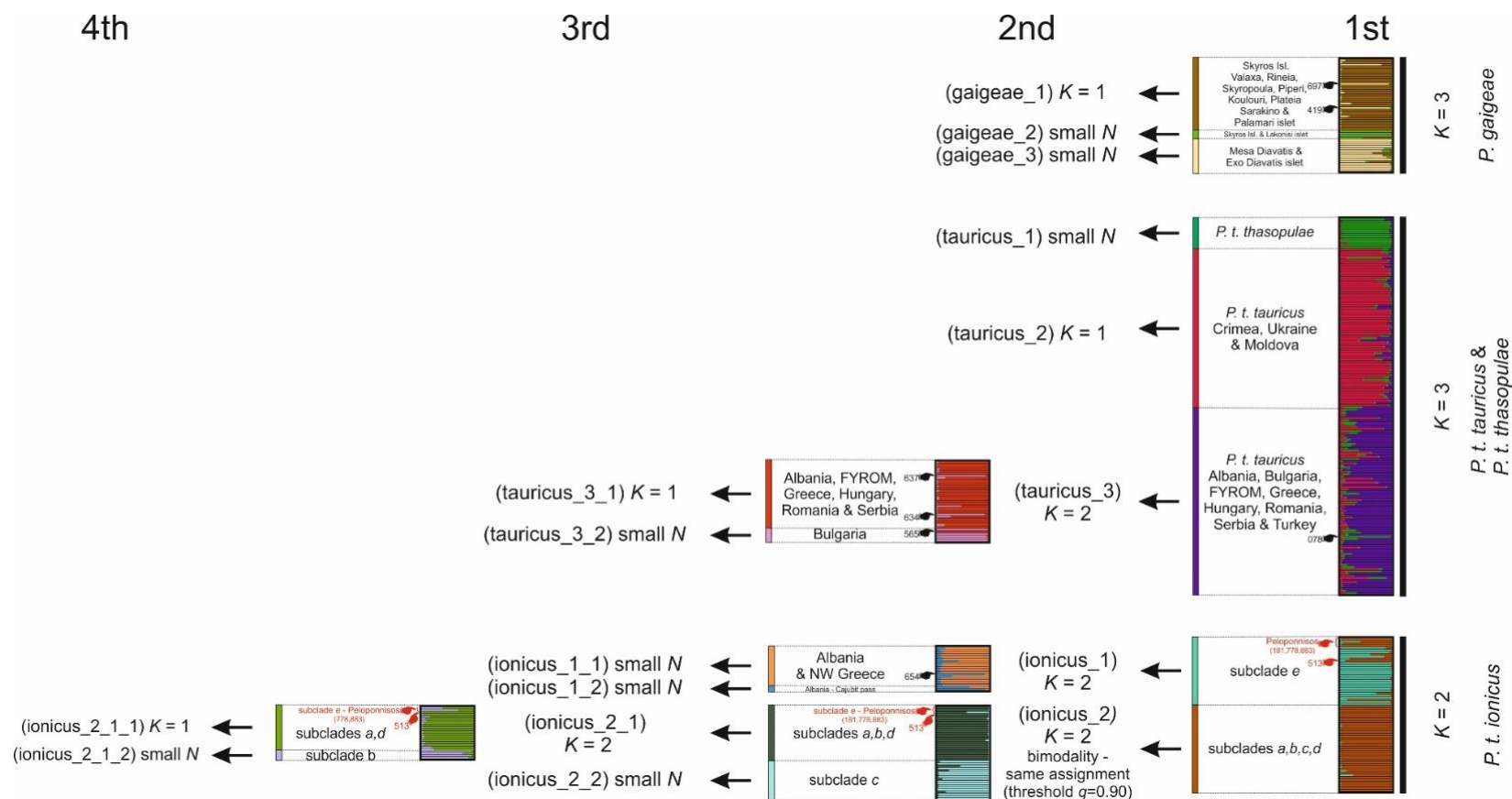
περιλαμβάνει την πλειονότητα του συνόλου των ατόμων με καταγωγή από Αλβανία, Βουλγαρία (δείγμα 565), ΠΓΔΜ, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ρουμανία και Σερβία, ενώ η δεύτερη (*Tauricus\_3\_2*) αποτελείται κυρίως από άτομα από τη Βουλγαρία καθώς και από ένα άτομο από την ΠΓΔΜ (δείγμα 634) και ένα από την Ουγγαρία (δείγμα 637). Το αποτέλεσμα της τρίτης φάσης της ανάλυσης (Εικ. 4.2) για την επιμέρους ομάδα *Tauricus\_3\_1* έδειξε ότι αποτελεί ενιαία ομάδα ( $K=1$ ), ενώ για την επιμέρους ομάδα *Tauricus\_3\_2* τα δείγματα δεν ήταν επαρκή αριθμητικά.

Τέλος, η πρώτη φάση της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE για τον φυλογενετικό κλάδο *P. t. ionicus* έδωσε ως καλύτερη λύση την τιμή  $K=2$  (Εικ. 4.2), διχοτομώντας τα δεδομένα σε μια ομαδοποίηση (*Ionicus\_1*) που περιλαμβάνει όλα τα άτομα του φυλογενετικού υποκλάδου *e*, με εξαίρεση όμως τα άτομα που προέρχονται από την Πελοπόννησο (δείγματα 181, 778 και 883), καθώς και ένα άτομο από τη βορειοδυτική Ελλάδα (Όρος Νεμέρτσικα, δείγμα 513) και σε μια δεύτερη (*Ionicus\_2*) που αντιστοιχεί σε γενικές γραμμές με τους φυλογενετικούς υποκλάδους *a, b, c* και *d*. Στη δεύτερη φάση, η καλύτερη λύση φάνηκε να είναι η τιμή  $K=2$  και για τις δύο παραπάνω ομαδοποιήσεις (Εικ. 4.2), σημειώνοντας όμως πως για την ομαδοποίηση *Ionicus\_2* ανιχνεύτηκε φαινόμενο label switching, ύπαρξη δηλαδή δύο εξίσου ισοπίθανων λύσεων, οι οποίες όμως δεν είχαν ως αποτέλεσμα τη διαφορετική αντιστοίχιση των ατόμων με τιμή συμμετοχής  $q > 90$ , επιτρέποντας τον σαφή διαχωρισμό των ατόμων σε ομάδες και τη συνέχιση της διαδικασίας σε επόμενο βήμα. Η ομαδοποίηση *Ionicus\_1* διαχωρίστηκε σε μία ομάδα (*Ionicus\_1\_1*) που περιλαμβάνει την πλειονότητα των δειγμάτων με καταγωγή από την Αλβανία και τη βορειοδυτική Ελλάδα, και σε μία ομάδα (*Ionicus\_1\_2*) που περιλαμβάνει τον πληθυσμό από το Cajorit της Αλβανίας και ένα δείγμα από το Kodër της ίδιας χώρας (δείγμα 654), ενώ τα υπόλοιπα δείγματα από την ίδια περιοχή ομαδοποιούνται με την άλλη ομάδα. Οι δύο παραπάνω ομάδες ήταν μικρές σε αριθμό ατόμων για τη συνέχιση της διαδικασίας σε επόμενο βήμα. Εντός της ομαδοποίησης *Ionicus\_2*, η ομάδα *Ionicus\_2\_1* περιέχει άτομα που αντιστοιχούν με τους φυλογενετικούς υποκλάδους *a, b* και *d*, καθώς και τα τέσσερα άτομα του φυλογενετικού υποκλάδου *e* που



προαναφέρθηκαν, ενώ η ομάδα *Ionicus\_2\_2* αντιστοιχεί στον φυλογενετικό υποκλάδο *c*. Η τελευταία ομάδα δεν εμπειρίχε ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων για την εφαρμογή επακόλουθου βήματος ανάλυσης STRUCTURE, ωστόσο στην ομάδα *Ionicus\_2\_1* που εφαρμόστηκε επιπλέον βήμα, το αποτέλεσμα έδειξε την ύπαρξη δύο υποομάδων ( $K=2$ ) (Εικ. 4.2). Η πρώτη (*Ionicus\_2\_1\_1*) περιέχει άτομα που αντιστοιχούν στους φυλογενετικούς κλάδους *a* και *d* και τρία από τα άτομα του υποκλάδου *e*, ενώ η δεύτερη (*Ionicus\_2\_1\_2*) αντιστοιχεί με τον υποκλάδο *b*. Για την τελευταία, ο μικρός αριθμός των δειγμάτων δεν επέτρεψε τη συνέχιση της διαδικασίας σε επόμενο βήμα, ενώ για την πρώτη το αποτέλεσμα δεν έδειξε περαιτέρω υποδιαίρεση ( $K=1$ ).

Οι τιμές  $F_{st}$  ανά ζεύγη τελικών ομαδοποιήσεων μόνο για τον φυλογενετικό κλάδο *P. t. ionicus* εμφανίζονται στον Πίνακα 4.6. Για τους υπόλοιπους φυλογενετικούς κλάδους οι τιμές δεν παρουσιάζονται καθώς οι ομαδοποιήσεις που εντοπίζονται ανά φυλογενετικό κλάδο δε διαφέρουν σημαντικά από τις ομαδοποιήσεις της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE με βάση το σύνολο των δεδομένων.



Εικόνα 4.2 Η εκτιμώμενη πληθυσμιακή δομή για τα είδη της υποομάδας «*P. tauricus*» (εκτός του είδους *P. melisellensis*) έπειτα από τέσσερα βήματα ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE. Αποτέλεσμα για το είδος *P. milensis*:  $K=1$ . Κάθε άτομο αντιπροσωπεύεται από μια λεπτή οριζόντια γραμμή, η οποία αποτελείται από  $K$  αριθμό χρωμάτων, αντιπροσωπεύοντας το ποσοστό εκτιμώμενης αντιστοιχίας του ατόμου σε κάθε μια από τις  $K$  ομάδες. Τα βέλη οριοθετούν τη διαδικασία της ιεραρχικής προσέγγισης, όπου υποομάδες δεδομένων αναλύονται περαιτέρω. Τα σύμβολα τύπου «δείκτης» υποδεικνύουν συγκεκριμένα δείγματα με ενδιαφέρουσα ομαδοποίηση, τα οποία συζητούνται εντός του κειμένου.

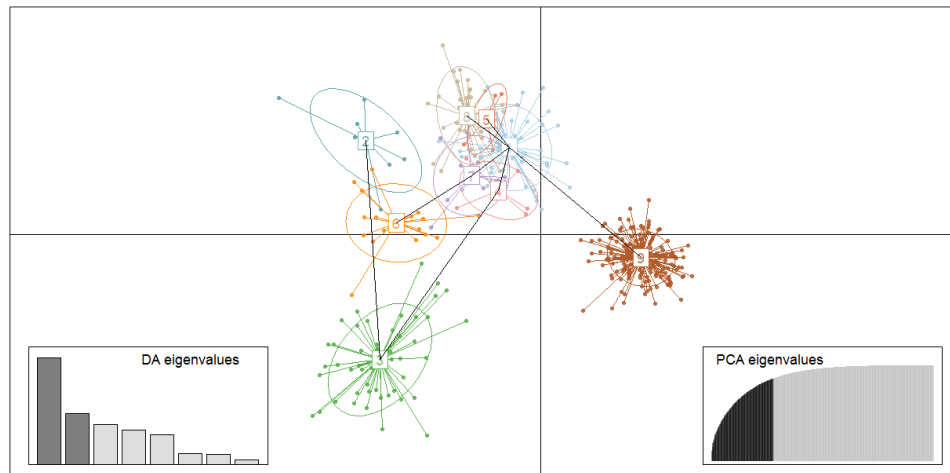
Πίνακας 4.6. Συντελεστής ομομιξίας  $F_{st}$  (Weir and Cockerham, 1984) ανά ζεύγος τελικών (επιλεγμένων) ομαδοποιήσεων της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE για το ταχον *P. t. ionicus*. Οι αστερίσκοι δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικής υποστήριξης (\*\*\*) ύστερα από 1.000 επαναλήψεις (permutations).

Τελική Ομαδοποίηση	1	2	3
1. ionicus_1			
2. ionicus_2_2	0,234***		
3. ionicus_2_1_2	0,196***	0,214***	
4. ionicus_2_1_1	0,147***	0,128***	0,100 <sup>n.s.</sup>

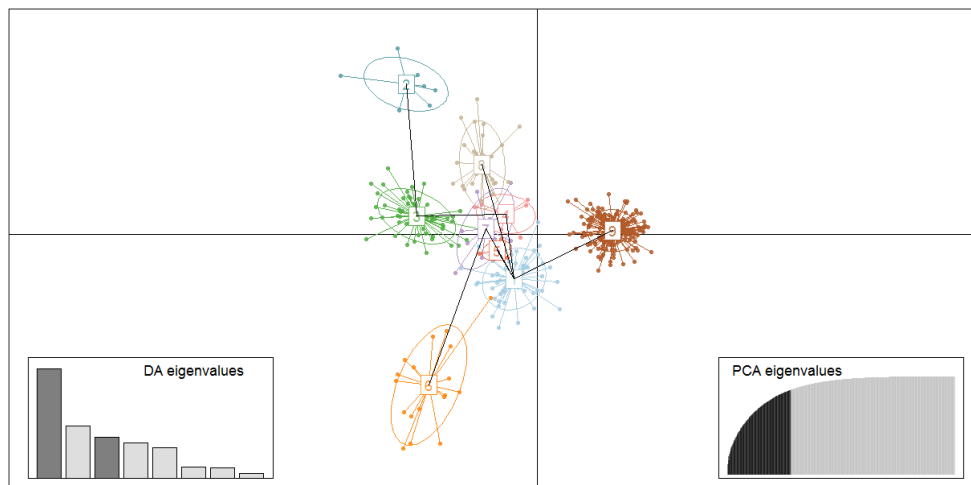
<sup>n.s.</sup>: μη στατιστικά σημαντική τιμή

### 4.3. Διάκριση ομάδων βάσει της ανάλυσης DAPC

Ο απαιτούμενος αριθμός PC που παρέμειναν στην ανάλυση ήταν 50, ενώ οκτώ κύριες συναρτήσεις διάκρισης (discriminant function, DF) φαίνεται να περιγράφουν την παρατηρούμενη ποικιλομορφία των συγκεκριμένων μικροδορυφορικών δεδομένων. Στις Εικόνα 4.3 δίνονται σε γράφημα τα αποτελέσματα της ανάλυσης DAPC για τις δύο σημαντικότερες συναρτήσεις και, αντίστοιχα, στην Εικόνα 4.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βάσει της πρώτης και της τρίτης κύριας συνάρτησης. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα «DA eigenvalues» που είναι ενσωματωμένο στις δύο παραπάνω εικόνες, το μεγαλύτερο ποσοστό της ποικιλότητας περιγράφεται από την πρώτη συνάρτηση. Στην Εικόνα 4.3 φαίνεται ότι υπάρχει διάκριση μεταξύ των περισσότερων φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων της υποομάδας «*P. tauricus*», χωρίς όμως να μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ του είδους *P. gageae* και των φυλογενετικών υποκλάδων *a*, *b*, *d* και *e* του ταχον *P. t. ionicus*. Ωστόσο, ως ένα βαθμό η διάκριση αυτή επιτυγχάνεται όταν συγκρίνεται η πρώτη συνάρτηση με την τρίτη (Εικ. 4.4). Σε αυτήν την περίπτωση το είδος *P. gageae*, καθώς και ο φυλογενετικός υποκλάδος *e* ξεχωρίζουν, με τους υποκλάδους *a*, *b* και *c* να παραμένουν επικαλυπτόμενοι.



Εικόνα 4.3. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC με βάση την πρώτη (άξονας x) και τη δεύτερη (άξονας y) σημαντικότερη συνάρτηση διάκρισης (discriminant function, DF) στην περιγραφή της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας. Η επίδραση της κάθε συνάρτησης στο σύνολο της ποικιλομορφίας φαίνεται στο διάγραμμα ιδιοτιμών «DA eigenvalues». 1: *P. gaigeae*, 2: *P. melisellensis*, 3: *P. milensis*, 4: *P. t. ionicus* subclade a, 5: *P. t. ionicus* subclade b, 6: *P. t. ionicus* subclade c, 7: *P. t. ionicus* subclade d, 8: *P. t. ionicus* subclade e, 9: *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae*.



Εικόνα 4.4. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC με βάση την πρώτη (άξονας x) και την τρίτη (άξονας y) σημαντικότερη συνάρτηση διάκρισης (discriminant function, DF) στην περιγραφή της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας. Η επίδραση της κάθε συνάρτησης στο σύνολο της ποικιλομορφίας φαίνεται στο διάγραμμα ιδιοτιμών «DA eigenvalues». Για την αντιστοίχιση των ομάδων με τα χρώματα βλ. Εικ.4.4.

## 5. Συζήτηση

Το στατιστικά σημαντικό έλλειμμα ετεροζυγωτίας που παρατηρήθηκε σε όλους τους μικροδορυφορικούς τόπους για το σύνολο των δεδομένων μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη πληθυσμιακής δομής, στην ύπαρξη αλληλομορφικών ελλείψεων ή και στα δύο (Antonίου et al., 2013). Η ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων είναι πιθανή και αναμένεται λόγω του ότι στην παρούσα μελέτη ο πολλαπλασιασμός των γενετικών τόπων έγινε για συγγενικά είδη και όχι για ένα συγκεκριμένο είδος (Antonίου et al., 2013). Ωστόσο, η μείωση του αριθμού των γενετικών τόπων που εμφανίζουν μηδενικά αλληλόμορφα, η οποία παρατηρήθηκε εντός των τελικών ομαδοποιήσεων υποδεικνύει την ύπαρξη πληθυσμιακής δομής (Antonίου et al., 2013). Βέβαια, δεν αποκλείεται να ισχύουν και οι δύο παραπάνω υποθέσεις, με ένα μέρος των μηδενικών αλληλομόρφων να οφείλεται στην ύπαρξη πληθυσμιακής δομής και ένα άλλο σε προβλήματα που σχετίζονται με τη μέθοδο PCR ή τη διαδικασία της γονοτύπησης. Δεδομένης, όμως, της ύπαρξης ανισορροπίας Hardy-Weinberg σε όλους τους γενετικούς τόπους στο σύνολο των δεδομένων, είναι πολύ πιθανό η περίσσεια ετεροζυγωτίας να αποτελεί σημάδι ύπαρξης πληθυσμιακής δομής (She et al., 1987).

Στο σύνολό τους οι αναλύσεις εκτίμησης πληθυσμιακής δομής φαίνεται να συγκλίνουν στην ύπαρξη ενός γενικού προτύπου, με τις όποιες ασυμφωνίες που παρατηρούνται να σχετίζονται με συγκεκριμένα άτομα. Ουσιαστικά, αναγνωρίζονται αρκετές ομάδες που αντιστοιχούν με κάποιον από τους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

Ο φυλογενετικός κλάδος *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae*, αντιστοιχεί σε μια αρκετά διακριτή ομάδα (All\_Data\_1), όπως φανερώνει τόσο η ανάλυση STRUCTURE (Εικ. 4.1), όσο και η ανάλυση DAPC (Εικ. 4.3-4.4), με ελάχιστα άτομα του παραπάνω φυλογενετικού κλάδου να μην αντιστοιχούν στατιστικά σημαντικά στην εκτιμώμενη ομάδα. Τόσο το δεύτερο βήμα της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE σε όλα τα δεδομένα (Εικ. 4.1) όσο και η ανάλυση STRUCTURE στον παραπάνω φυλογενετικό κλάδο (Εικ. 4.2)

αναγνώρισαν την ύπαρξη περαιτέρω διαφοροποίησης σε τρεις υποομάδες. Η εύρεση επιπρόσθετης πληθυσμιακής δομής σε σχέση με τα δεδομένα mtDNA, τα οποία εμφανίζουν τον φυλογενετικό κλάδο αυτό να έχει δομή «χτένας» χαρακτηριζόμενος από ελάχιστη γενετική ποικιλομορφία, υπογραμμίζει τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα που έχουν οι μικροδορυφόροι ως γενετικοί δείκτες (Hoshino et al., 2012). Μεταξύ των παραπάνω υποομάδων υπάρχει γεωγραφική διαφοροποίηση σε έναν άξονα Ανατολής-Δύσης. Τέλος, όσον αφορά την αναγνώριση του υποείδους *P. t. thasopulae* ως σχεδόν διακριτή συνάθροιση και από τις δύο αναλύσεις STRUCTURE (All\_Data\_1\_1 ή tauricus\_1), αυτό ίσως σχετίζεται με το γεγονός ότι τα άτομα του υποείδους ενδημούν σε μια μικρή νησίδα (Θασοπούλα) με αποτέλεσμα η τυχαία γενετική παρέκκλιση να έχει επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό τη γενετική ποικιλότητα του συγκεκριμένου πληθυσμού. Κανείς θα μπορούσε να εικάσει ότι μέσω του φαινομένου ιδρυτή η παρατηρούμενη γενετική «δεξαμενή» της νησίδας αποτελεί υποσύνολο της αντίστοιχης ηπειρωτικής. Ωστόσο, τα ιδρυτικά φαινόμενα μπορούν να μελετηθούν μόνο παρατηρώντας την εξέλιξη ενός πληθυσμού στο χρόνο, κάνοντας δύσκολη την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων.

Ο φυλογενετικός κλάδος που ταυτίζεται με το είδος *P. gaiageae* αποτελεί επίσης διακριτή ομάδα (All\_Data\_2\_4, Εικ. 4.1), όπως μαρτυρά το αποτέλεσμα της δεύτερης φάσης της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE, αλλά και η ανάλυση DAPC με βάση την πρώτη και τη δεύτερη σημαντικότερη συνάρτηση διάκρισης (Εικ. 4.4). Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλο ποσοστό αμιγών ατόμων ( $q > 0,90$ ) με ελάχιστα άτομα να μην έχουν σαφή αντιστοιχία. Η περαιτέρω διαφοροποίησή της σε υποομάδες φανερώνει ένα κοινό πρότυπο μεταξύ των δύο αναλύσεων STRUCTURE, με τους πληθυσμούς από τις νησίδες Μέσα και Έξω Διαβάτης και τα δείγματα 419 και 697 (από τη νησίδα Παλαμάρι και την αντίστοιχη περιοχή Παλαμάρι της Σκύρου) να αναγνωρίζονται ως διακριτή υποομάδα (All\_Data\_2\_4\_2, Εικ. 4.1 και gaiageae\_3, Εικ. 4.2) και τα υπόλοιπα άτομα από τη Σκύρο και τις λοιπές νησίδες τα ομαδοποιούνται σε μία (All\_Data\_2\_4\_1, Εικ. 4.1) ή δύο (gaiageae\_1 και gaiageae\_2, Εικ. 4.2) επιπλέον υποομάδες. Η διαφοροποίηση αυτή

βασίζεται μόνο στα αμιγή άτομα, καθώς υπάρχουν αρκετά δείγματα που δεν μπορούν να αντιστοιχηθούν με μεγάλη ασφάλεια σε κάποια από τις παραπάνω υποομάδες. Το πρότυπο αυτό δείχνει ότι είτε υπάρχει γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών κάποιων νησίδων και του κεντρικού νησιού, καθώς και μεταξύ νησίδων, είτε ότι οι πληθυσμοί είναι πρόσφατα απομονωμένοι και δεν έχουν προλάβει να διαφοροποιηθούν. Να σημειωθεί όμως ότι κάποιες νησίδες αντιπροσωπεύονται από ένα ή δύο δείγματα κάνοντας δύσκολη έτσι τη διάκρισή τους. Σε αντίστοιχη μελέτη για το είδος αυτό (Runemark et al., 2012) κάνοντας χρήση 11 μικροδορυφορικών τόπων, αλλά με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων ανά νησίδα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει γονιδιακή ροή μεταξύ των νησίδων (υπάρχει μόνο μεταξύ του κεντρικού νησιού και της απομακρυσμένης νησίδας Πιπέρι) ως αποτέλεσμα του κατακερματισμού του νησιωτικού συγκροτήματος της Σκύρου στο τέλος του Πλειστοκαίνου.

Όπως οι προαναφερόμενες περιπτώσεις, έτσι και οι φυλογενετικοί κλάδοι που ταυτίζονται με τα είδη *P. milensis* και *P. melisellensis* αποτελούν επίσης διακριτές ομάδες (All\_Data\_2\_3\_1 και All\_Data\_2\_3\_2, αντιστοίχως Εικ. 4.1), όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της τρίτης φάσης της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE και της ανάλυσης DAPC (Εικ. 4.3-4.4). Η ομάδες αυτές είναι αρκετά ομοιογενείς με μεγάλο ποσοστό αμιγών ατόμων και ταυτόχρονα έλλειψη διαφοροποίησης σε υποομάδες. Ενδιαφέρον προκαλεί η τοποθέτηση στην ομάδα All\_Data\_2\_3\_2 του δείγματος 771 από τη νήσο Ζάκυνθο που ανήκει φυλογενετικά στον υποκλάδο *a* του taxon *P. t. ionicus*. Δεδομένου ότι δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο στα υπόλοιπα δείγματα από το νησί αυτό, πιθανές αιτίες μπορεί να είναι είτε η ύπαρξη σφάλματος στο στάδιο της PCR είτε ο μικρός αριθμός δειγμάτων του υποκλάδου αυτού (βλ. παρακάτω συζήτηση για τους υποκλάδους *a*, *b* και *d*).

Αν και ο φυλογενετικός κλάδος *P. t. ionicus* δεν αναγνωρίζεται ως ενιαία ομάδα στα αποτελέσματα της ανάλυσης STRUCTURE για το σύνολο των δεδομένων\*, κάποιοι από τους φυλογενετικούς υποκλάδους του αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες ομάδες. Στα αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης STRUCTURE εντοπίζονται δύο ομάδες. Η μία περιλαμβάνει την πλειονότητα των ατόμων του φυλογενετικού υποκλάδου *e* (All\_Data\_2\_1) και η άλλη την πλειονότητα των ατόμων των υποκλάδων *c* και *d* (All\_Data\_2\_2) κατά την ιεραρχική ανάλυση του συνόλου των δεδομένων. Ωστόσο, λόγω του ότι αρκετά από τα άτομα του taxon *P. t. ionicus* αφαιρέθηκαν σε προηγούμενο βήμα της ανάλυσης STRUCTURE διότι δεν είχαν υψηλή τιμή αντιστοιχίας  $q$ , οι παραγόμενες ομάδες περιέχουν πολλά άτομα ενδιάμεσου γονοτύπου. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα φανερό για τους φυλογενετικούς υποκλάδους *a*, *b* και *d*, στους οποίους ο μικρός τελικός αριθμός ατόμων πιθανώς εμπόδισε την αναγνώρισή τους ως ξεχωριστές ομάδες, αν και δεν θα πρέπει να παραγνωρίζεται και η πιθανότητα τα αποτελέσματα αυτά να αντικατοπτρίζουν το όριο της διακριτικής ικανότητας των χρησιμοποιούμενων γενετικών τόπων. Στον ίδιο λόγο πιθανώς οφείλεται και η ομαδοποίηση του δείγματος 771 από τη Ζάκυνθο με τα δείγματα του είδους *P. melisellensis*, αν και η συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να αποτελεί σφάλμα της μεθόδου. Συνεπώς, κρίθηκε αναγκαίο η ανάλυση STRUCTURE να εφαρμοστεί για το σύνολο των ατόμων του taxon *P. t. ionicus* με σκοπό την καλύτερη διάκριση συναθροίσεων.

Η ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE κατέληξε στην ύπαρξη πέντε τελικών ομάδων, με αρκετά καλή αντιστοιχία αυτών στους φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon *P. t. ionicus*, με εξαίρεση την περίπτωση των υποκλάδων *a* και *d*, οι οποίοι δε διαχωρίζονται βάσει των μικροδορυφορικών δεδομένων (Εικ. 4.2). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε μερική συμφωνία με το αποτέλεσμα της ανάλυσης DAPC με βάση την πρώτη και την

---

\* δεν είναι απαραίτητο να συμβαίνει μιας και η ιεραρχική ανάλυση STRUCTURE δεν αντιστοιχεί σε δομή φυλογενετικού δέντρου



τρίτη συνάρτηση διάκρισης (Εικ. 4.4), το οποίο φανέρωσε τον διαχωρισμό των υποκλάδων *c* και *e* από τους υπόλοιπους τρεις που εμφανίζουν αλληλεπικάλυψη.

Ο μη διαχωρισμός κάποιων φυλογενετικών κλάδων από τα μικροδορυφορικά δεδομένα ίσως οφείλεται στο μικρό αριθμό ατόμων που είναι διαθέσιμα προς ανάλυση. Ο αριθμός των ατόμων που προτείνεται να περιλαμβάνει ένας πληθυσμός ώστε να είναι επαρκής για την ορθή εκτίμηση των αλληλικών συχνοτήτων είναι 25 με 30 (Hale et al., 2012). Δεδομένου ότι ο αριθμός των ατόμων που αντιστοιχούν στους υποκλάδους *a*, *b* και *d* είναι επτά, πέντε και 10, αντίστοιχα, θα μπορούσε η παραπάνω υπόθεση να ισχύει στην παρούσα περίπτωση, ωστόσο ο υποκλάδος *b* αναγνωρίστηκε ως διακριτός. Εναλλακτικά, μια άλλη αιτία αδυναμίας διάκρισης των παραπάνω φυλογενετικών κλάδων θα μπορούσε να είναι η ανεπάρκεια των συγκεκριμένων 14 μικροδορυφορικών τόπων. Τέλος, το παραπάνω φαινόμενο θα μπορούσε να οφείλεται στην πραγματική ασυμφωνία εκτίμησης κοινής εξελικτικής ιστορίας μεταξύ των δύο διαφορετικών τύπων μοριακών δεικτών, των μικροδορυφόρων και του μιτοχονδριακού DNA, με τους φυλογενετικούς κλάδους να οφείλονται σε εισροή μιτοχονδριακού υλικού (mitochondrial introgression) ή/και ατελή διαλογή γενεαλογικών γραμμών, όπως στην περίπτωση των σαυρών του γένους *Crotaphytus* (McGuire et al., 2007).

Ο φυλογενετικός υποκλάδος *c* εμφανίζεται στα μικροδορυφορικά δεδομένα ως μια καλά ορισμένη ομάδα και από τις δύο παραπάνω αναλύσεις (ionicus\_2\_2, STRUCTURE, Εικ. 4.2 - *c*, DAPC, Εικ. 4.4) με ικανοποιητικό ποσοστό αμιγών ατόμων. Αν και ως διακριτή ομάδα υποστηρίζεται μόνο από την ανάλυση STRUCTURE, ο φυλογενετικός υποκλάδος *b*, αποτελεί και αυτός διακριτή και σχετικά ομοιογενή ομάδα (ionicus\_2\_1\_2, Εικ.4.2), παρά το μικρό της μέγεθος. Οι φυλογενετικοί κλάδοι *a* και *d* που, όπως αναφέρθηκε, δεν αναγνωρίζονται ξεχωριστά από καμία ανάλυση εκτίμησης πληθυσμιακής δομής, τοποθετούνται μαζί σε μια εξίσου ομοιόμορφη και διακριτή ομάδα (ionicus\_2\_1\_1, Εικ.4.2) σύμφωνα με την ανάλυση STRUCTURE. Τέλος, η πλειονότητα των ατόμων του φυλογενετικού κλάδου *e* διακρίνεται στις παραπάνω αναλύσεις ως μία ομάδα (ionicus\_1, Εικ. 4.2), η οποία όμως αποτελείται από αρκετά μη αμιγή άτομα, ενώ

κάποια άτομα αυτού του κλάδου ομαδοποιούνται με μεγάλη πιθανότητα σε άλλες ομάδες. Η ομαδοποίηση του δείγματος από το Όρος Νεμέρτσικα (δείγμα 513) με τα άτομα των υποκλάδων *a* και *b* στην ανάλυση STRUCTURE (δείγμα 513, Εικ. 4.2) πιθανότατα οφείλεται σε σφάλμα στο στάδιο της PCR, μιας και τα υπόλοιπα άτομα από τον ίδιο πληθυσμό ομαδοποιούνται με τα υπόλοιπα άτομα του υποκλάδου *e*. Αντίθετα, τα άτομα του υποκλάδου *e* από τη δυτική Πελοπόννησο (181, 778 και 883) που ομαδοποιούνται με την ομάδα που σχηματίζουν οι δύο παραπάνω υποκλάδοι, πιθανότατα αποτελούν ένδειξη πραγματικής ασυμφωνίας μεταξύ μιτοχονδριακών και μικροδορυφορικών (πυρηνικών) δεδομένων που οφείλεται στη διαφορετική εξελικτική τους ιστορία.

## 6. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων ανίχνευσης πληθυσμιακής δομής εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» έδειξαν ότι, σε γενικές γραμμές, οι ομαδοποιήσεις που αναγνωρίστηκαν αντιστοιχούν στους κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους (ή ομάδες αυτών) που φανέρωσαν τα δεδομένα αλληλουχιών σε προηγούμενο κεφάλαιο. Οι ομαδοποιήσεις αυτές στην πλειονότητά τους αποτελούνταν από αμιγή άτομα ( $q > 90$ ), ωστόσο παρατηρήθηκαν ομάδες (π.χ., η περίπτωση του taxon *P. t. tauricus*) που περιείχαν σε μικρό ποσοστό μη αμιγή άτομα που προέρχονταν από διαφορετική γεωγραφική περιοχή. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν και περιπτώσεις στις οποίες άτομα ίδιας γεωγραφικής προέλευσης ομαδοποιούνται σε διαφορετικές ομάδες (π.χ., η περίπτωση του φυλογενετικού υποκλάδου *e* του taxon *P. t. Ionicus*). Το φαινόμενο αυτό εκτιμήθηκε ότι είτε οφείλεται σε λάθη στο στάδιο της PCR είτε συνιστά πραγματική ένδειξη διαφορετικής εξελικτικής ιστορίας μεταξύ των διαφορετικών μοριακών δεικτών (mtDNA – msats). Τέλος, η ανάλυση DAPC έδειξε ότι οι περισσότεροι κλάδοι και υποκλάδοι της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» είναι διακριτές ομάδες, με εξαίρεση τους υποκλάδους *a*, *b* και *c* του taxon *P. t. ionicus*.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΤΟ

---

### Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*» και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Τα δεδομένα της μοντελοποίησης χωρικών κατανομών είναι μέρος της υπό προετοιμασία εργασίας (Παράρτημα IV):

*Psonis et al. (2017) Genomic phylogeography and species distribution modelling of the Podarcis tauricus (Sauria: Lacertidae) species subgroup. (In preparation).*

## 1. Περίληψη κεφαλαίου

Η υποομάδα ειδών «*Podarcis tauricus*» περιλαμβάνει τέσσερα μορφολογικώς αναγνωρισμένα είδη και μια πλειάδα φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από γενετικές αποστάσεις επιπέδου είδους. Ο αριθμός των πραγματικών ειδών που εμπεριέχονται στην υποομάδα αυτή αποτελεί ενδιαφέρον ερώτημα, το οποίο για να απαντηθεί θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν δεδομένα πολλών διαφορετικών τύπων όπως μορφολογικά, συμπεριφορικά, οικοφυσιολογικά, περιβαλλοντικά και γενετικά. Χρησιμοποιώντας δεδομένα αλληλουχιών δύο μιτοχονδριακών και πέντε πυρηνικών γενετικών τόπων και εφαρμόζοντας δύο Bayesian coalescent αναλύσεις οριοθέτησης ειδών έγινε εκτίμηση του πιθανού αριθμού ειδών εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Επίσης έγινε χρήση μοντέλων χωρικής κατανομής για την παραγωγή δυνητικού χάρτη κατανομής των taxa και των κύριων φυλογενετικών γραμμών της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», για τρεις χρονικές περιόδους (τελευταία μεσοπαγετώδης περίοδος, τελευταία παγετώδης περίοδος, και παρόν). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης οριοθέτησης ειδών υπέδειξαν την ύπαρξη εννέα ειδών εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Αυτό επιβεβαιώνει την θεώρηση του taxon *P. ionicus* ως σύμπλεγμα ειδών και δίνει μεγάλη βαρύτητα στην ανάγκη ταξινομικής αναθεώρησης του taxon αυτού. Οι αναλύσεις χωρικής κατανομής έδειξαν ότι, ως ένα βαθμό, υπάρχουν διακριτές δυνητικές κατανομές βάσει περιβαλλοντικών συνθηκών μεταξύ των taxa της παραπάνω υποομάδας, παρατήρηση που ενισχύει την προηγούμενη υπόθεση.

**Λέξεις κλειδιά:** Ανταγωνισμός, Βαλκανική χερσόνησος, Τοιχόσαυρες, BP&P, MaxEnt

## 2. Εισαγωγή κεφαλαίου

### 2.1. Η έννοια του Είδους

Ο όρος «είδος» αποτελεί μία από τις πιο ευρεία χρησιμοποιούμενες λέξεις στη Βιολογία, το «συνάλλαγμα» της, όπως χαρακτηριστικά το προσομοιάζουν οι Agarow et al. (2004), και αποτελεί ένα από τα βασικά επίπεδα οργάνωσης της ζωής, όπως για παράδειγμα είναι οι πληθυσμοί, οι οργανισμοί και τα κύτταρα. Παρά τη σημαντικότητά του, ωστόσο, ο ορισμός του είδους παραμένει αντικείμενο έντονης αντιπαράθεσης (Hausdorf, 2011 και αναφορές εκεί). Η συζήτηση πάνω στη θεώρηση του είδους (species concept) δεν αποτελεί μόνο φιλοσοφική συζήτηση, αλλά έχει και πρακτική σημασία, αφού διαφορετικές θεωρήσεις του είδους μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά συμπεράσματα (Isaac et al.). Έχει προταθεί πληθώρα ορισμών για την έννοια του είδους (Mayden, 1997; De Queiroz, 2007; Hausdorf, 2011), ωστόσο η ασυμφωνία και η ατελείωτη συζήτηση περί του θέματος έχει επιφέρει σύγχυση και μείωση του ενδιαφέροντος στην ανάπτυξη μιας ενοποιημένης θεώρησης. Σε αυτό συνέβαλαν τόσο η ανάπτυξη φτηνών και γρήγορων μεθόδων απομόνωσης και αλληλούχισης γενετικών δεικτών όσο και νέα ευρήματα στη μελέτη της διαδικασίας της ειδογένεσης. Όσον αφορά την πρώτη αιτία, η εξέλιξη της τεχνολογίας είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αρκετών αλγορίθμων οριοθέτησης ειδών βάσει γενετικών δεδομένων (π.χ., Pons et al., 2006; Puillandre et al., 2012; Zhang et al., 2013) και κατ' επέκταση τη δημιουργία νέων όρων, όπως π.χ., «Genospecies», «Phylospecies», «Recognizable Taxonomic Units», «Phylotypes», «Molecular Operational Taxonomic Units» κτλ. που ταυτίστηκαν ή αντικατέστησαν τον όρο «είδος». Όσον αφορά τη δεύτερη αιτία, τα νέα ευρήματα περιλαμβάνουν ενδείξεις για το ότι τα είδη μπορούν να διαφοροποιούνται παρά την ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ τους και την ένταξη της παράλληλης ειδογένεσης καθώς και των μονογονεϊκών οργανισμών στη θεώρηση του είδους (Hausdorf, 2011 και αναφορές εκεί).

Ίσως μια από τις πιο επιτυχημένες προσπάθειες δημιουργίας ενοποιητικής θεώρησης να αποτελεί αυτή του De Queiroz (2007). Σύμφωνα με αυτήν, ως «είδος» μπορεί

να θεωρηθεί οποιαδήποτε «ανεξάρτητα εξελισσόμενη γενεαλογία μεταπληθυσμών» (separately evolving metapopulation lineage), με τους υπόλοιπους ορισμούς του είδους (π.χ. βιολογικός, φυλογενετικός, φαινοτυπικός) να αναφέρονται σε ιδιότητες των οργανισμών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά χαρακτηριστικά (π.χ. γενετική απομόνωση, μονοφυλία, μορφολογία) για το διαχωρισμό των ειδών. Χρησιμοποιώντας ως βασική αρχή την παραπάνω θεώρηση και με στόχο την ενσωμάτωση της μοριακής βιολογίας στην Ταξινόμια κατά το σύστημα του Λινναίου, οι Radial et al. (2010) δημιούργησαν ένα πλαίσιο εργασίας που ως αρχικό αποτέλεσμα έχει τον χαρακτηρισμό των εξελικτικών γραμμών ως «Μη Επιβεβαιωμένων Υποψήφιων Ειδών» (Unconfirmed Candidate Species, UCS) και ως τελικό τον χαρακτηρισμό αυτών των UCS, είτε ως «Επιβεβαιωμένων Υποψήφιων Ειδών» (Confirmed Candidate Species, CCS) είτε ως «Βαθιές Εξελικτικές Γραμμές του Ίδιου Είδους» (Deep Conspecific Lineage, DCL).

## 2.2. Η ιδέα της οριοθέτησης ειδών και γνωστές μέθοδοι

Ως οριοθέτηση ειδών ορίζεται η διαδικασία εκείνη με την οποία καθορίζονται τα όρια των ειδών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα είτε την αναθεώρηση των υπάρχοντων ειδών είτε την ανακάλυψη νέων. Όπως συνέβη με τις μεθόδους φυλογένεσης, έτσι και οι μέθοδοι οριοθέτησης ειδών μετατοπίστηκαν προς μια πιο γενετική προσέγγιση, με δεδομένα αλληλουχιών DNA να χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά για τον καθορισμό των ορίων των ειδών. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην παραδοχή ότι τα τμήματα γενετικών τόπων είναι ικανά να συγκροτήσουν μονοφυλετικές ομάδες οι οποίες αντιπροσωπεύουν εξελικτικές οντότητες σε επίπεδο είδους (Puillandre et al., 2012).

Έχει αναπτυχθεί πλειάδα γενετικών μεθόδων και αλγορίθμων για την οριοθέτηση των ειδών, είτε κάνοντας χρήση ενός και μόνο γενετικού τόπου (Κατηγορία I) είτε ακολουθώντας μια προσέγγιση που να είναι ικανή να συμπεριλάβει πολλαπλούς, ανεξάρτητα εξελισσόμενους, γενετικούς τόπους (Κατηγορία II). Εκτενής ανασκόπηση και κατηγοριοποίηση κάποιων από τις διαθέσιμες μεθόδους αποτελεί η εργασία των

Camargo and Sites (2013). Γνωστές προσεγγίσεις - παραδείγματα της Κατηγορίας I αποτελούν το μοντέλο «Generalized Mixed Yule Coalescent, GMYC» (Pons et al., 2006; Fujisawa and Barraclough, 2013) και το μοντέλο «Poisson Tree Process, PTP» (Zhang et al., 2013) που χρησιμοποιήθηκε στο Δεύτερο Κεφάλαιο για την ανίχνευση εξελικτικών οντοτήτων. Η Κατηγορία I διαιρείται σε δύο υποκατηγορίες. Οι δύο παραπάνω μέθοδοι ανήκουν στην Υποκατηγορία Ia που βασίζεται στην παραδοχή ότι η φυλογένεση που χρησιμοποιείται ταυτίζεται με τη φυλογένεση των ειδών (ταύτιση του γονιδιακού δέντρου με το δέντρο των ειδών). Η Υποκατηγορία Ib οριοθετεί βάσει γενετικών αποστάσεων με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις μεθόδους «CROP» (Hao et al., 2011), «UCLUST» (Edgar, 2010) και «ABGD» (Puillandre et al., 2012). Βασικό πλεονέκτημα της Κατηγορίας I είναι ότι δεν έχει ανάγκη μεγάλης υπολογιστικής δύναμης και λόγω αυτού οι μέθοδοί της μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκτεταμένο αριθμό αλληλουχιών. Από την άλλη, πέρα από τη χρήση μόνο ενός γενετικού τόπου, βασικό μειονέκτημά τους αποτελεί η συχνή έλλειψη βιολογικού νοήματος του κριτηρίου διαχωρισμού των ειδών (Zhang et al., 2013).

Οι μέθοδοι της Κατηγορίας II διαιρούνται σε δύο υποκατηγορίες με βάση το κριτήριο της χρήσης *a priori* αριθμού πιθανών ειδών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεθόδου που δεν χρειάζεται εκ των προτέρων γνώση του αριθμού των ειδών (Υποκατηγορία IIα) αποτελεί το υπολογιστικό πακέτο «Brownie» (O'Meara, 2010), το οποίο ακολουθεί μια στρατηγική εκτίμησης του δέντρου των ειδών λαμβάνοντας υπόψη τις συμφωνίες που παρατηρούνται ανάμεσα στα γονιδιακά δέντρα. Από την άλλη, στις μεθόδους που χρησιμοποιείται η *a priori* γνώση του αριθμού των ειδών (Υποκατηγορία IIβ) συμπεριλαμβάνεται, εν μέρει, ο αλγόριθμος «Bayesian Phylogenetics and Phylogeography, BP&P» (Yang and Rannala, 2010; Rannala and Yang, 2013; Yang and Rannala, 2014; Yang, 2015), ο οποίος δίνει την παραπάνω επιλογή αν και δεν είναι προαπαιτούμενο (βλ. αναλυτικές πληροφορίες στην επόμενη ενότητα), καθώς και η μέθοδος «STACEY» (v. 1.2.1, Jones, 2015), η οποία είναι ενσωματωμένη στο λογισμικό

πακέτο BEAST 2 (v. 2.4.0, Bouckaert et al., 2014) και χρησιμοποιεί το μοντέλο ειδογένεσης «birth-death-collapse model» (Jones et al., 2015).



### 2.2.1. Η μέθοδος BP&P

Ο αλγόριθμος «Bayesian Phylogenetics and Phylogeography, BP&P» (Yang and Rannala, 2010; Rannala and Yang, 2013; Yang and Rannala, 2014; Yang, 2015) αποτελεί έναν από τους πιο χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους (Zhang et al., 2014 και αναφορές εκεί) που αρχικά ανήκε στην υποκατηγορία μεθόδων όπου απαιτείται μια αρχική υπόθεση τόσο για τον αριθμό των ειδών όσο και για τις φυλογενετικές τους σχέσεις του μελετώμενου taxon. Πλέον η μέθοδος αυτή δίνει την επιλογή χρήσης ή μη αρχικού δέντρου ως *a priori* γνώση. Το αν θα γίνει η επιλογή ή όχι αυτό καθορίζεται από το ερώτημα που θέτει ο ερευνητής και από τα δεδομένα που έχει στη διάθεσή του.

Η λογική αυτού του Bayesian coalescent αλγορίθμου βασίζεται στον υπολογισμό και τη σύγκριση των εκ των υστέρων πιθανοτήτων διαφορετικών μοντέλων οριοθέτησης ειδών και φυλογένεσης, λαμβάνοντας υπόψιν του την αβεβαιότητα της τοπολογίας των γονιδιακών δέντρων (διαφορετικοί γενετικοί τόποι μπορούν να δώσουν διαφορετική τοπολογία) καθώς και την πιθανότητα της ατελούς διαλογής γενεαλογικών γραμμών λόγω προγονικού πολυμορφισμού (Yang and Rannala, 2010; Rannala and Yang, 2013; Yang and Rannala, 2014).

Λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων καθώς και άλλων (Fujita and Leaché, 2010) συμπεριλαμβανομένης της συντηρητικότητας όσον αφορά το μέγεθος του εκτιμώμενου αριθμού ειδών, η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις πιο ρεαλιστικές διαθέσιμες μεθόδους και θεωρείται κατάλληλη για τον διαχωρισμό διακριτών εξελικτικών γραμμών εντός ενός συμπλέγματος ειδών (species complex), όπως φαίνεται και από το παράδειγμα που ακολουθεί στην επόμενη ενότητα. Ωστόσο, το βασικό του μειονέκτημα αποτελεί η αυξανόμενη υπολογιστική τους πολυπλοκότητα, η οποία αποτελεί τροχοπέδη για ανάλυση συνόλων δεδομένων μεγάλου αριθμού ειδών (>50) ή γενετικών δεικτών (>200). Η χρήση υπολογιστικών συστημάτων σε μορφή συστοιχίας που επιτρέπει την παραλληλοποίηση διεργασιών και την ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων μπορεί να αποτελέσει, ως ένα βαθμό, λύση στο παραπάνω πρόβλημα.

### 2.3. Παραδείγματα μελετών οριοθέτησης ειδών σε ερπετά και αμφίβια με χρήση του BP&P

Μία από τις πρώτες μελέτες που βασίστηκαν στην μέθοδο BP&P για την οριοθέτηση ειδών χρησιμοποιώντας εμπειρικά δεδομένα και όχι δεδομένα προσομοίωσης ήταν αυτή των Leaché and Fujita (2010), η οποία αφορούσε τα αφρικάνικα σαμιαμίθια (geckos) του είδους *Hemidactylus fasciatus*. Χρησιμοποίησαν δεδομένα μιτοχονδριακών και πυρηνικών αλληλουχιών από 51 δείγματα που αντιπροσώπευαν 10 πληθυσμούς και εφάρμοσαν τη μέθοδο BP&P που τότε είχε ως προαπαιτούμενο τη χρήση *a priori* δέντρου, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς παραμέτρων και δίνοντας εναλλακτικά αρχικά δέντρα (starting trees). Από τα αποτελέσματα ανακάλυψαν ότι η γενετική ποικιλότητα εντός του *H. fasciatus* ήταν υποεκτιμημένη και, δεχόμενοι την πιο συντηρητική πρόταση της μεθόδου, αναγνώρισαν τρία νέα είδη. Από πολλούς θεωρείται μελέτη σταθμός όχι μόνο λόγω της πρωτοτυπίας αλλά και γιατί τα αποτελέσματά της βοήθησαν στη βελτίωση της ίδιας της μεθόδου BP&P.

Από την παραπάνω δημοσίευση και μέχρι σήμερα οι μελέτες που ενσωματώνουν ή εστιάζουν στην οριοθέτηση ειδών έχει αυξηθεί σημαντικά, με χαρακτηριστικές εργασίες εστιαζόμενες σε ερπετά και αμφίβια να αφορούν το είδος *Lampropeltis pyromelana* (Burbrink et al., 2011), το σύμπλεγμα ειδών *Rana chensinensis* (Zhou et al., 2012) και το γένος *Plethodon* (Pelletier et al., 2015). Χαρακτηριστικό των τριών αυτών εργασιών είναι η επιπλέον ενσωμάτωση δεδομένων μοντελοποίησης χωρικών κατανομών (γίνεται συζήτηση σε επόμενη ενότητα του κεφαλαίου). Τέλος, μια από τις πιο πρόσφατες μελέτες οριοθέτησης ειδών σαυρών στη Μεσόγειο αποτελεί η εργασία των (Rato et al., 2016) που εστιάζει στο σύμπλεγμα ειδών *Tarentola mauritanica*. Χαρακτηριστικό αυτού του συμπλέγματος είναι η έλλειψη αξιόπιστων ταξινομικών μορφολογικών χαρακτήρων λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας τους και ταυτόχρονα ή ύπαρξη έξι διακριτών φυλογενετικών κλάδων. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο BP&P οι παραπάνω έξι κλάδοι

αναγνωρίστηκαν ως «ανεξακριβωτα υποψήφια είδη» προς περιγραφή με μορφολογικούς χαρακτήρες.

Τέλος, δε γίνεται να μην σχολιαστεί η πλέον σύγχρονη προσέγγιση στην οριοθέτηση ειδών που αφορά τη χρήση RADseq δεδομένων. Όπως φάνηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η είσοδος της Γενωμικής στη Φυλογεωγραφία είναι πολύ πρόσφατη. Όπως είναι αναμενόμενο, η ενσωμάτωση μιας τόσο νέας προσέγγισης σε ένα ούτως ή άλλως νέο πεδίο μελέτης όπως είναι αυτό της οριοθέτησης ειδών δεν αποτελεί εύκολο έργο. Ένα από τα προβλήματα που υπάρχουν είναι ότι ο τεράστιος όγκος δεδομένων (δεκάδες χιλιάδες γενετικοί τόποι) που καλούνται οι ερευνητές να χρησιμοποιήσουν δεν είναι εφικτό να αναλυθεί με τα υπάρχοντα μοντέλα οριοθέτησης ειδών, αφού για παράδειγμα το μοντέλο BP&P μπορεί να αναλύσει έως ~50 γενετικούς τόπους. Συνεπώς, η εύρεση ενός κατάλληλου αλγορίθμου που να μπορεί να ενσωματώσει τόσο μεγάλο όγκο πληροφοριών αποτελεί πρόκληση για τον τομέα της Βιοπληροφορικής. Μια από τις παροδικές λύσεις που έχει βρεθεί, ωστόσο, είναι η χρήση της μεθόδου Bayes Factor Delimitation (Leaché et al., 2014) που επιτρέπει τη σύγκριση διαφορετικών προτύπων οριοθέτησης ειδών. Κάνοντας χρήση του νέου αυτού μοντέλου σε εμπειρικά δεδομένα των σαυρών του συμπλέγματος ειδών *H. fasciatus* (Leaché et al., 2014) φάνηκε ότι η παραπάνω μέθοδος έχει παρόμοια αποτελέσματα με τη μέθοδο BP&P, ωστόσο όχι με την ανάλογη ακρίβεια. Δεδομένης της μη διαθεσιμότητας άλλης παρόμοιας μεθόδου, η παραπάνω μέθοδος κρίνεται πρακτική, όπως φάνηκε και από αντίστοιχη χρήση της στην οριοθέτηση ειδών σε κοράλλια (Herrera and Shank, 2016).

## 2.4. Μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Η καταγραφή των περιοχών εξάπλωσης των οργανισμών αποτελεί μια επίπονη, χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία. Απαιτεί την εμπλοκή μεγάλου αριθμού έμπειρων ερευνητών για τη συλλογή δεδομένων πραγματικής παρουσίας ή απουσίας των ειδών, καθώς και την καταγραφή των κλιματικών και περιβαλλοντικών δεδομένων των ενδιαυτημάτων τους. Η συλλογή δεδομένων εμπεριέχει εξ' αρχής έναν βαθμό σφάλματος καθώς η μη παρατήρηση ενός είδους δε σημαίνει αυτόματα και απουσία από την περιοχή μελέτης, μιας και μπορεί να οφείλεται σε κάποιο τυχαίο γεγονός ή άλλους παράγοντες, π.χ. μικρό πληθυσμιακό μέγεθος. Η χρήση μαθηματικών μοντέλων προσφέρει τρόπους εκτίμησης των κατανομών και ερμηνείας των προτύπων που παρατηρούνται, ο οποίος ενσωματώνει αυτό το σφάλμα.

Την τελευταία δεκαετία έχει αναπτυχθεί μια σειρά από μαθηματικά μοντέλα τα οποία συνδυάζουν περιβαλλοντικές παραμέτρους (π.χ. θερμοκρασία, βροχόπτωση, βλάστηση) και δεδομένα παρουσίας/απουσίας ή παρουσίας μόνο, με στόχο την παραγωγή χαρτών δυνητικής κατανομής ειδών και επιπλέον στατιστικών δεδομένων που ελέγχουν την ακρίβεια των μοντέλων (Araújo and Guisan, 2006; Elith et al., 2006; Peterson, 2011). Τα δεδομένα των προς μελέτη ειδών μπορούν να προέρχονται από: (α) συλλογές μουσείων φυσικής ιστορίας, (β) εργασίες πεδίου, ή/και (γ) την αποδελτίωση βιβλιογραφικών πηγών. Τα περιβαλλοντικά δεδομένα προέρχονται συνήθως από (α) βάσεις δεδομένων, όπως για παράδειγμα η WORLDCLIM (Hijmans et al., 2005), η οποία περιέχει κλιματικά δεδομένα, (β) αναλύσεις δορυφορικών εικόνων (MODIS, LANDSAT και ASTER), ή/και (γ) διάφορες καταμετρήσεις ερευνητικών ομάδων.

Η μοντελοποίηση χωρικών κατανομών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απαντηθούν ερωτήματα βιογεωγραφικής φύσης που αφορούν το ιστορικό παρελθόν ή το κοντινό μέλλον (Svenning et al., 2011; Blois, 2012; Wielstra et al., 2013; Porfirio et al., 2014) και ερωτήματα σύγκρισης και εξέλιξης των οικοθέσεων (niches) των ειδών (Ahmadzadeh et al., 2013a; Ahmadzadeh et al., 2013b; Rato et al., 2015). Η διαδικασία είναι η ίδια με

την παραπάνω με τη διαφορά ότι τα περιβαλλοντικά και κλιματικά δεδομένα αφορούν χρονικές περιόδους του πρόσφατου παρελθόντος για τις οποίες υπάρχουν αρκετά δεδομένα, όπως π.χ. το τελευταίο παγετωνικό μέγιστο (Last Glacial Maximum, LGM) ή πηγάζουν από κλιματικές προσεγγίσεις σεναρίων κλιματικής αλλαγής π.χ. για το έτος 2050 (IPCC, 2014). Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι οι οικοθέσεις των ειδών εξελίσσονται με το πέρασ του χρόνου, επηρεάζοντας έτσι την ακρίβεια του μοντέλου όσον αφορά τόσο το παρελθόν όσο και το μέλλον. Ωστόσο, επειδή το χρονικό διάστημα μεταξύ των παραπάνω χρονικών περιόδων είναι σχετικά μικρό, η παραδοχή ότι οι οικοθέσεις δεν έχουν μεταβληθεί σε σημαντικό βαθμό παραμένει ρεαλιστική (Peterson, 2011).

Επιπλέον, η μοντελοποίηση χωρικών κατανομών μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών που κατευθύνουν την εξελικτική απόκλιση των ειδών και ως εκ τούτου να βοηθήσει στην οριοθέτηση των ειδών. Μάλιστα, ο συνδυασμός δεδομένων γεωγραφικών κατανομών, μοντέλων οικοθέσεων βάσει περιβαλλοντικών παραγόντων και γενετικών δεδομένων προερχόμενων από πολλαπλούς γενετικούς τόπους θεωρείται ο πιο ολοκληρωμένος τρόπος για τη διάγνωση και οριοθέτηση ειδών (Wiens and Graham, 2005). Για παράδειγμα, δύο πρόσφατα γενετικά διαχωρισμένοι πληθυσμοί με διαχωρισμένες οικοθέσεις, οι οποίοι είναι γεωγραφικά καταμεμημένοι σε δύο γειτονικές περιοχές, χρειάζονται επιπλέον μελέτη για να καθοριστεί αν η μεταξύ τους περιοχή αποτελεί κατάλληλο ενδιαίτημα για τον έναν από τους δύο. Εάν δεν υπάρχει κατάλληλο ενδιαίτημα στη μεταξύ τους περιοχή, τότε η ροή γενετικού υλικού μεταξύ τους μπορεί να εμποδίζεται, κάτι που μπορεί να υποστηρίξει το πιθανό συμπέρασμα ότι οι δύο αυτοί πληθυσμοί αποτελούν διακριτές εξελικτικές γραμμές παρά το γεγονός ότι έχουν περιορισμένη γενετική απόκλιση. Από την άλλη, εάν οι δύο πληθυσμοί έχουν παρόμοιες οικοθέσεις χωρίς κάποιο βιογεωγραφικό φράγμα να διαχωρίζει τις γεωγραφικές τους κατανομές και ταυτόχρονα υπάρχει κατάλληλο ενδιαίτημα στη ζώνη επαφής για τον ένα ή και τους δύο, τότε είναι λιγότερο πιθανό οι δύο αυτοί πληθυσμοί να είναι διακριτές εξελικτικές γραμμές και να μην υπάρχει γονιδιακή ροή. Ωστόσο, ο βαθμός της γονιδιακής

ροής σε αντίστοιχες περιπτώσεις εξαρτάται και από άλλους παράγοντες (π.χ. βαθμός αναπαραγωγικής απομόνωσης), πληροφορίες για τους οποίους συχνά είναι δύσκολο να αποκτηθούν.

## 2.5. Παραδείγματα μελετών μοντελοποίησης χωρικών κατανομών σε ερπετά και αμφίβια

Όπως προαναφέρθηκε η μοντελοποίηση χωρικών κατανομών σε συνδυασμό με γενετικά δεδομένα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων που ασχολούνται με τη Φυλογεωγραφία και την οριοθέτηση ειδών.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φυλογεωγραφικής μελέτης που ακολουθεί την παραπάνω προσέγγιση αποτελεί αυτή των Wielstra et al. (2013), στην οποία γίνεται μια προσπάθεια ανίχνευσης παγετωνικών καταφυγίων (glacial refugia) για τα είδη του γένους *Triturus* στη Μεσόγειο. Συγκεκριμένα χρησιμοποίησαν mtDNA δεδομένα όλων των taxa του γένους από ολόκληρη τη γεωγραφική κατανομή του για την ανασύσταση της φυλογένεσης και δημιούργησαν χάρτες δυνητικής κατανομής για το παρόν και την πιο πρόσφατη μεσοπαγετώδη και παγετώδη περίοδο. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρουν, ο συνδυασμός αυτών των δύο τύπων δεδομένων είχε ως αποτέλεσμα μια πιο συνολική κατανόηση της φυλογεωγραφίας του γένους σε σύγκριση με την ξεχωριστή χρήση τους. Ανάμεσα στα αποτελέσματά τους αναφέρεται η εύρεση κατάλληλων περιοχών που μπορούσαν να λειτουργούν ως καταφύγια για τα είδη κατά την τελευταία παγετώδη περίοδο, περιοχές πρόσφατης εξάπλωσης των ειδών, αλλά και περιοχές όπου τα είδη εκτόπισαν το ένα το άλλο μετά την παγετώδη περίοδο. Επίσης ενδιαφέρουσα πρόσφατη μελέτη με παρόμοιο σκεπτικό αποτελεί αυτή των Rato et al. (2015), στην οποία διερευνάται η εξέλιξη και η αλληλεπικάλυψη των οικοθέσεων των taxa του συμπλέγματος ειδών *Tarentola mauritanica*. Κατέληξαν στην περιγραφή φαινομένων διατήρησης, αλλά και μεταβολής των οικοθέσεων που συσχετιζόνταν με περιβαλλοντικά δεδομένα εποχικότητας και μη.

Η ενσωμάτωση της μοντελοποίησης χωρικών κατανομών στη μελέτη οριοθέτησης ειδών ξεκίνησε πολύ πρόσφατα με χαρακτηριστικές μελέτες όσον αφορά τα ερπετά και αμφίβια αυτές των (Burbrink et al., 2011; Zhou et al., 2012; Pelletier et al., 2015), δείχνοντας την αξία αυτής της προσέγγισης. Στο σύνολό τους αυτές οι μελέτες κατέληξαν στην αναγνώριση διακριτών taxa εντός του υπό εξέταση κλάδου και ταυτόχρονα υπέδειξαν ποιοι περιβαλλοντικοί και κλιματικοί παράγοντες μπορεί να επηρέασαν τους μηχανισμούς ειδογένεσης και επέκτασης ή συρρίκνωσης της γεωγραφικής κατανομής και του πληθυσμιακού μεγέθους των ειδών και πώς συνδέονται με φαινόμενα υβριδισμού, εισδοχής μιτοχονδριακού DNA και ατελούς διαλογής γενεαλογικών γραμμών. Ειδική μνεία θα πρέπει να γίνει στο συμπέρασμα της εργασίας των Pelletier et al. (2015) σύμφωνα με το οποίο η χρήση μοντελοποίησης χωρικών κατανομών του ιστορικού παρελθόντος αποτελεί καλύτερο βοηθητικό εργαλείο οριοθέτησης ειδών σε σχέση με τη χρήση των σημερινών.

## 2.6. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου

Ως πρώτος στόχος του παρόντος κεφαλαίου ορίζεται η εξακρίβωση του αριθμού των ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*» κάνοντας χρήση διαφόρων μεθόδων οριοθέτησης ειδών (STACEY, BP&P) και του κατά πόσο αυτό συμφωνεί με την παραγόμενη φυλογένεση στο Δεύτερο Κεφάλαιο. Δεύτερος στόχος αποτελεί η παραγωγή χαρτών δυνητικής παρουσίας των taxa και των φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» τόσο στο παρόν όσο και στο πρόσφατο παρελθόν αλλά και στο κοντινό μέλλον. Τα αποτελέσματα των δύο αυτών αναλύσεων μπορούν να συνδυαστούν για την εξαγωγή συμπερασμάτων βιογεωγραφικής και φυλογεωγραφικής φύσης.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Οριοθέτηση ειδών

Για την εκτίμηση του αριθμού των ειδών του γένους *Podarcis* στα Βαλκάνια χρησιμοποιήθηκε το Σύνολο Δειγμάτων V (34 δείγματα, Παράρτημα II), το οποίο αποτελείται από τα δείγματα για τα οποία έγινε αλληλούχηση και των πέντε γενετικών τόπων (βλ. το Δεύτερο Κεφάλαιο για λεπτομέρειες) αλλά περιλαμβάνουν μόνο τους αντιπροσώπους της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των φυλογενετικών δέντρων του Δευτέρου Κεφαλαίου ορίσαμε κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο και υποκλάδο ως διακριτό «πληθυσμό» της ανάλυσης. Συνολικά στα δεδομένα περιλαμβάνονται εννέα «πληθυσμοί»: οι πέντε φυλογενετικοί υποκλάδοι του taxon *P. t. ionicus*, ο φυλογενετικός κλάδος που περιλαμβάνει τα taxa *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae* και τέλος τα υπόλοιπα τρία είδη της υποομάδας «*P. tauricus*». Η στοιχίση των αλληλουχιών έγινε όπως περιεγράφηκε στο Δεύτερο Κεφάλαιο.

Η ανάλυση οριοθέτησης ειδών πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας την Bayesian μέθοδο BP&P (v.3.1 όπως είναι ενσωματωμένη στο λογισμικό BPPx) με τα δεδομένα αλληλουχιών των πέντε μοριακών δεικτών να θεωρούνται τέσσερις ανεξάρτητα εξελισσόμενοι γενετικοί τόποι (mtDNA, *MC1R*, *Pod55* και *Pod15b*). Για την παραμετροποίηση της ανάλυσης ακολουθήθηκε η προσέγγιση των Leaché and Fujita (2010), θέτοντας τρεις διαφορετικούς συνδυασμούς εκ των προτέρων κατανομών πιθανοτήτων (prior distributions): (α) υποθέτοντας σχετικά μεγάλο προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος και μεγάλη/βαθιά εξελικτική απόκλιση (deep divergence) μεταξύ των ειδών, κάτι που παραμετρικά αντιστοιχεί σε  $\theta \sim G(1, 10)$  και  $\tau^0 \sim G(1, 10)$  με μέση τιμή (prior mean) = 0,1 και διασπορά (variance) = 0,01 και για τις δύο κατανομές, (β) υποθέτοντας σχετικά μικρό πληθυσμιακό μέγεθος και μικρή/ρηχή εξελικτική απόκλιση (shallow divergence) μεταξύ των ειδών δηλαδή  $\theta \sim G(2, 2.000)$  και  $\tau^0 \sim G(2, 2.000)$ , με μέση τιμή = 0,001 και διασπορά =  $5 \times 10^{-7}$  και για τις δύο κατανομές, και (γ) υποθέτοντας σχετικά μεγάλο προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος:  $\theta \sim G(1, 10)$  και σχετικά μικρή/ρηχή



εξελικτική απόκλιση μεταξύ των ειδών:  $\tau^0 \sim G(2, 2.000)$ . Ο τρίτος συνδυασμός θεωρείται αρκετά συντηρητικός και αναμένεται να οδηγεί στην επιλογή μοντέλων που περιέχουν μικρότερο αριθμό ειδών. Η ανάλυση rjMCMC (αλγόριθμος 1) εκτελέστηκε για 100.000 «γενιές» (αποθήκευση αποτελέσματος ανά τρεις «γενιές») με περίοδο burn-in 2.500 «γενιές», ενώ σε κάθε μοντέλο οριοθέτησης ειδών αντιστοιχήθηκε η ίδια εκ των προτέρων πιθανότητα. Κάθε ανάλυση «έτρεξε» τουλάχιστον δύο φορές, δίνοντας διαφορετικό εναρκτήριο αριθμό (seed number) για να επικυρωθεί η συνέπεια μεταξύ των δύο «τρεξιμάτων». Ως αρχική τοπολογία δόθηκε το φυλογενετικό δέντρο που βασίστηκε στους πέντε γενετικούς τόπους (βλ. Δεύτερο Κεφάλαιο).

Για λόγους σύγκρισης εφαρμόστηκε μια επιπλέον ανάλυση οριοθέτησης ειδών κάνοντας χρήση του λογισμικού STACEY, το οποίο είναι ενσωματωμένο στο λογισμικό πακέτο BEAST 2. Τα αρχεία εισαγωγής BEAST (xml input files) διαμορφώθηκαν με την εφαρμογή BEAUti v. 2.4.0, η οποία εμπεριέχεται στο παραπάνω λογισμικό πακέτο. Τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης δεν δόθηκαν *a priori* αλλά έγινε επιλογή του «BEAST Model Test» για την εκτίμησή τους βάσει των εμπειρικών δεδομένων κάθε τόπου. Όσον αφορά άλλα *a priori* στοιχεία, για τη διαδικασία ειδογένεσης ορίστηκε η κατηγορία «Fossilized Birth Death Model» όπως προτείνεται από τις οδηγίες του προγράμματος, ενώ για την περιγραφή του «χαλαρού» μοριακού «ρολογιού» χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο «Uncorrelated Lognormal Model». Η ανάλυση MCMC «έτρεξε» για  $10^8$  «γενιές» με αποθήκευση αποτελέσματος ανά 5.000 «γενιές». Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο λογισμικό Tracer (μέρος του πακέτου BEAST) για να ελεγχθεί η σύγκλιση των αναλύσεων και τα αποτελεσματικά μεγέθη δειγμάτων (effective sample sizes, ESSs) για όλες τις παραμέτρους (αποδεκτές τιμές  $>200$ ). Η τιμή  $-\ln L$  σταθεροποιήθηκε πριν από τις  $10^8$  «γενιές» και οι πρώτες 10% από τις 20.000 αποθηκευμένες αφαιρέθηκαν όπως προτάθηκε από το λογισμικό. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και την εμφάνιση της οριοθέτησης ειδών και της στατιστικής της υποστήριξης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SpeciesDelimitationAnalyser (Jones et al., 2015).

### 3.2. Μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Τα δεδομένα θέσεων παρουσίας για τα προς μελέτη είδη (καθώς και για την υποομάδα ειδών *P. erhardii* και το είδος *P. muralis*) προήρθαν, ως επί το πλείστον, από τις συλλογές του ΜΦΙΚ. Επιπλέον δεδομένα για το μη ελληνικό είδος *P. melisellensis* συλλέχθηκαν από βιβλιογραφικές πηγές (Podnar et al., 2004; Podnar et al., 2014), καθώς και από τη βάση δεδομένων GBIF (<http://www.gbif.org/species/8424078>). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 1.534 θέσεις (Πίνακας 5.1). Να σημειωθεί ότι πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση των δεδομένων έτσι ώστε σε κάθε pixel να αντιστοιχεί μια θέση παρουσίας για κάθε είδος.

Πίνακας 5.1. Δεδομένα θέσεων παρουσίας ανά είδος ή ομάδα\* που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις μοντελοποίησης χωρικών κατανομών.

Είδος/ Ομαδοποίηση Ειδών	Αριθμός Θέσεων
Υποομάδα ειδών « <i>P. tauricus</i> »	458
<i>P. gaigeae</i>	59
<i>P. melisellensis</i>	85
<i>P. milensis</i>	39
<i>P. t. tauricus</i> & <i>P. t. thasopulae</i>	212
<i>P. t. ionicus</i>	63
<i>P. t. ionicus</i> Υποκλάδος <i>a</i>	7
<i>P. t. ionicus</i> Υποκλάδος <i>b</i>	4
<i>P. t. ionicus</i> Υποκλάδος <i>c</i>	10
<i>P. t. ionicus</i> Υποκλάδος <i>d</i>	6
<i>P. t. ionicus</i> Υποκλάδος <i>e</i>	36
Υποομάδα ειδών <i>P. erhardi</i>	283
<i>P. muralis</i>	124

\* Οι ομαδοποιήσεις βασίζονται στα αποτελέσματα του Δεύτερου Κεφαλαίου.

Οι αναλύσεις μοντελοποίησης χωρικών κατανομών πραγματοποιήθηκαν βάσει του μοντέλου της μέγιστης εντροπίας (Maximum Entropy) του λογισμικού MaxEnt (v.3.3k, <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent>), το οποίο εκμεταλλεύεται τα δεδομένα παρουσίας και σε συνδυασμό με τα περιβαλλοντικά δεδομένα εντοπίζει τις περιοχές που παρέχουν τις ιδανικές συνθήκες για την επιβίωση ενός είδους/οργανισμού (Phillips et al., 2004; Phillips et al., 2006; Phillips and Dudík, 2008). Σημαντικό πλεονέκτημα του αλγόριθμου αυτού είναι η δυνατότητα χρήσης αριθμητικών (υψόμετρο, θερμοκρασία, βροχοπτώση) και δεδομένων διακριτών τιμών (βλάστηση, χρήση γης), αλλά και η δυνατότητα χρήσης πολύ μικρού αριθμού δεδομένων παρουσίας ( $n \geq 10$ ) (Elith et al., 2006; Hernandez et al., 2006; Phillips et al., 2006; Pearson et al., 2007; Phillips and Dudík, 2008). Το αποτέλεσμα του μοντέλου επαληθεύεται με τη χρήση της «περιοχής κάτω από την καμπύλη» (Area Under the Curve – AUC) του γραφήματος ROC (Receiver Operating Characteristics). Όταν οι τιμές της AUC είναι μεγαλύτερες από 0,7 τότε το αποτέλεσμα του μοντέλου κρίνεται ως ικανοποιητικό, ενώ όσο αυξάνει η τιμή αυτή τόσο καλύτερο θεωρείται το μοντέλο (Araújo and Guisan, 2006). Στην παρούσα μελέτη, το μοντέλο MaxEnt χρησιμοποιήθηκε με τις προτεινόμενες ρυθμίσεις και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος cross validation με 10 επαναλήψεις ώστε να δημιουργηθούν διαφορετικά μοντέλα με διαφορετικούς συνδυασμούς. Το τελικό αποτέλεσμα που παράγεται αντιστοιχεί στον μέσο όρο των διαφορετικών αυτών επαναλήψεων.

Ένα πολύ συχνό φαινόμενο των περιβαλλοντικών δεδομένων είναι το φαινόμενο της αλληλοσυσχέτισης (multicollinearity). Πρόκειται για μια κατάσταση όπου δύο μετρήσιμες παράμετροι έχουν υψηλή συσχέτιση μεταξύ τους (όπως για παράδειγμα το υψόμετρο και η θερμοκρασία). Ως αποτέλεσμα αυτού, μια από τις δύο παραμέτρους είναι απαραίτητο να εξαιρεθεί από τις αναλύσεις. Ωστόσο, η επιλογή των παραμέτρων δεν είναι εύκολη υπόθεση και απαιτεί τη συμβουλή και συμβολή ενός ειδικού αναφορικά με τον προς μελέτη έμβιο οργανισμό. Η γνώση της οικολογίας και φυσιολογίας του υπό μελέτη είδους/οργανισμού μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες αναφορικά με ποια περιβαλλοντικά δεδομένα είναι καταλληλότερα για χρήση προκειμένου να

απαντήσουν ερωτήματα που αφορούν την εξάπλωση του είδους/οργανισμού αυτού. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήσαμε επτά μη συσχετιζόμενους περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχη μελέτη για *Podarcis* (Kaliontzopoulou et al., 2008):

1. BIO1 = Ετήσια Μέση Θερμοκρασία
2. BIO5 = Μέγιστη Θερμοκρασία Θερμότερου Μήνα
3. BIO6 = Ελάχιστη Θερμοκρασία Ψυχρότερου Μήνα
4. BIO7 = Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος
5. BIO12 = Ετήσια Βροχόπτωση
6. BIO14 = Βροχόπτωση Ξηρότερου Μήνα
7. BIO15 = Εποχική Βροχόπτωση (Coefficient of Variation)

Τα περιβαλλοντικά δεδομένα συλλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων WorldClim (<http://www.worldclim.org/> Hijmans et al., 2005). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων μοντελοποίησης χωρικών κατανομών προβλήθηκαν και για τις περιόδους της Τελευταίας Παγετώδους Περιόδου (Last Glacial Maximum -LGM, ~21.000 χρόνια πριν από σήμερα) και της Τελευταίας Μεσοπαγετώδους Περιόδου (Last Interglacial period - LIG; ~120.000 - 140.000 χρόνια πριν από σήμερα). Οι δύο παραπάνω προβολές συλλέχθηκαν επίσης από τη βάση δεδομένων WorldClim. Η σημαντικότητα και η επιρροή κάθε βιοκλιματικής μεταβλητής αξιολογήθηκε μέσω της ποσοστιαίας συνεισφοράς, της σημαντικότητας μετάθεσης και των καμπυλών απόκρισης παραγόμενων από το λογισμικό MaxEnt.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Εκτίμηση του αριθμού ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*»

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του οριοθέτησης ειδών της μεθόδου BP&P, οι εννέα διακριτοί φυλογενετικοί κλάδοι και υποκλάδοι της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» που εντοπίστηκαν στο φυλογενετικό δέντρο των πέντε γενετικών τόπων, αναγνωρίστηκαν ως διακριτά είδη, με τις τιμές των εκ των υστέρων πιθανοτήτων να κυμαίνονται από 0,91 έως 1,00, σύμφωνα και με τους τρεις συνδυασμούς εκ των προτέρων κατανομών πιθανοτήτων (Πίνακας 5.2). Πιο συγκεκριμένα, τα εννέα διακριτά είδη είναι τα εξής: τα τρία αναγνωρισμένα είδη *P. gaiageae*, *P. melisellensis* και *P. milensis*, ο κλάδος που αντιστοιχεί στα taxa *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae* και τέλος οι πέντε φυλογενετικοί υποκλάδοι του taxon *P. t. ionicus*. Οι συνδυασμοί άλλων «πληθυσμών» ως ενιαία διακριτά είδη δεν υποστηρίζεται στατιστικά (τιμές εκ των υστέρων πιθανοτήτων < 0,05).

Όσον αφορά την ανάλυση με το λογισμικό STACEY, παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές ESS (> 290) για όλες τις παραμέτρους και η σύγκλιση συνέβη πριν από τις  $10^8$  «γενιές» (lnL=-5.832,81). Ο αριθμός των πιθανών ειδών που εκτιμήθηκε ήταν εννέα με σχεδόν απόλυτη στατιστική υποστήριξη (τιμή εκ των υστέρων πιθανότητας: ~1.00).

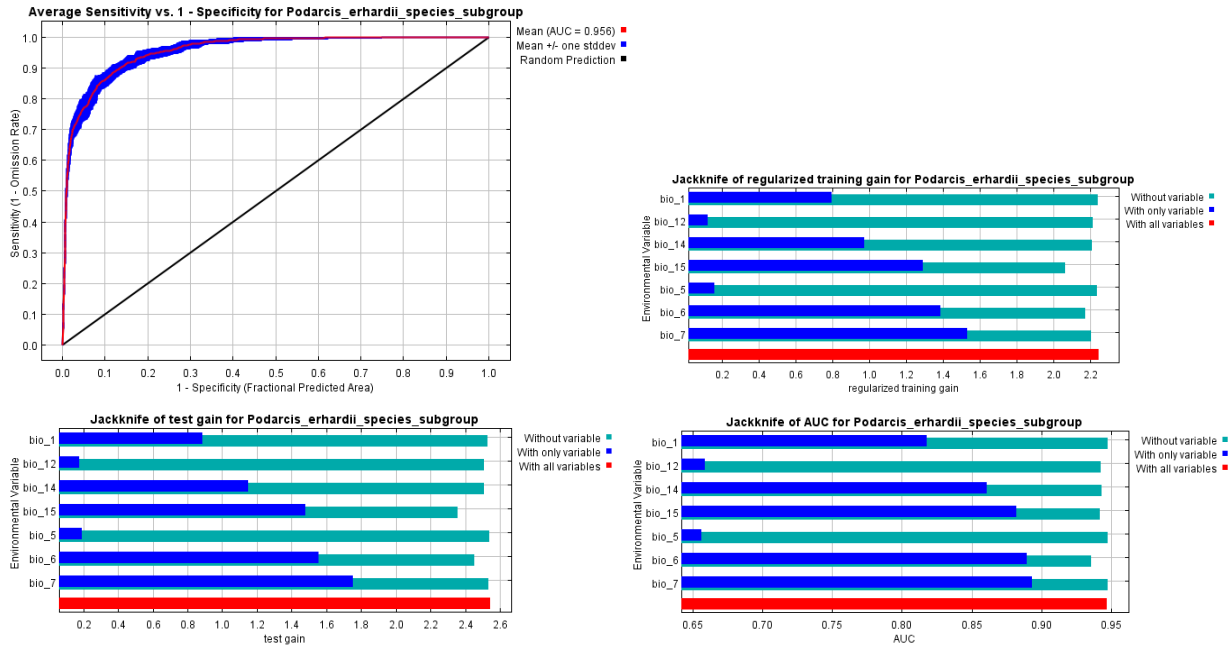
Πίνακας 5.2. Αποτελέσματα οριοθέτησης ειδών βάσει της μεθόδου BP&amp;P υποθέτοντας εννέα «πληθυσμούς» και εφαρμόζοντας διαφορετικούς συνδυασμούς παραμέτρων.

Συνδυασμός Παραμέτρων	$\theta \sim G(1, 10) - \tau^0 \sim G(1, 10)$		$\theta \sim G(2, 2000) - \tau^0 \sim G(2, 2000)$		$\theta \sim G(1, 10) - \tau^0 \sim G(2, 2000)$	
Αριθμός Πιθανών Ειδών	Εκ των υστέρων πιθανότητα	Εκ των προτέρων πιθανότητα	Εκ των υστέρων πιθανότητα	Εκ των προτέρων πιθανότητα	Εκ των υστέρων πιθανότητα	Εκ των προτέρων πιθανότητα
6	---	---	---	---	< 0,01	0,18
7	0,01	0,18	---	---	< 0,01	0,18
8	0,11	0,13	< 0,01	0,13	~ 0,10	0,13
9	0,88	0,06	~1,00	0,06	~ 0,90	0,06
<b>Candidate Species</b>	Εκ των υστέρων πιθανότητα					
<i>P. milensis</i>	1,00		1,00		1,00	
<i>P. t. tauricus</i>	1,00		1,00		1,00	
<i>P. gaigeae</i>	1,00		1,00		1,00	
<i>P. melisellensis</i>	1,00		1,00		1,00	
<i>P. t. ionicus</i>	0,99		1,00		0,99	
Υποκλάδος <i>a</i>	0,93		1,00		0,96	
<i>P. t. ionicus</i>	0,97		1,00		0,98	
Υποκλάδος <i>c</i>	0,95		1,00		0,94	
<i>P. t. ionicus</i>	0,91		1,00		0,91	
Υποκλάδος <i>e</i>	0,05		---		0,05	
<i>P. t. ionicus</i>	0,03		---		0,02	
Υποκλάδοι <i>d</i> & <i>e</i>	---		---		0,01	
<i>P. t. ionicus</i>	---		---		---	
Υποκλάδοι <i>a</i> & <i>d</i>	---		---		---	

Οι τιμές των εκ των υστέρων πιθανοτήτων αποτελούν τον μέσο όρο των τιμών μεταξύ δύο ανεξάρτητων «τρεξιμάτων» MCMC.

## 4.2. Εκτίμηση πιθανών γεωγραφικών κατανομών των ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*»

Τα αποτελέσματα των μοντέλων κρίνονται πολύ ικανοποιητικά καθώς οι τιμές AUC είναι μεγαλύτερες του 0,92 για όλα τα είδη και όλες τις ομαδοποιήσεις (Εικ. 5.1 - 5.13). Για τα νησιωτικά ενδημικά του Αιγαίου *P. gaigeae* και *P. milensis* ως πιο σημαντική παράμετρος εκτιμήθηκε το Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος (>47% συνεισφορά, Πίνακες 5.4 και 5.7), ενώ για το είδος *P. melisellensis* η παράμετρος Ελάχιστη Θερμοκρασία Ψυχρότερου Μήνα (~42% συνεισφορά, Πίνακας 5.6). Για το taxon *P. t. ionicus* ως σημαντικότερη παράμετρος εκτιμήθηκε η Εποχική Βροχόπτωση (~44% συνεισφορά), όπως και η Ετήσια Βροχόπτωση (~35% συνεισφορά) (Πίνακας 5.5), ενώ για την ομαδοποίηση των taxa *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae* οι παράμετροι Ελάχιστη Θερμοκρασία Ψυχρότερου Μήνα (~22% συνεισφορά), Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος (~28% συνεισφορά) και Εποχική Βροχόπτωση (~20% συνεισφορά) (Πίνακας 5.9). Όσον αφορά συνολικά τις δύο υποομάδες ειδών, για την υποομάδα *P. erhardii* η πιο σημαντική παράμετρος εκτιμήθηκε η Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος (~49% συνεισφορά) και η Εποχική Βροχόπτωση (~35% συνεισφορά) (Πίνακας 5.3), ενώ για την υποομάδα «*P. tauricus*» η παράμετρος Ελάχιστη Θερμοκρασία Ψυχρότερου Μήνα (~35% συνεισφορά) και η παράμετρος Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος (~22% συνεισφορά) (Πίνακας 5.10). Εντός του taxon *P. t. ionicus* για κάθε έναν από τους φυλογενετικούς υποκλάδους *a-d* ως σημαντικότερη παράμετρος εκτιμήθηκε η Εποχική Βροχόπτωση (>70% συνεισφορά, Πίνακες 5.11-5.14), ενώ για τον υποκλάδο *e* οι παράμετροι Εποχική Βροχόπτωση (~55% συνεισφορά) και Ετήσια Βροχόπτωση (~37% συνεισφορά) (Πίνακας 5.15). Τέλος, για το είδος *P. muralis* ως σημαντικότερη παράμετρος εκτιμήθηκε η Ετήσια Βροχόπτωση (~28% συνεισφορά) και η Βροχόπτωση Ξηρότερου Μήνα (~26% συνεισφορά) (Πίνακας 5.8).

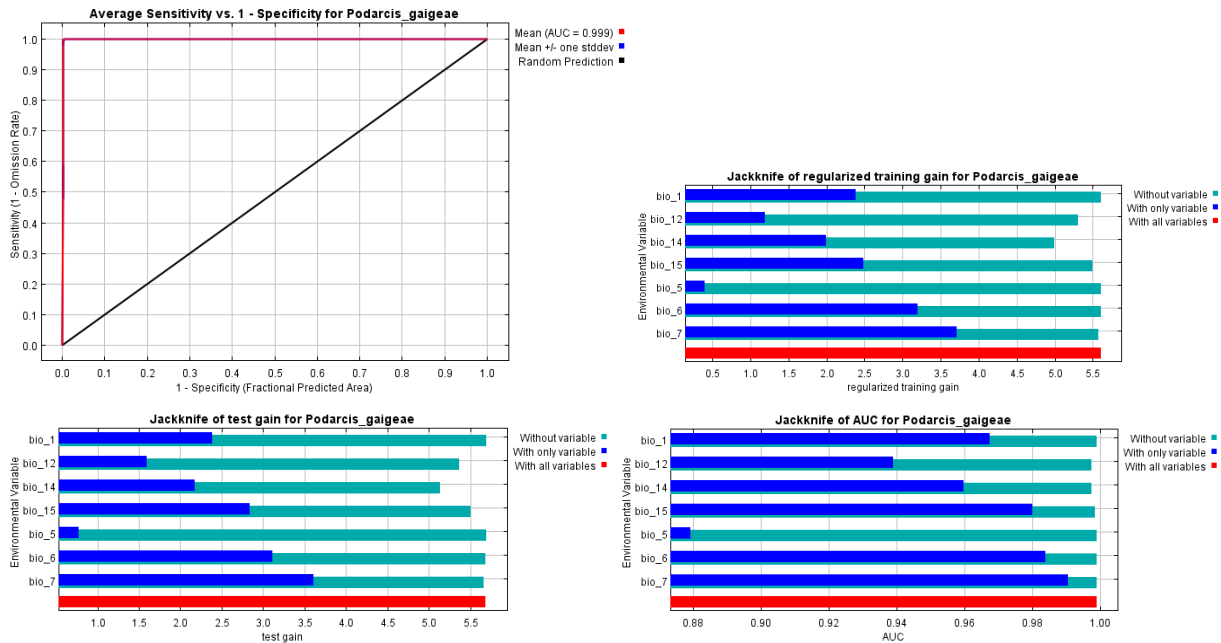
Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.1. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC ( 0,956) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για την υποομάδα ειδών *P. erhardii*.

Πίνακας 5.3. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για την υποομάδα ειδών *P. erhardii*.

Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_7	46,7	3,9
bio_15	35,0	35,1
bio_6	8,4	47,8
bio_5	3,8	0,7
bio_14	3,2	6,1
bio_1	2,0	5,0
bio_12	1,0	1,4

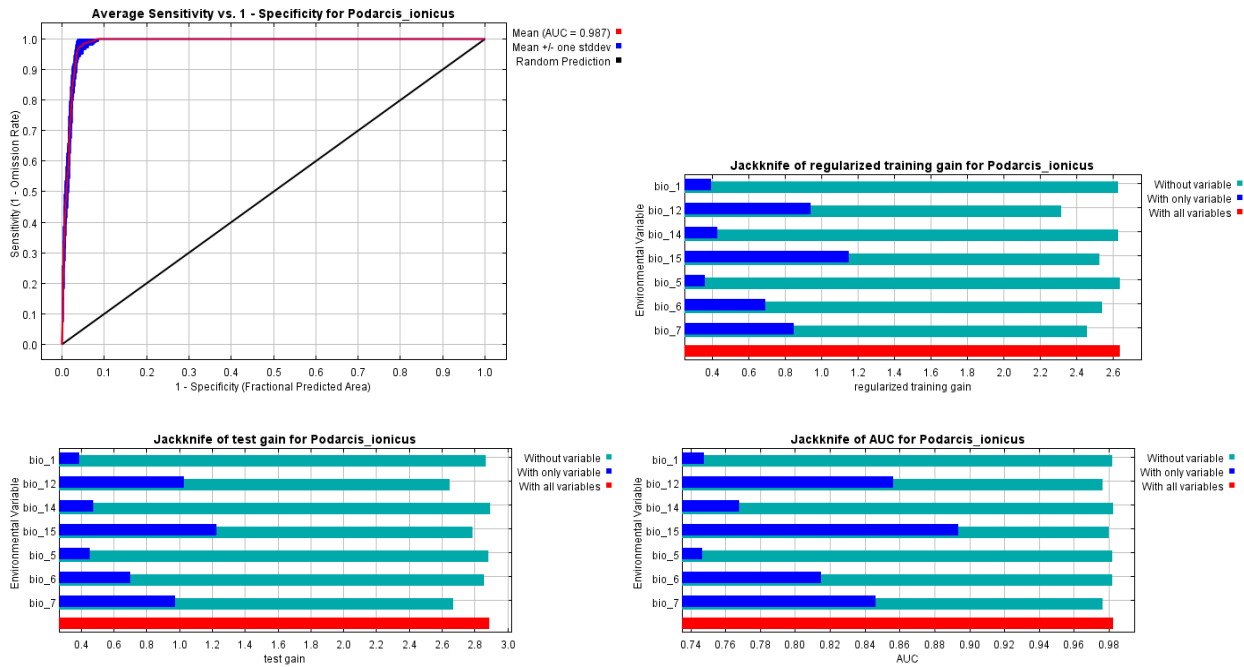


Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.2. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,999) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος *P. gaigeae*.

Πίνακας 5.4. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος *P. gaigeae*.

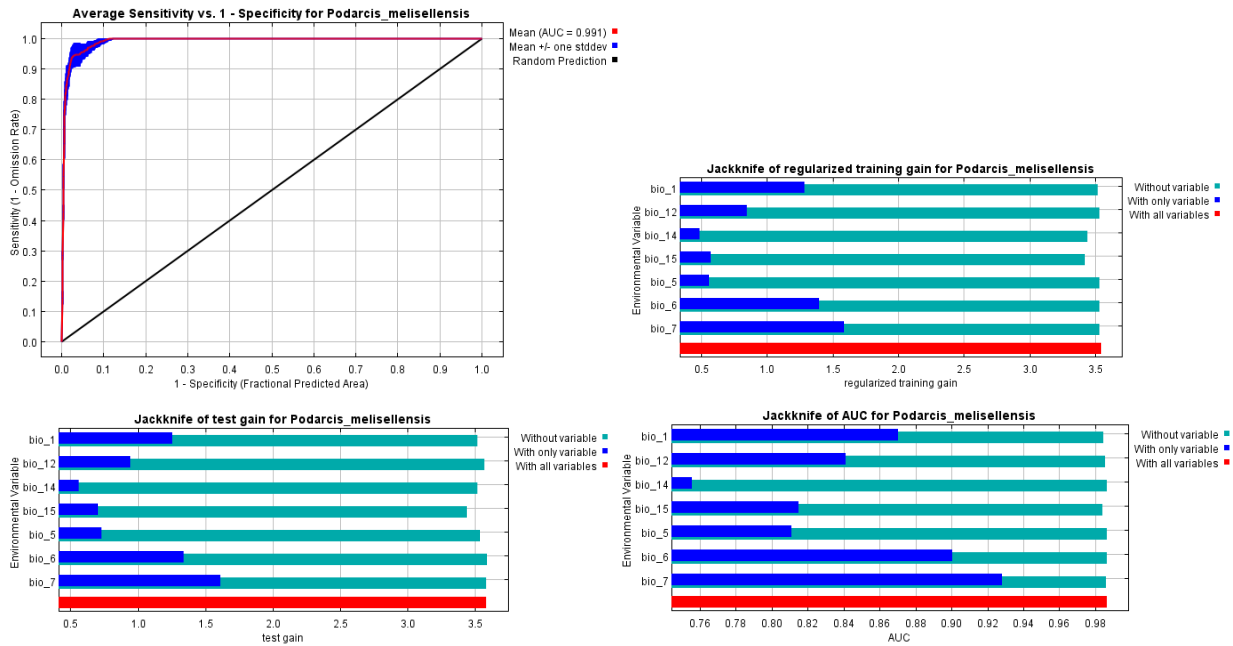
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_7	49,3	33,4
bio_15	23,1	12,2
bio_14	14,1	11,2
bio_12	8,9	42,9
bio_6	4,3	0,0
bio_1	0,2	0,1
bio_5	0,0	0,1

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.3. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,987) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το taxon *P. t. ionicus*.

Πίνακας 5.5. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το taxon *P. t. ionicus*.

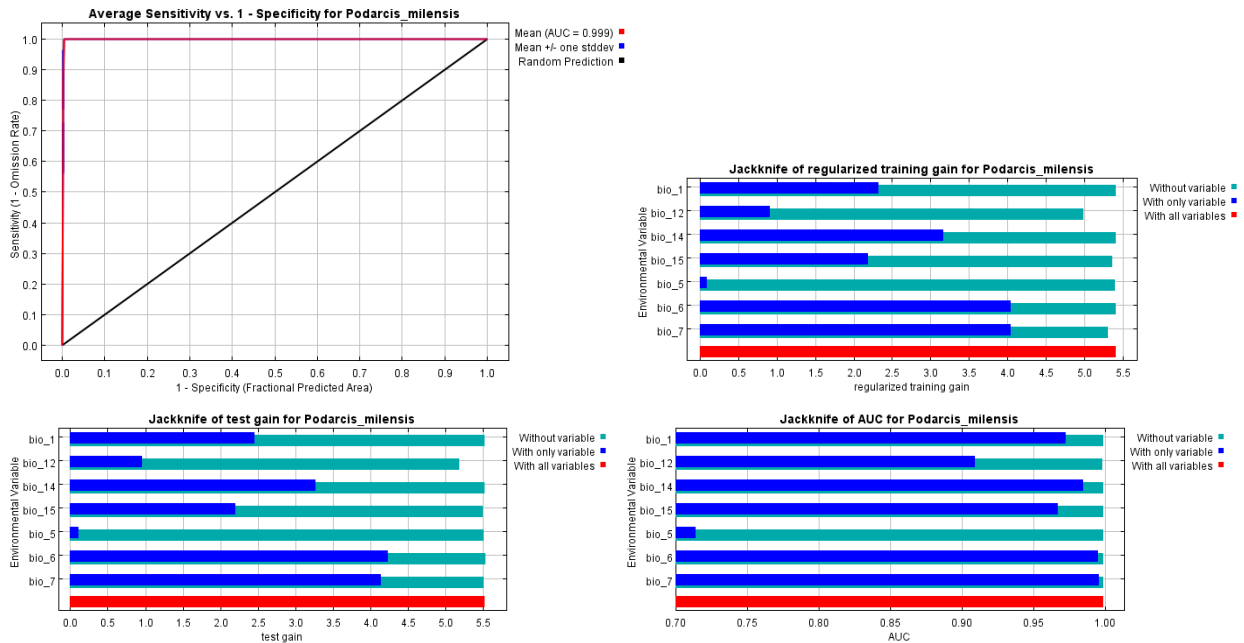
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_15	43,8	29,1
bio_12	35,5	41,3
bio_7	13,7	16,6
bio_6	4,1	5,1
bio_14	2,5	5,7
bio_1	0,3	2,0
bio_5	0,1	0,1

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.4. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,991) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος *P. melisellensis*.

Πίνακας 5.6. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος *P. melisellensis*.

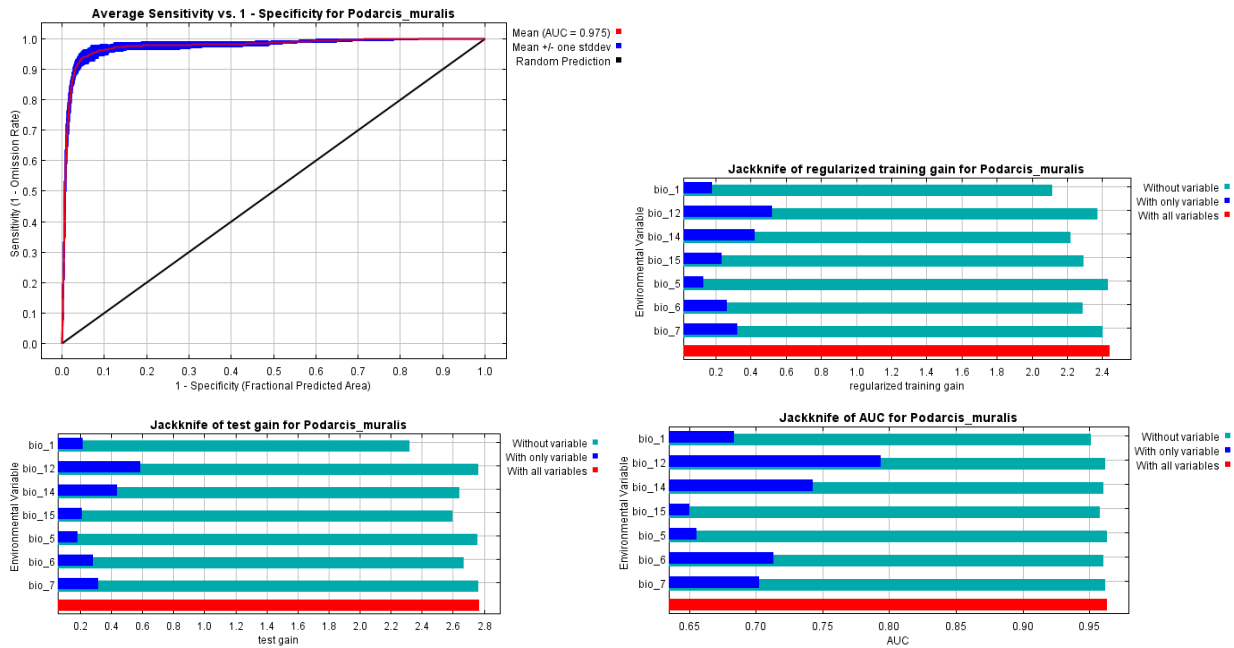
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_6	42,1	35,7
bio_14	29,1	47,4
bio_7	11,4	2,5
bio_1	10,2	6,7
bio_12	3,8	1,5
bio_15	3,3	5,8
bio_5	0,2	0,5

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.5. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,999) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος *P. milensis*.

Πίνακας 5.7. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος *P. milensis*.

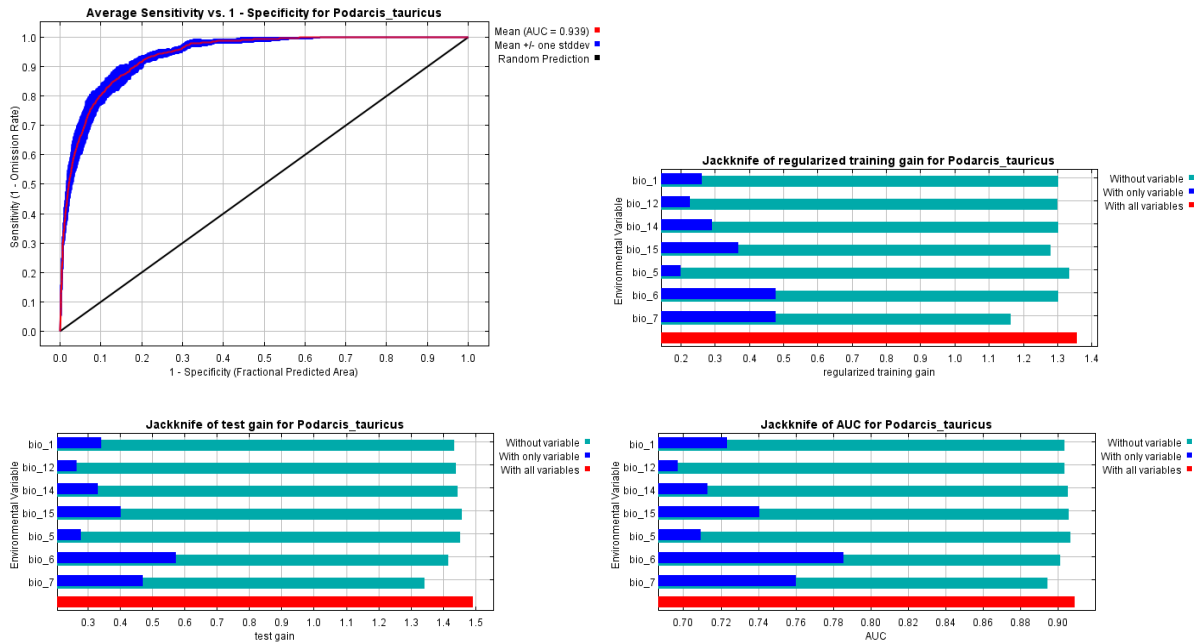
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_7	49,7	19,6
bio_15	18,6	4,7
bio_12	14,3	41,7
bio_14	13,4	30,6
bio_6	4,0	3,0
bio_5	0,0	0,4
bio_1	0,0	0,0

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.6. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,975) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για το είδος *P. muralis*.

Πίνακας 5.8. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για το είδος *P. muralis*.

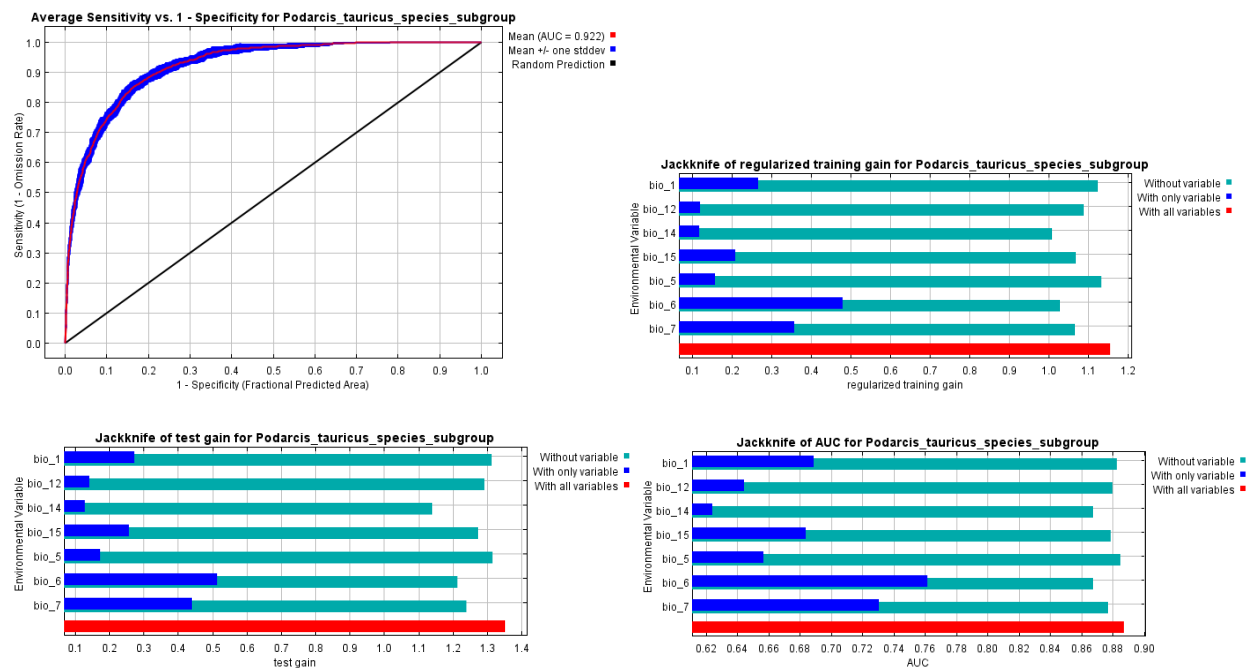
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_14	27,6	21,8
bio_12	26,3	18,3
bio_6	16,0	16,8
bio_1	11,6	29,9
bio_7	8,5	1,8
bio_15	7,8	7,6
bio_5	2,1	3,8

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.7. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,991) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για την ομαδοποίηση των taxa *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae*.

Πίνακας 5.9. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για την ομαδοποίηση των taxa *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae*.

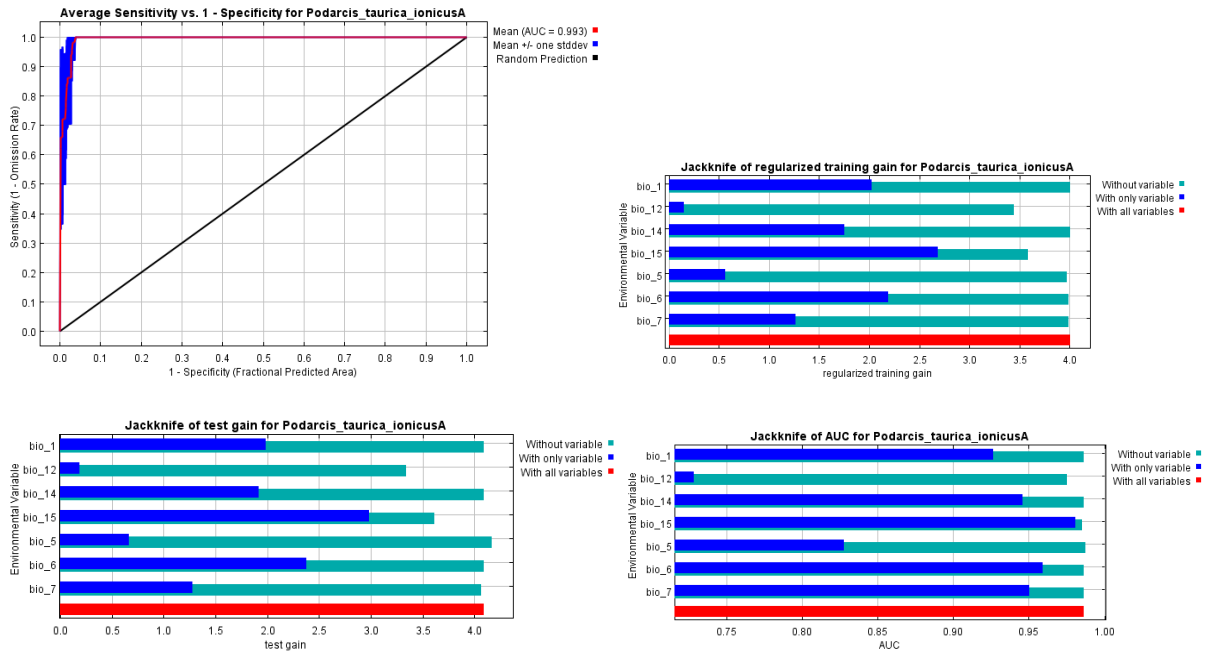
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_7	28,4	14,5
bio_6	22,0	26,0
bio_15	20,1	34,9
bio_12	13,1	4,8
bio_14	9,0	8,3
bio_1	4,5	8,5
bio_5	2,8	2,9

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.8. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,929) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*».

Πίνακας 5.10. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*».

Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_6	34,9	44,9
bio_7	22,5	7,6
bio_14	17,1	18,7
bio_12	10,5	5,1
bio_15	9,3	9,6
bio_5	3,6	5,6
bio_1	2,2	8,5

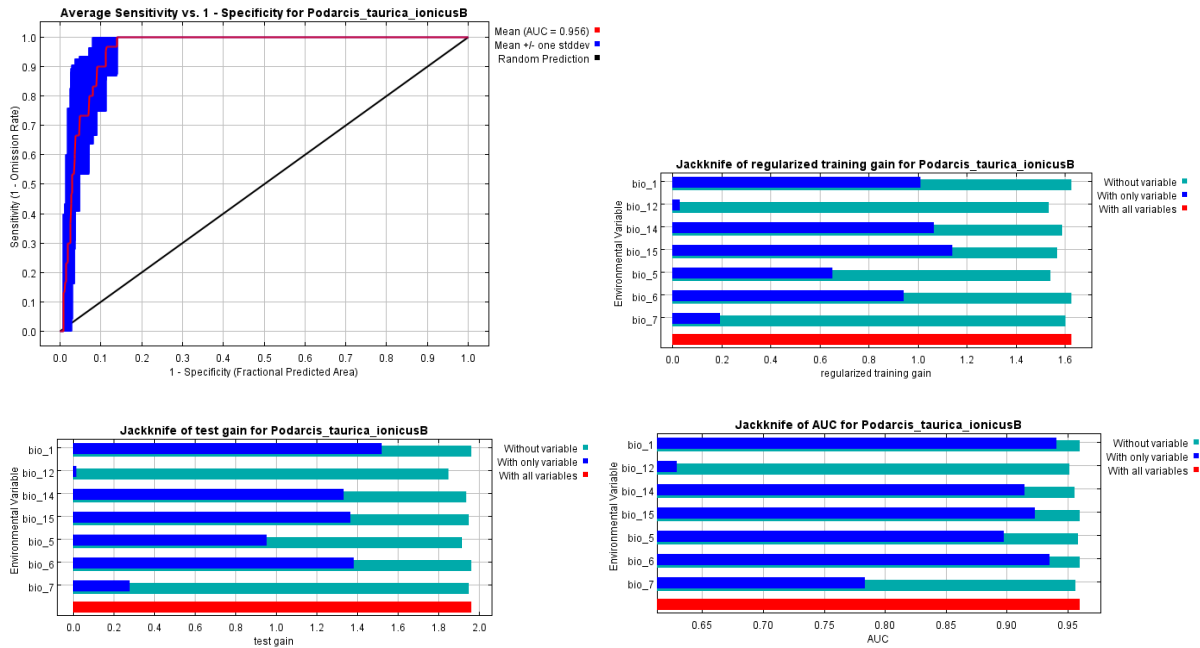
Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.9. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,993) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο *a* του taxon *P. t. ionicus*.

Πίνακας 5.11. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο *a* του taxon *P. t. ionicus*.

Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_15	76,5	79,8
bio_12	13,3	1,7
bio_1	8,8	0,0
bio_6	0,7	16,3
bio_5	0,4	2,1
bio_7	0,4	0,0
bio_14	0,0	0,1

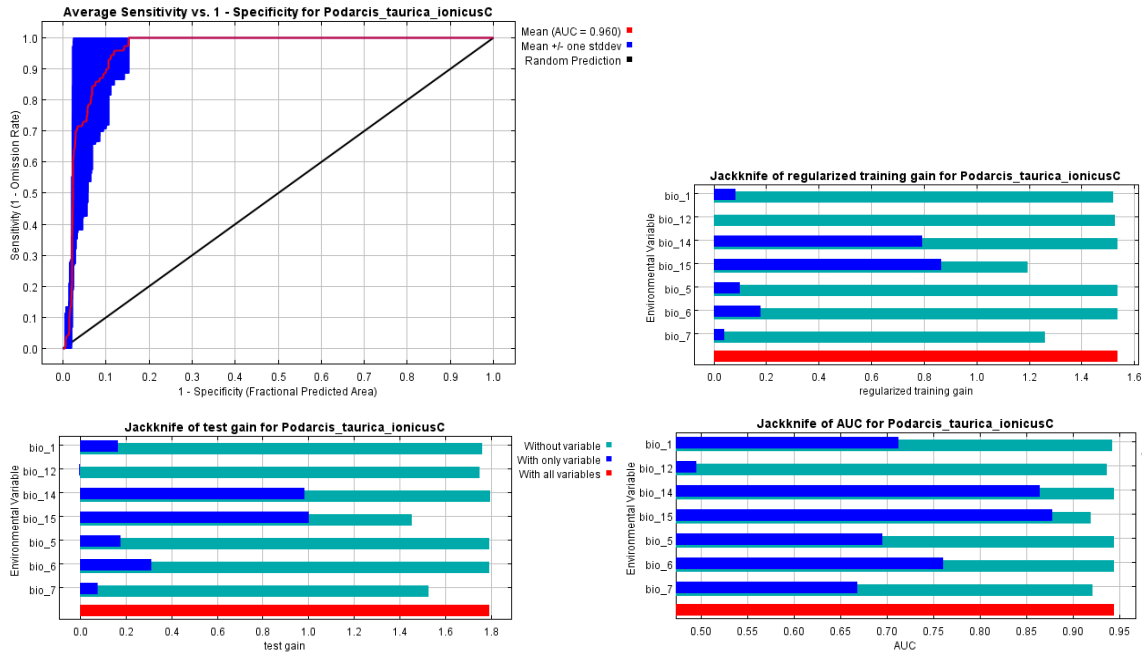


Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.10, Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,956) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο *b* του taxon *P. t. ionicus*.

Πίνακας 5.12. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο *b* του taxon *P. t. ionicus*.

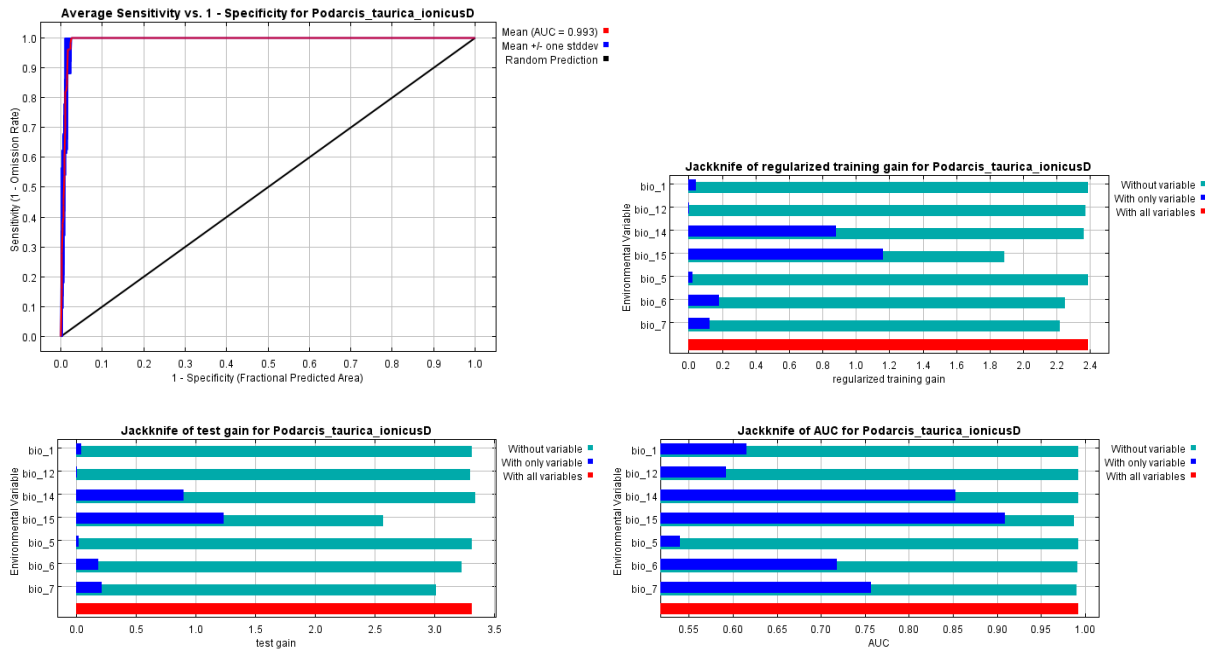
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_15	69,7	18,6
bio_1	13,5	0,0
bio_5	6,2	23,4
bio_14	4,5	46,4
bio_12	4,0	9,0
bio_7	2,1	2,6
bio_6	0,0	0,0

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.11. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,960) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο *c* του taxon *P. t. ionicus*.

Πίνακας 5.13. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο *c* του taxon *P. t. ionicus*.

Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_15	74,5	75,4
bio_7	15,6	8,6
bio_1	6,0	10,0
bio_14	3,2	2,6
bio_6	0,6	0,0
bio_12	0,2	3,4
bio_5	0,0	0,0

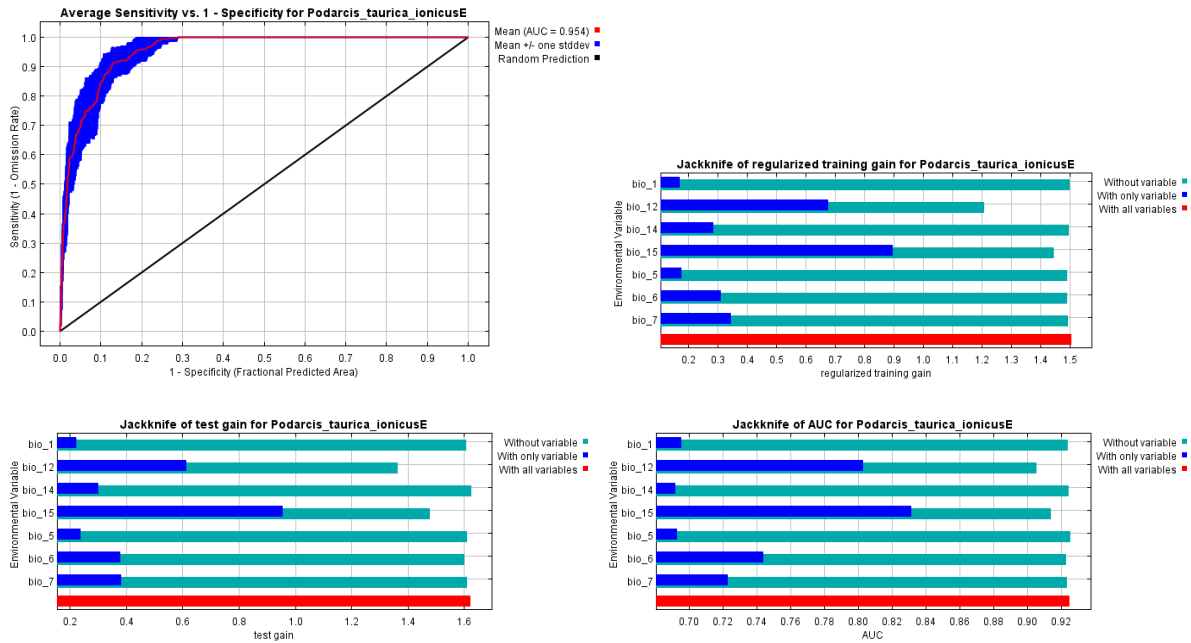
Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.12. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,993) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο *d* του taxon *P. t. ionicus*.

Πίνακας 5.14. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο *d* του taxon *P. t. ionicus*.

Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_15	69,1	71,1
bio_6	10,4	14,8
bio_1	9,9	0,0
bio_7	6,9	0,8
bio_14	3,0	12,3
bio_12	0,6	1,1
bio_5	0,0	0,0

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*» και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών



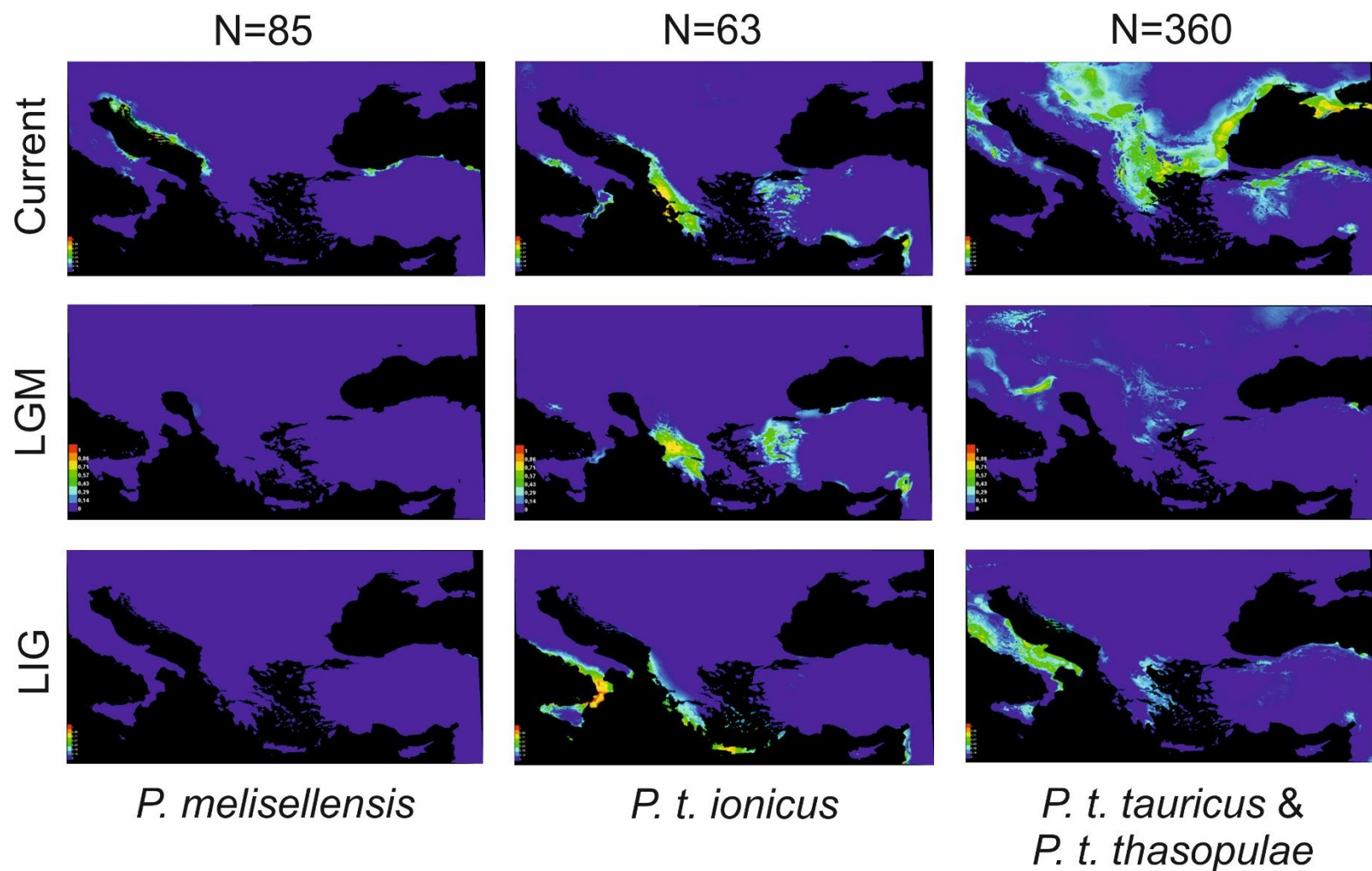
Εικόνα 5.13. Καμπύλη ROC και μέση τιμή AUC (0,954) καθώς και έλεγχοι Jackknife της ανάλυσης MaxEnt για τον υποκλάδο *e* του taxon *P. t. ionicus*.

Πίνακας 5.15. Ποσοστιαία συνεισφορά και σημαντικότητα μετάθεσης των μεταβλητών του μοντέλου MaxEnt για τον υποκλάδο *e* του taxon *P. t. ionicus*.

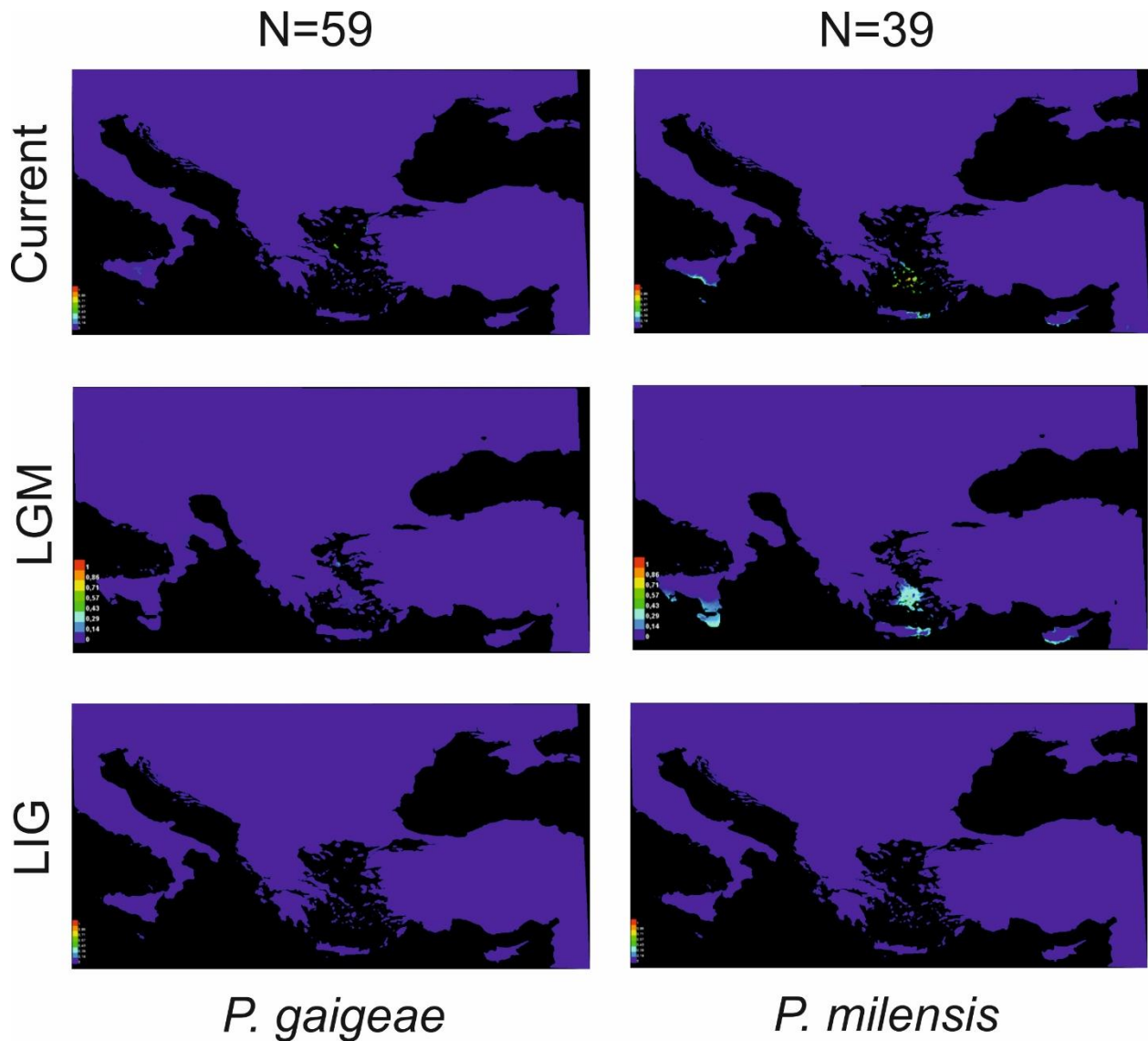
Μεταβλητή	Ποσοστιαία Συνεισφορά	Σημαντικότητα Μετάθεσης
bio_15	55,1	51,1
bio_12	36,9	32,8
bio_1	3,7	2,9
bio_6	1,7	3,9
bio_5	1,2	1,6
bio_7	1,0	2,1
bio_14	0,5	5,5

Οι προβολές των αποτελεσμάτων μοντελοποίησης χωρικών κατανομών για τις τρεις υπό εξέταση περιόδους (Present, LGM και LIG) δίνονται στις Εικόνες 5.14-5.17. Να σημειωθεί ότι λόγω του ότι εμφανίζεται ανά περίπτωση μια περιοχή μεγαλύτερη της σημερινής πραγματικής κατανομής παρατηρείται το φαινόμενο «extrapolation» σε όλα σχεδόν τα μοντέλα. Αυτό σημαίνει ότι εμφανίζονται κατάλληλες περιοχές κατανομής ενός είδους/ομάδας σε γεωγραφικές περιοχές όπου δεν υπάρχει στην πραγματικότητα, λόγω π.χ. ιστορικών παραγόντων. Για παράδειγμα, στο taxon *P. t. ionicus* η Ιταλική χερσόνησος συμπεριλαμβάνεται στη δυνητική κατανομή του taxon, χωρίς αυτό να ισχύει στην πραγματικότητα λόγω του ότι το taxon αυτό δεν εποίκισε ποτέ την Ιταλία.

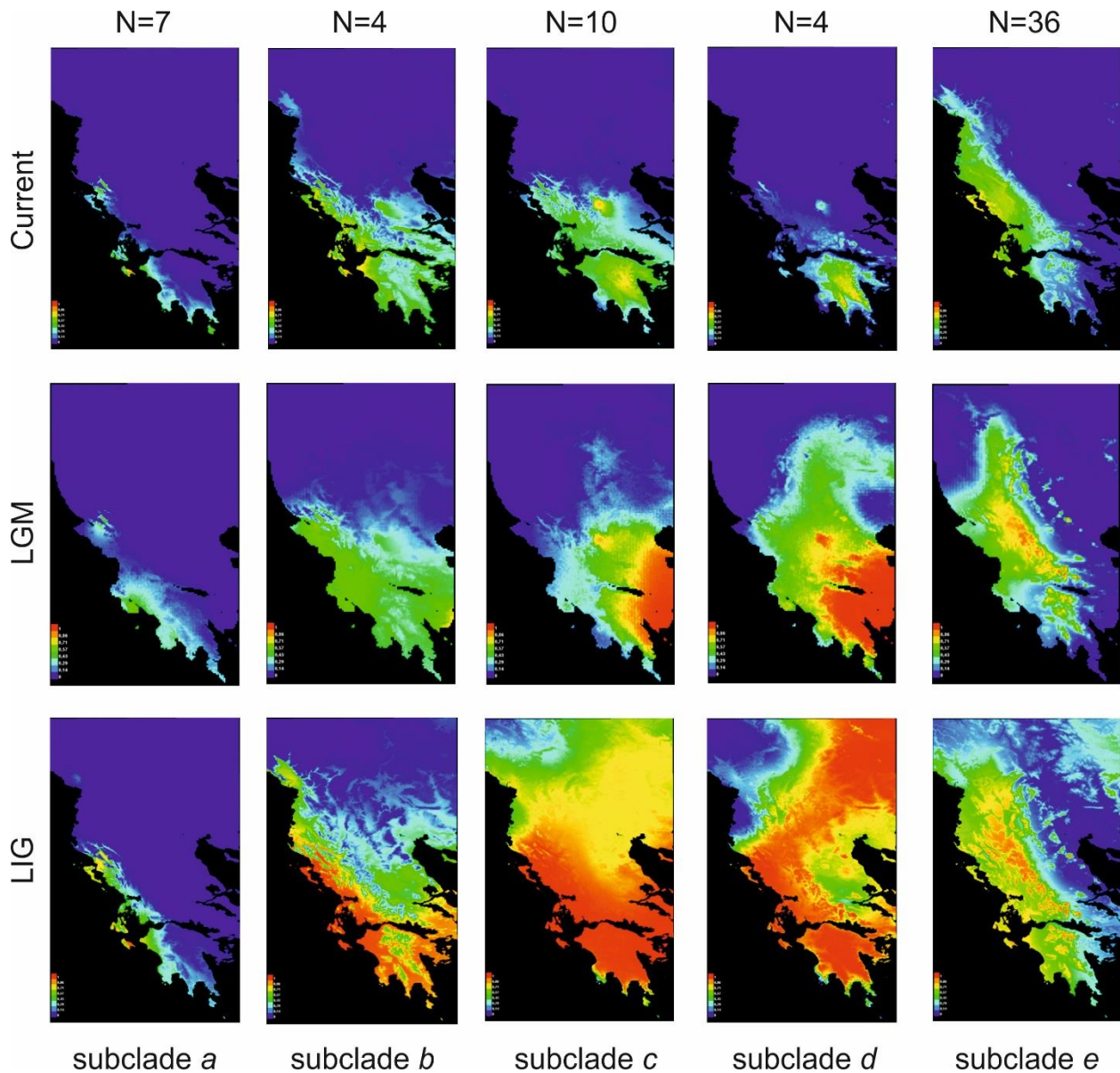
Στις περιπτώσεις των ειδών *P. gaigeae* και *P. melisellensis*, της ομαδοποίησης *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae* και της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» η δυνητική κατανομή φαίνεται να ήταν σαφώς μικρότερη κατά τη διάρκεια των περιόδων LGM και LIG σε σχέση με του παρόντος, η οποία είναι αρκετά κοντά στην πραγματική σημερινή. Στην περίπτωση του είδους *P. milensis* η δυνητική σημερινή κατανομή και της περιόδου LGM, φαίνεται να είναι μεγαλύτερες από την πραγματική σημερινή. Στην περίπτωση του taxon *P. t. ionicus* η δυνητική σημερινή είναι εφάμιλλη της πραγματικής σημερινής, κατά την περίοδο LGM φαίνεται να μειώνεται στα βόρεια, ενώ κατά την περίοδο LIG να περιορίζεται κυρίως σε περιοχές χαμηλού υψομέτρου και κοντά στα παράλια. Για τους φυλογενετικούς υποκλάδους *a-e* του taxon *P. t. ionicus* δεν γίνεται να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα λόγω του μικρού αριθμού θέσεων παρουσίας, ωστόσο για τον υποκλάδο *e* φαίνεται ότι στο παρελθόν η δυνητική κατανομή του ήταν μεγαλύτερη από αυτή του παρόντος (δυνητικού). Για το είδος *P. muralis* και την υποομάδα ειδών *P. erhardii*, η δυνητική σημερινή κατανομή είναι ως ένα βαθμό όμοια με την πραγματική, ενώ φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια της LGM περιόδου για το *P. muralis* η κατανομή αυξάνεται στα βόρεια και στα ορεινά ενώ για την υποομάδα *P. erhardii* παραμένει σχετικά σταθερή με μικρή αύξηση στα πεδινά. Κατά τη διάρκεια της περιόδου LIG για το *P. muralis* η δυνητική κατανομή αυξάνεται στα πεδινά, ενώ για το *P. erhardii* παραμένει σχετικά σταθερή και μοιάζει με τη δυνητική σημερινή κατανομή.



Εικόνα 5.14. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για το είδος *P. melisellensis*, το taxon *P. t. ionicus* και την ομαδοποίηση *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae*. Οι προβολές των αποτελεσμάτων έγιναν για τρεις περιόδους: Παρόν (Current), Τελευταία Παγετώδη Περίοδο (LGM) και Τελευταία Μεσοπαγετώδη Περίοδο (LIG). N=πλήθος θέσεων παρουσίας.

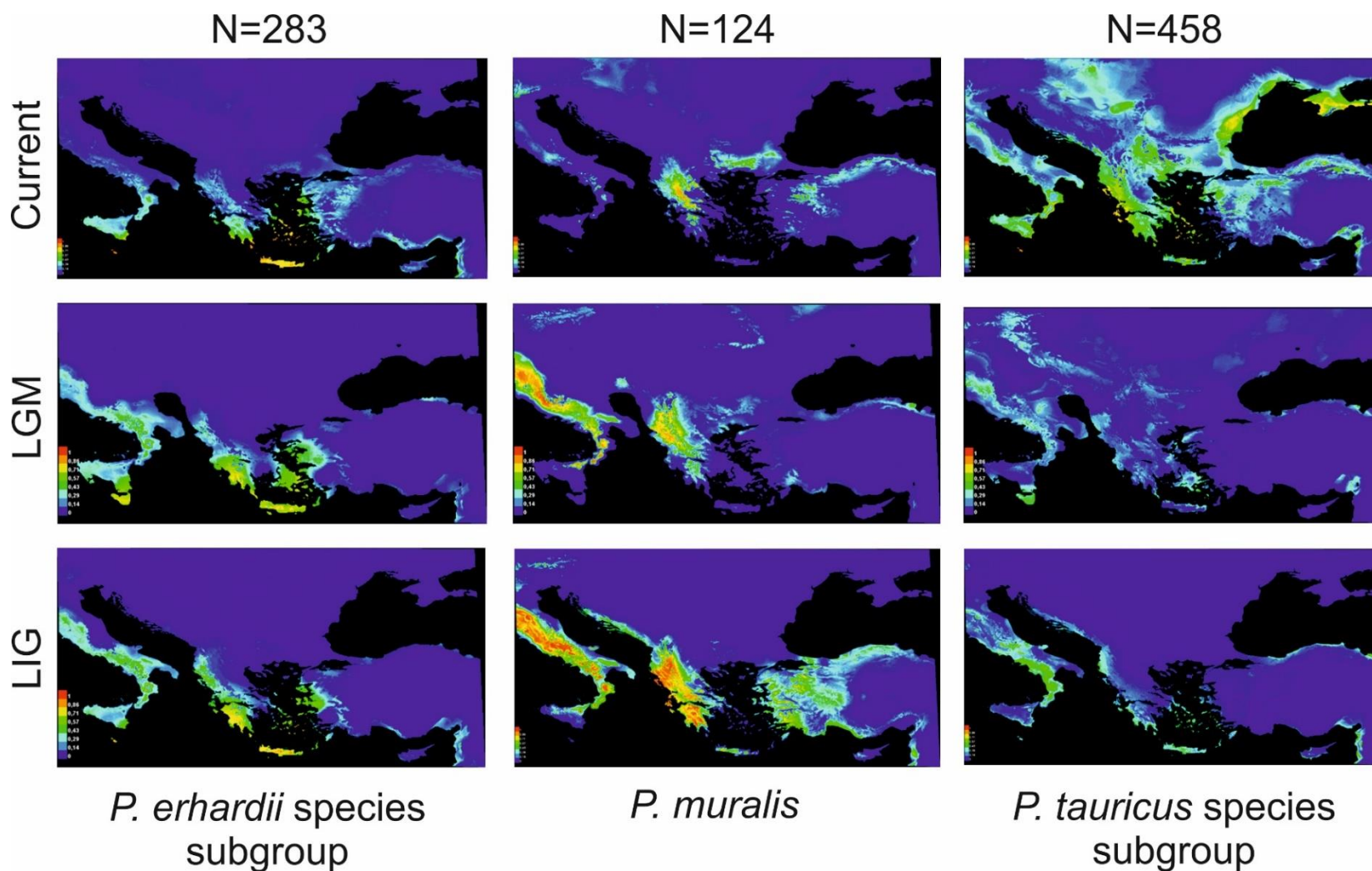


Εικόνα 5.15. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για τα είδη *P. gaigeae* και *P. milensis*. Οι προβολές των αποτελεσμάτων έγιναν για τρεις περιόδους: Παρόν (Current), Τελευταία Παγετώδη Περίοδο (LGM) και Τελευταία Μεσοπαγετώδη Περίοδο (LIG). N=πλήθος θέσεων παρουσίας.

Οριοθέτηση ειδών της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»  
και μοντελοποίηση χωρικών κατανομών

Εικόνα 5.16. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για τους πέντε φυλογενετικούς υποκλάδους (*a - e*) του taxon *P. t. ionicus*. Οι προβολές των αποτελεσμάτων έγιναν για τρεις περιόδους: Παρόν (Current), Τελευταία Παγετώδη Περίοδο (LGM) και Τελευταία Μεσοπαγετώδη Περίοδο (LIG). N=πλήθος θέσεων παρουσίας.





Εικόνα 5.17. Μοντελοποίηση Χωρικής Κατανομής βάσει του μοντέλου MaxEnt για το είδος *P. muralis* και για τις υποομάδες ειδών «*P. erhardii*» και «*P. tauricus*». Οι προβολές των αποτελεσμάτων έγιναν για τρεις περιόδους: Παρόν (Current), Τελευταία Παγετώδη Περίοδος (LGM) και Τελευταία Μεσοπαγετώδη Περίοδος (LIG). N=πλήθος θέσεων παρουσίας.

## 5. Συζήτηση

Οι αναλύσεις του παρόντος κεφαλαίου είχαν ως αποτέλεσμα την εκτίμηση του πιθανού αριθμού ειδών του γένους *Podarcis* στην ευρύτερη περιοχή των Βαλκανίων και την εκτίμηση των πιθανών κατανομών κάθε είδους ή ομαδοποίησης ειδών στην περιοχή αυτή κατά τη διάρκεια τριών χρονικών περιόδων (Current, LGM, και LIG), όπως επίσης και την εκτίμηση εκείνων των περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν περισσότερο την κατανομή κάθε είδους ή ομαδοποίησης ειδών. Συμπεριελήφθησαν δείγματα από όλο σχεδόν το εύρος των γεωγραφικών κατανομών των υπό εξέταση ειδών και εφαρμόστηκαν μέθοδοι οριοθέτησης ειδών και μοντελοποίησης χωρικών κατανομών. Τα παραγόμενα αποτελέσματα και ευρήματα του παρόντος κεφαλαίου εναρμονίζονται σε μεγάλο βαθμό με τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα των προηγούμενων κεφαλαίων, ενώ ένα μέρος τους (τα αποτελέσματα για LGM και LIG) προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για το κεφάλαιο που ακολουθεί (Έκτο Κεφάλαιο) όπου εξετάζεται η Φυλογεωγραφία της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων οριοθέτησης ειδών (Πίνακας 5.2), εννέα είδη αναγνωρίζονται εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Πιο συγκεκριμένα, εκτός από τα μορφολογικώς περιγραφμένα είδη *P. gaignae*, *P. melisellensis* και *P. milensis* ως διακριτό είδος εκτιμάται ότι θα πρέπει να συνυπολογίζεται και η ομαδοποίηση *P. t. tauricus* & *P. t. thasopulae*, υποείδη που προτάθηκε να θεωρούνται ταξινομικώς συνώνυμα στο Δεύτερο Κεφάλαιο, υπό το όνομα *P. tauricus*. Επιπλέον, ως ξεχωριστά είδη εκτιμήθηκαν οι υποκλάδοι *a - e* του taxon *P. t. ionicus*, το οποίο στο Δεύτερο Κεφάλαιο προτάθηκε να θεωρηθεί είτε ξεχωριστό είδος (*P. ionicus*) με μεγάλη ενδοειδική ποικιλότητα είτε ως σύμπλεγμα ειδών. Η διάκριση των παραπάνω ομαδοποιήσεων σε ξεχωριστά είδη θα μπορούσε να οφείλεται σε υπερεκτίμηση της ανάλυσης, ωστόσο το γεγονός ότι και οι δύο μέθοδοι (BP&P και STACEY) έβγαλαν το ίδιο αποτέλεσμα, παρότι έχουν διαφορετική προσέγγιση, μειώνει την πιθανότητα μεθοδολογικής υποκειμενικότητας.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι παραπάνω εννέα κλάδοι και υποκλάδοι εκτιμήθηκαν ως διαφορετικά είδη και από την ανάλυση PTP (Zhang et al., 2013) που εφαρμόστηκε στο Δεύτερο Κεφάλαιο για τον εντοπισμό διακριτών συστοιχιών βάσει ενός γενετικού τόπου (στην περίπτωση μας το mtDNA). Επιπλέον, η ανάλυση PTP εκτίμησε ως ξεχωριστά είδη τους τρεις υποκλάδους του είδους *P. melisellensis*, καθώς επίσης και τη γενεαλογική γραμμή του υποκλάδου *e* του taxon *P. t. ionicus*, εκτιμώντας συνολικά 12 είδη εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα της οριοθέτησης ειδών συνάδουν με τις υποθέσεις και τις προτάσεις που βασίστηκαν στα αποτελέσματα των φυλογενετικών αναλύσεων και στις αναλύσεις της πληθυσμιακής γενετικής. Ωστόσο, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, απαιτούνται επιπλέον συγκριτικά δεδομένα για την οριστική απόφαση της αναγνώρισης των πέντε φυλογενετικών υποκλάδων του taxon *P. t. ionicus* ως είδη, συμπεριλαμβανομένων πρωτίστως δεδομένων μορφολογίας και ορίων κατανομής για κάθε υποκλάδο και δευτερευόντως δεδομένα οικολογίας και οικοφυσιολογίας. Οι αναλύσεις χωρικής κατανομής για τους υποκλάδους αυτούς θα μπορούσαν να συμβάλουν στο δεύτερο σκέλος, ωστόσο, όπως υπογραμμίζεται στη συνέχεια, ο μικρός αριθμός δειγμάτων για την πλειονότητα των υποκλάδων δεν επιτρέπει την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων.

Λαμβάνοντας υπόψη την προβολή των μοντέλων στην τωρινή χρονική περίοδο (Current) και συγκρίνοντας τις δυνητικές κατανομές αλλά και τους καθοριστικούς παράγοντες που τις επηρεάζουν, μπορεί να εξαχθεί μια σειρά χρήσιμων συμπερασμάτων για την οικολογία και τη βιογεωγραφία των οργανισμών/ειδών που μελετώνται. Ξεκινώντας από τα μέλη της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» φαίνεται ότι οι δυνητικές κατανομές των τάξων (Εικ. 5.14-15) που βασίζονται σε περιβαλλοντικά δεδομένα και σε δεδομένα θέσης παρουσίας είναι σε συμφωνία ως ένα βαθμό με αυτές που παρατηρούνται στην πραγματικότητα (βλ. Εικ. 1.9 του Πρώτου Κεφαλαίου). Οι κυριότερες ασυμφωνίες είναι ότι το είδος *P. milensis* δεν εξαπλώνεται σε όλα τα νησιά του κεντρικού Αιγαίου αλλά μόνο στο νησιωτικό συγκρότημα της Μήλου και σε λίγες απομακρυσμένες νησίδες

και ότι το taxon *P. t. ionicus* δεν συναντάται στις Δαλματικές ακτές, όπως και η δυνητική κατανομή όλων των taxa αυτής της υποομάδας στην Ιταλία, στην Κρήτη, στην Κύπρο και στην Ανατολία. Οι ασυμφωνίες αυτές είναι αποτέλεσμα του φαινομένου «extrapolation» των δεδομένων, στο οποίο περιοχές που δεν αποτελούν μέρος των πραγματικών κατανομών των ειδών εμφανίζονται ως δυνητικές κατανομές λόγω σύγκλισης των περιβαλλοντικών συνθηκών που έχουν καταγραφεί και υπάρχουν μεταξύ περιοχών δυνητικών και πραγματικών κατανομών. Συνήθως ο κύριος λόγος που η δυνητική κατανομή δεν αποτελεί μέρος της πραγματικής οφείλεται σε ιστορικά φαινόμενα. Για παράδειγμα, η παρουσία των *Podarcis* στην Ανατολία δεν μπορεί να έχει κάποια επιστημονική βάση, γιατί σύμφωνα με τα δεδομένα που υπάρχουν αυτή τη στιγμή το γένος αυτό ήρθε στον ελλαδικό χώρο μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του λεγόμενου «Φράγματος του Αιγαίου» πριν από περίπου εννέα εκατομμύρια χρόνια (Creutzburg, 1963; Dermitzakis and Papanikolaou, 1981). Για τον ίδιο ακριβώς λόγο θα πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι στην περίπτωση που οι δυνητικές (λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών, αλλά και οι πραγματικές) κατανομές δυο taxa διαφέρουν δε σημαίνει απαραίτητα ότι τα δυο αυτά taxa διαφέρουν ως προς την οικολογία τους. Είναι μεν μια ένδειξη ότι τα δύο taxa ζουν σε διαφορετικές συνθήκες, ωστόσο το αν είναι οικολογικά προσαρμοσμένα μόνο σε αυτές και όχι σε μεγαλύτερο εύρος δεν μπορεί να φανεί από τέτοιου τύπου δεδομένα. Όποια συμπεράσματα εξάγονται λοιπόν, θα πρέπει να αντιμετωπιστούν με προσοχή.

Συγκρίνοντας τις δυνητικές κατανομές και φιλτράροντάς τις νοητά για τις περιπτώσεις «extrapolation», φαίνεται ότι τα μέλη της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» κατανέμονται σε περιοχές οι οποίες διαφέρουν όσον αφορά τις κύριες περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Έτσι, τα είδη *P. gaigeae* και *P. milensis* κατανέμονται σε περιοχές χαμηλού υψομέτρου με χαμηλό ποσοστό βροχόπτωσης, χαρακτηριστικές συνθήκες δηλαδή των νησιών στα οποία τα είδη αυτά ενδημούν, με τον κύριο περιβαλλοντικό παράγοντα που επηρεάζει την κατανομή των ειδών αυτών να είναι το Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος (Εικ. 5.2 και 5.5 και Πίνακες 5.4 και 5.7). Φαίνεται λοιπόν

ότι τα δύο αυτά είδη έχουν παρόμοια οικοθέση όσο αφορά τις περιβαλλοντικές συνθήκες που εξετάζονται, ωστόσο είναι απομονωμένα μεταξύ τους γεωγραφικά, αλλά και γενετικά, όπως φαίνεται από τα γενετικά δεδομένα (βλ. προηγούμενα κεφάλαια). Το taxon *P. t. ionicus* κατανέμεται σε περιοχές με μεγάλο ποσοστό Ετήσιας Βροχόπτωσης (δυτική Ελλάδα και δυτική Αλβανία) και που επηρεάζονται έντονα από την Εποχική Βροχόπτωση (Εικ. 5.3 και Πίνακας 5.5). Το είδος *P. melisellensis* που βρίσκεται και αυτό δυτικά, αλλά πολύ πιο βόρεια από το *P. t. ionicus*, επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την Ελάχιστη Θερμοκρασία του Ψυχρότερου Μήνα και τη Βροχόπτωση του Ξηρότερου Μήνα (Εικ. 5.4 και Πίνακας 5.6). Τα δύο αυτά taxa έχουν επικαλυπτόμενη δυνητική, αλλά και πραγματική κατανομή στη βορειοδυτική Αλβανία (βλ. Εικόνες 1.5 και 1.9 του Πρώτου Κεφαλαίου), ωστόσο δεν έχουν βρεθεί συντοπικά, πράγμα που δεν αποκλείει την οικολογική διαφοροποίησή τους. Τέλος, η ομαδοποίηση των taxa *P. t. tauricus*/*P. t. thasopulae* λόγω την μεγάλης εξάπλωσης που έχουν, επηρεάζεται σχεδόν εξίσου από διάφορους παράγοντες, όπως το Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος, η Ελάχιστη Θερμοκρασία του Ψυχρότερου Μήνα και η Εποχική Βροχόπτωση (Εικ. 5.7 και Πίνακας 5.9). Η γενετική απομόνωση του taxon αυτού από τα δύο προηγούμενα οφείλεται κυρίως στη γεωγραφική απομόνωσή του λόγω των βιογεωγραφικών φραγμάτων των Ελληνίδων (οροσειρά Πίνδου) και των Διναρίδων, ωστόσο και η οικολογική διαφοροποίηση δεν μπορεί να αποκλειστεί ως ενδεχόμενο. Από τα παραπάνω, και λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των προηγούμενων κεφαλαίων, σύμφωνα με τα οποία οι δύο φυλογενετικοί κλάδοι του taxon *P. tauricus sensu stricto* (*P. t. ionicus* και *P. t. tauricus*/*P. t. thasopulae*) είναι μορφολογικά, γεωγραφικά και φυλογενετικά διακριτοί, υποστηρίζεται η υπόθεση ότι η ταξινόμηση του παραπάνω είδους πρέπει να αλλάξει, με το διαχωρισμό του σε δύο ξεχωριστά taxa.

Τα αποτελέσματα για τους φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon *P. t. ionicus* δείχνουν ότι οι πέντε υποκλάδοι έχουν μεγάλες αλληλεπικαλύψεις στις δυνητικές κατανομές τους (Εικ. 5.16), ωστόσο ο μικρός αριθμός δειγμάτων ( $N \leq 10$  για τους υποκλάδους *a-d*, το οποίο αποτελεί και όριο στο MaxEnt) για την πλειονότητα των

υποκλάδων δεν επιτρέπει την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων. Το μόνο που μπορεί να αναφερθεί αφορά τον υποκλάδο *e* (N=36). Η δυνητική κατανομή του είναι παρόμοια με την πραγματική (σε σχέση με τα όρια κατανομής που γνωρίζουμε επί του παρόντος) και ότι θα μπορούσε, αν δεν υφίσταται κάποιος ιστορικός περιορισμός, να υπάρχει σε περιοχές όπου κατανέμονται οι υπόλοιποι υποκλάδοι. Οι οικολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στο υποείδος *P. t. ionicus* επικεντρώθηκαν σε πληθυσμούς των Επτανήσων [Κέρκυρα, Κεφαλλονιά, Ιθάκη και Ζάκυνθος (Chondropoulos et al., 1993), Στροφάδες (Valakos and Mylonas, 1992)], της Ηπείρου και της δυτικής Πελοποννήσου (Chondropoulos and Lykakis, 1983). Ουσιαστικά μελετήθηκαν πληθυσμοί του υποκλάδου *a* (νότια Επάνησα) και του υποκλάδου *e* (Κέρκυρα, Ήπειρος και δυτική Πελοπόννησος) όσο αφορά αφθονία, μορφολογικά (μήκος, βάρος, κλπ.) χαρακτηριστικά, στοιχεία βιολογίας (διφασική δραστηριότητα εντός της ημέρας, περίοδος αναπαραγωγής, αριθμός αυγών, κλπ.) και οικολογικών προτιμήσεων. Στην πλειονότητα των συγκρίσεων δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών παρά μόνο η ύπαρξη διαφορετικού αριθμού εκκολάψεων μεταξύ ορεινών (Ήπειρος) και πεδινών πληθυσμών που οφείλεται στη μικρότερη διάρκεια δραστηριότητας των ζώων λόγω κλιματικών συνθηκών. Επίσης στατιστική σημαντικότητα εμφανίζεται στα χαρακτηριστικά των αυγών (μήκος, πλάτος, όγκος κλπ.) όσο αφορά του πληθυσμούς της Ηπείρου και της Κέρκυρας σε σχέση με τους υπόλοιπους. Τέλος, σημαντική διαφορά όσο αφορά συνολικά το μέγεθος παρατηρείται στον πληθυσμό των Στροφάδων (νησίδα Άρπια) ο οποίος θεωρείται ότι χαρακτηρίζεται από το φαινόμενο του νησιωτικού γιγαντισμού (Valakos and Mylonas, 1992).

Τέλος, συγκρίνοντας τις δύο υποομάδες ειδών των Βαλκανικών *Podarcis* και το *P. muralis* είναι εμφανές ότι τα τρία αυτά taxa διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τη δυνητική κατανομή τους βάσει περιβαλλοντικών συνθηκών (Εικ. 5.17). Η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» είναι γνωστό ότι όντως διαφέρει οικολογικά σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες, αφού αντίθετα με το κοινό όνομα του γένους (τοιχώσαυρες - wall lizards) στο ενδιαίτημα των ειδών της δεν περιλαμβάνονται οι τοίχοι, πέτρες, βράχοι, ξερολιθιές,

σάρες, μακί, φρύγανα κλπ., μέρη δηλαδή που συνήθως συναντάει κανείς τα είδη της υποομάδας «*P. erhardii*» και το *P. muralis*, αλλά ανοικτές εκτάσεις, ξέφωτα, μονοετείς καλλιέργειες, λιβάδια και αμμοθίνες (Valakos et al., 2008). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν επιλεγεί για τις αναλύσεις σχετίζονται κυρίως με τη θερμοκρασία και τη βροχόπτωση, κάτι που συσχετίζεται άμεσα με τον τύπο βλάστησης και που αναμένεται να έχει σαφή επιρροή στην περίπτωση οικολογικά διακριτών ομάδων βάσει αυτού. Έτσι λοιπόν φαίνεται ότι η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» κατανέμεται σε πιο ανοικτές πεδινές εκτάσεις, όχι απαραίτητα χαμηλού υψομέτρου (π.χ. σε οροπέδια), αν και προτιμά σχετικά χαμηλό υψόμετρο (0-800μ), με τις κύριες περιβαλλοντικές συνθήκες που επηρεάζουν την κατανομή της να είναι η Ελάχιστη Θερμοκρασία του Ψυχρότερου Μήνα και το Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος (Εικ. 5.8 και Πίνακας 5.10). Η υποομάδα «*P. tauricus*» κατανέμεται σε περιοχές που έχουν άμεση επιρροή από το Ετήσιο Θερμοκρασιακό Εύρος και την Εποχική Βροχόπτωση (Εικ. 5.1 και 5.17 και Πίνακας 5.3). Οι δύο υποομάδες είναι συντοπικές σε πολλές περιοχές (π.χ. *P. peloponnesiacus* και *P. t. ionicus* στην Πελοπόννησο), ωστόσο λόγω της οικολογικής διαφοροποίησής τους δε φαίνεται να ανταγωνίζονται μεταξύ τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι πληθυσμοί του είδους *P. erhardii* και του ταχον *P. t. ionicus* στην περιοχή των λιμνών Μικρή και Μεγάλη Πρέσπα, οι οποίοι απέχουν κάποια μέτρα σε απόσταση αλλά έχουν τελείως διαφορετικό ενδιαίτημα (πέτρες, τοίχοι και σάρες για το πρώτο ταχον και αμμοθίνες και αλόφυτα για το δεύτερο). Το πιθανότερο όμως είναι η διακριτή κατανομή των παραπάνω taxa να έχει επηρεαστεί και από ιστορικούς λόγους (βλ. συζήτηση Έκτου Κεφαλαίου). Αντίθετα με τις δύο υποομάδες ειδών των Βαλκανίων, το είδος *P. muralis* φαίνεται να προτιμά ορεινούς όγκους μεγάλου σχετικά υψομέτρου, με τις κύριες περιβαλλοντικές παραμέτρους που επηρεάζουν την κατανομή του να είναι η Βροχόπτωση του Ξηρότερου Μήνα, η Ετήσια Βροχόπτωση και η Ελάχιστη Θερμοκρασία του Ψυχρότερου Μήνα. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, αλλά υποστηρίζεται και από τη βιβλιογραφία, το συγκεκριμένο είδος είναι καλά προσαρμοσμένο σε ψυχρά

περιβάλλοντα (Michaelides et al., 2015). Το είδος αυτό, λόγω της επιλογής ενδιαιτημάτων του, πιθανώς ανταγωνίζεται τα είδη της υποομάδας *P. erhardii* στις ζώνες επαφής.

Τα αποτελέσματα των προβολών για τις περιόδους LGM και LIG χρησιμοποιούνται και συζητούνται κυρίως στο Έκτο Κεφάλαιο, όπου αναλύεται η φυλογεωγραφία των παραπάνω taxa.



## 6. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης οριοθέτησης ειδών υπέδειξαν την ύπαρξη εννέα ειδών εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Αυτό επιβεβαιώνει τη θεώρηση του taxon *P. ionicus* ως σύμπλεγμα ειδών και δίνει μεγάλη βαρύτητα στην ανάγκη ταξινομικής αναθεώρησης του taxon αυτού. Όσον αφορά τους πέντε φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon *P. t. ionicus*, απαιτούνται επιπλέον συγκριτικά δεδομένα για την οριστική απόφαση της αναγνώρισής τους ως διακριτά είδη, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων μορφολογίας, οικολογίας, φυσιολογίας και ορίων κατανομής για κάθε υποκλάδο. Οι αναλύσεις χωρικής κατανομής έδειξαν ότι, ως ένα βαθμό, υπάρχουν διακριτές δυναμικές κατανομές βάσει περιβαλλοντικών συνθηκών μεταξύ των taxa της παραπάνω υποομάδας, παρατήρηση που ενισχύει την υπόθεση διάκρισης του taxon *P. t. ionicus* ως είδος ή ομάδα ειδών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ

---

### Φυλογεωγραφία της υποομάδας «*Podarcis tauricus*»

Τα δεδομένα είναι μέρος της υπό προετοιμασία εργασίας (Παράρτημα IV):

*Psonis et al. (2017) Genomic phylogeography and species distribution modelling of the Podarcis tauricus (Sauria: Lacertidae) species subgroup. (In preparation).*

## 1. Περίληψη κεφαλαίου

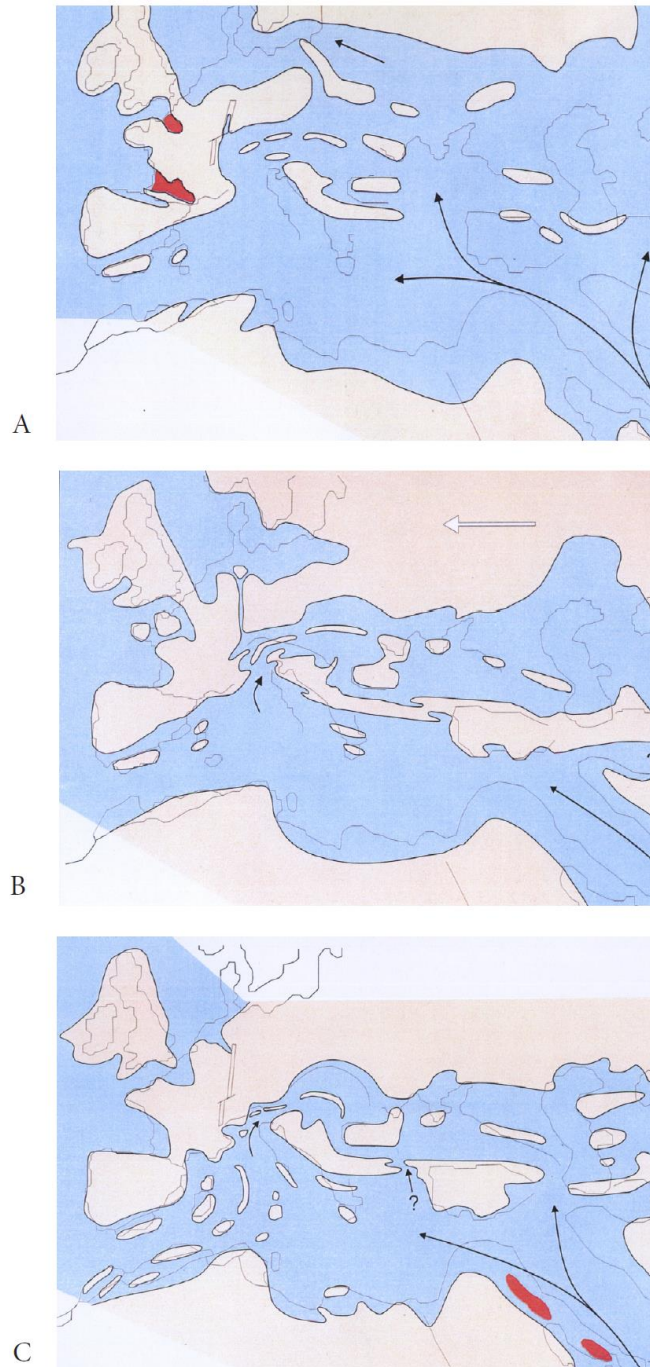
Η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» αποτελείται από τέσσερα μορφολογικώς αναγνωρισμένα είδη. Οι φυλογενετικές και φυλογενωμικές αναλύσεις καθώς κι αυτές της οριοθέτησης ειδών και της πληθυσμιακής γενετικής έδειξαν την ύπαρξη αρκετών διακριτών κλάδων και υποκλάδων εντός της υποομάδας που ενδεχομένως μπορούν να θεωρηθούν διαφορετικά είδη, με τις σχέσεις αυτών να έχουν επιλυθεί σε μεγάλο βαθμό κυρίως κάνοντας χρήση γενωμικών δεδομένων. Οι παραπάνω επιλυμένες σχέσεις, σε συνδυασμό με τη γνώση που υπάρχει σχετικά με την παλαιογεωγραφία και την παλαιοκλιματολογία των Βαλκανίων αλλά και σε συνδυασμό με τη μοντελοποίηση χωρικών κατανομών, αποτελούν το υπόβαθρο για τη διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας της ομάδας που μελετάται. Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω δεδομένα και εφαρμόζοντας μια σειρά επιπλέον αναλύσεων, όπως η εκτίμηση των χρόνων απόκλισης, η κατασκευή δικτύων μιτοχονδριακών απλοτύπων και οι εκτιμήσεις δημογραφικών συμβάντων, έγινε η ανασύσταση της φυλογεωγραφίας της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» στον χώρο της Βαλκανικής χερσονήσου. Ως τελικό αποτέλεσμα παρουσιάζονται τα φυλογεωγραφικά σενάρια αποίκησης των Βαλκανίων από την παραπάνω υποομάδα και της διαφοροποίησής της από το Ανώτερο Μειόκαινο έως και σήμερα.

**Λέξεις κλειδιά:** Βικαριανισμός, Κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου, Πλειστοκαινικά καταφύγια, Φυλογεωγραφικό σενάριο, Χρόνοι απόκλισης

## 2. Εισαγωγή κεφαλαίου

### 2.1. Παλαιογεωγραφία της περιοχής των Βαλκανίων

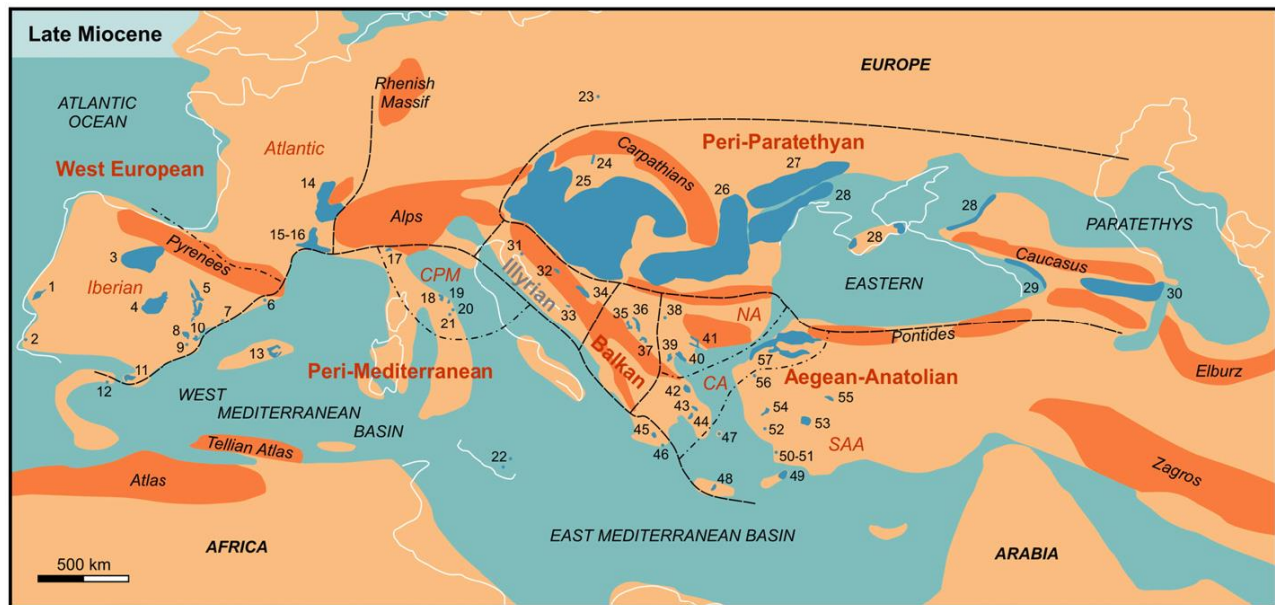
Σε γεωλογική κλίμακα, η εξέλιξη της χλωρίδας και της πανίδας μιας περιοχής μπορεί να επηρεαστεί από γεωγραφικές και κλιματικές αλλαγές, οι οποίες συνδέονται/σχετίζονται με τεκτονικές μεταβολές/διακυμάνσεις. Όπως αναφέρθηκε στο Πρώτο Κεφάλαιο, οι πρώτες σημαντικές γεωλογικές αλλαγές στην ανατολική Μεσόγειο σχετίζονται με τις κινήσεις ηπειρωτικών τεκτονικών πλακών και τη γεωλογική εξέλιξη και επέκταση της Τηθύος θάλασσας κατά το Παλαιογενές (Παλαιόκαινο, Ηώκαινο και Ολιγόκαινο). Στην Εικόνα 6.1 φαίνονται οι κύριες φάσεις της γεωτεκτονικής εξέλιξης του φλοιού της Γης στη Νότια Ευρώπη από το Ανώτερο Ηώκαινο (37,8 - 33,9 εκ. χρόνια) έως το Κατώτερο Μειόκαινο (23,8 - 20,44 εκ. χρόνια). Κατά τη διάρκεια του Ανωτέρου Ηωκαίνου, καθώς η αφρικανική και η ευρασιατική τεκτονική πλάκα συνέκλιναν, δημιουργήθηκαν πολύπλοκα πρότυπα κίνησης τεκτονικών μικροπλακών και ακολούθησαν συγκλίσεις και συγκρούσεις αυτών. Το μέτωπο της αφρικανικής τεκτονικής πλάκας υποβυθίστηκε κάτω από την ευρωπαϊκή προκαλώντας μεγάλη αποσταθεροποίηση του πυθμένα της θάλασσας Τηθύος, κατακερματίζοντας το μέτωπο της ευρωπαϊκής πλάκας σε μικρότερα νησιά και χερσονήσους, τα οποία στη συνέχεια κινήθηκαν ανεξάρτητα (Grove and Rackham, 2001). Η αποκορύφωση αυτών των τεκτονικών μεταβολών συνέβη κάποια στιγμή μέσα στο Νεογενές (Μειόκαινο, Πλειόκαινο) με την πρόσκρουση του Αδριατικού-Απούλιου «ακρωτηρίου» με την Ευρασία, γεγονός που προκάλεσε μια φάση περιστροφής της Ευρασίας με φορά αντίθετη του ρολογιού και αντιπροσωπεύει την κορύφωση της Αλπικής ορογένεσης στα περίπου 20 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα (Robertson and Dixon, 1984). Όπως φαίνεται και από τους παλαιογεωγραφικούς χάρτες των Εικόνων 6.2 - 6.4, η Αλπική ορογένεση συνεχίστηκε σε μικρότερο βαθμό μέσα στο Νεογενές και το Τεταρτογενές (Πλειστόκαινο, Ολόκαινο) με φαινόμενα ισοστατισμού, ενώ συνεχίζεται ακόμα και σήμερα (Reed et al., 2004).



Εικόνα 6.1. Αναπαράσταση των γεωτεκτονικών διεργασιών και ανακατατάξεων επιλεγμένων τμημάτων του φλοιού της Γης στη νότια Ευρώπη από το Ανώτερο Ηώκαινο έως το Κατώτερο Μειόκαινο [σύμφωνα με τον (Rögl, 1998) και τροποποιημένοι από τον Savić (2008)]. A. Ανώτερο Ηώκαινο, 37,8 - 33,9 εκ. χρόνια. B. Κατώτερο Ολιγόκαινο, 33,9 - 28,1 εκ. χρόνια. C. Κατώτερο Μειόκαινο, 23,3 - 20,44 εκ. χρόνια.



Εικόνα 6.2. Παλαιογεωγραφικός χάρτης του Μέσου Μειοκαινού (15,97 - 11,63 εκ. χρόνια) βάσει παλυνολογικών δεδομένων, όπου φαίνονται οι κύριες παλαιογεωγραφικές μονάδες [σύμφωνα με τους Rorron et al. (2004) και τροποποιημένος από τους Neubauer et al. (2015)].



Εικόνα 6.3. Παλαιογεωγραφικός χάρτης του Ανώτερου Μειόκαινού (11,63 - 5,33 εκ. χρόνια) βάσει παλυνολογικών δεδομένων, όπου φαίνονται οι κύριες παλαιογεωγραφικές μονάδες [σύμφωνα με τους Rorron et al. (2004) και τροποποιημένος από τους Neubauer et al. (2015)].

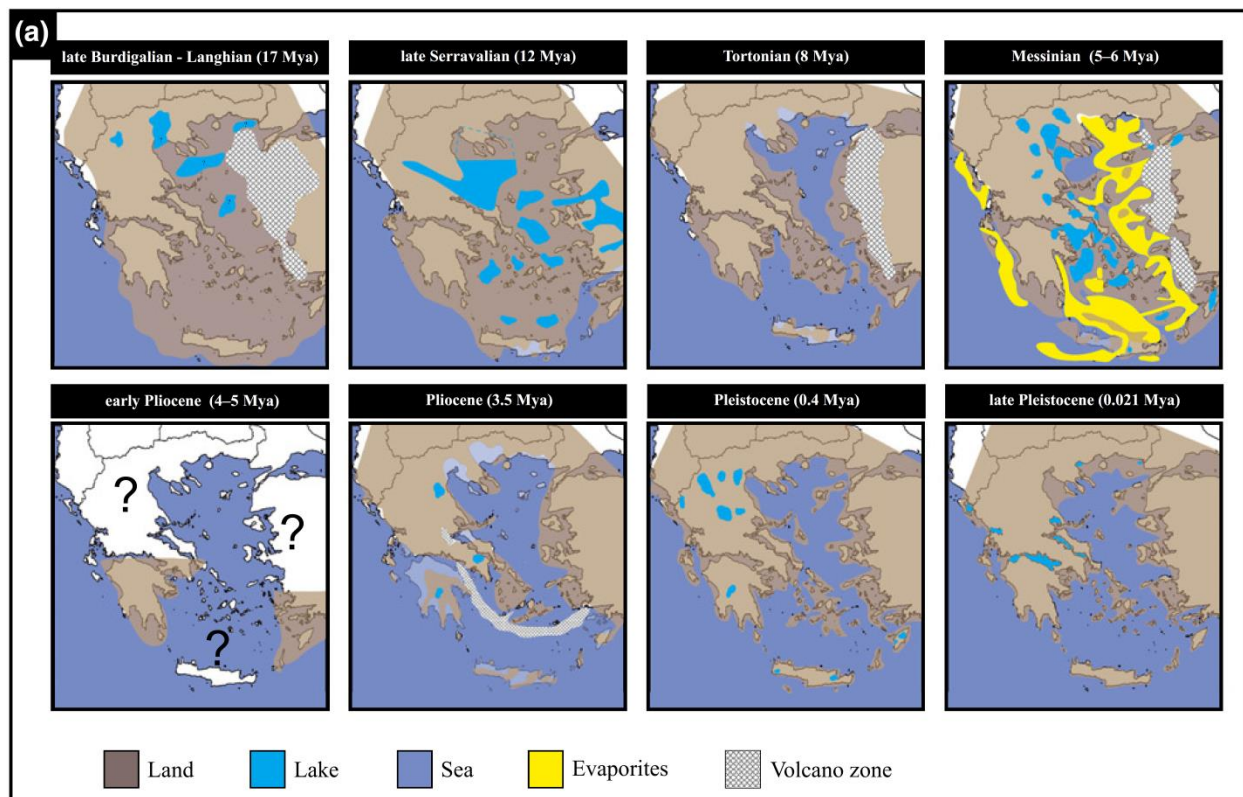


Εικόνα 6.4. Παλαιογεωγραφικός χάρτης του Πλειοκαίνου (5,33 - 2,58 εκ. χρόνια) βάσει παλυνολογικών δεδομένων, όπου φαίνονται οι κύριες παλαιογεωγραφικές μονάδες [σύμφωνα με τους Poron et al. (2004) και τροποποιημένος από τους Neubauer et al. (2015)].

Η γεωδυναμική εξέλιξη των Νοτίων Βαλκανίων, η περιοχή δηλαδή στην οποία εστιάζει κυρίως η παρούσα διατριβή και αναφέρεται βιβλιογραφικά ως ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου, ξεκίνησε ουσιαστικά από το τέλος του Νεογενούς και είναι αποτέλεσμα του φαινομένου της «υποχώρησης της ελληνικής ζώνης» όπως αναφέρεται από τον Meulenkamp (1985) που προκάλεσε φαινόμενα τεκτονισμού, ηφαιστειακής δραστηριότητας και ευστατισμού.

Η παλαιογεωγραφική εξέλιξη του χώρου του Αιγαίου από το Μέσο Βουρδιγάλιο (Μέσο Μειόκαινο) μέχρι και τους προϊστορικούς χρόνους του Τεταρτογενούς (Πλειστόκαινο και Ολόκαινο, δηλαδή από ~17 εκατομμύρια χρόνια έως 11.700 χρόνια πριν από σήμερα) μπορεί να περιγραφεί από μια σειρά παλαιογεωγραφικών χαρτών (Εικ. 6.5). Αναλυτική περιγραφή των γεγονότων εξέλιξης του Αιγαίου έχει δοθεί ήδη από τους Roulakakis et al. (2014), επομένως παρατίθενται τα πέντε κύρια στάδια της. Στην πρώτη φάση (23 - 12 εκ. χρόνια), ο χώρος του σημερινού Αιγαίου, των Βαλκανίων και της Μικράς Ασίας αποτελούσαν μια ενιαία ηπειρωτική περιοχή, το νοτιότερο τμήμα της

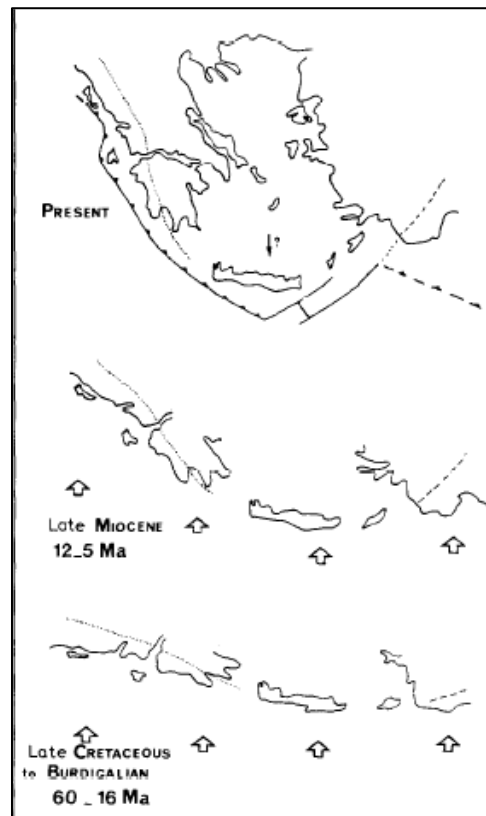
οποίας ονομάζεται Αιγαίδα. Στη δεύτερη φάση (12 – 5,5 εκ. χρόνια) συνέβη έντονη διάρρηξη της Αιγαίδας με την εισχώρηση της θάλασσας, σχηματίζοντας το φράγμα του Αιγαίου (Creutzburg, 1963; Dermitzakis and Papanikolaou, 1981). Να σημειωθεί πως στα 5,96-5,33 εκ. χρόνια είχαμε την κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου (Krijgsman et al., 1999; Krijgsman et al., 2010). Στην τρίτη φάση (5,5 – 2 εκ. χρόνια) το φράγμα του Αιγαίου εξακολουθεί να επεκτείνεται, ενώ παράλληλα το Αιγαίο κατακερματίζεται σε πολυάριθμα νησιά. Στην τέταρτη φάση (2 εκ. χρόνια – 15.000 χρόνια) γίνονται αλλαγές στη στάθμη της θάλασσας (ευστατικές μεταβολές). Στην πέμπτη και τελευταία φάση (15.000 χρόνια έως σήμερα) παρατηρείται επίκλυση της θάλασσας και κάλυψη παράκτιων περιοχών, ενώ έντονη είναι και η επίδραση του ανθρώπου.



Εικόνα 6.5. Η περιοχή του Αιγαίου από το Μέσο Μειόκαινο έως σήμερα [βάσει (Creutzburg, 1963; Daams and Van Der Weerd, 1980; Dermitzakis and Papanikolaou, 1981; Meulenkamp, 1985; Anastasakis and Dermitzakis, 1990) και επανασχεδιασμένο από τους Roulakakis et al. (2014)].



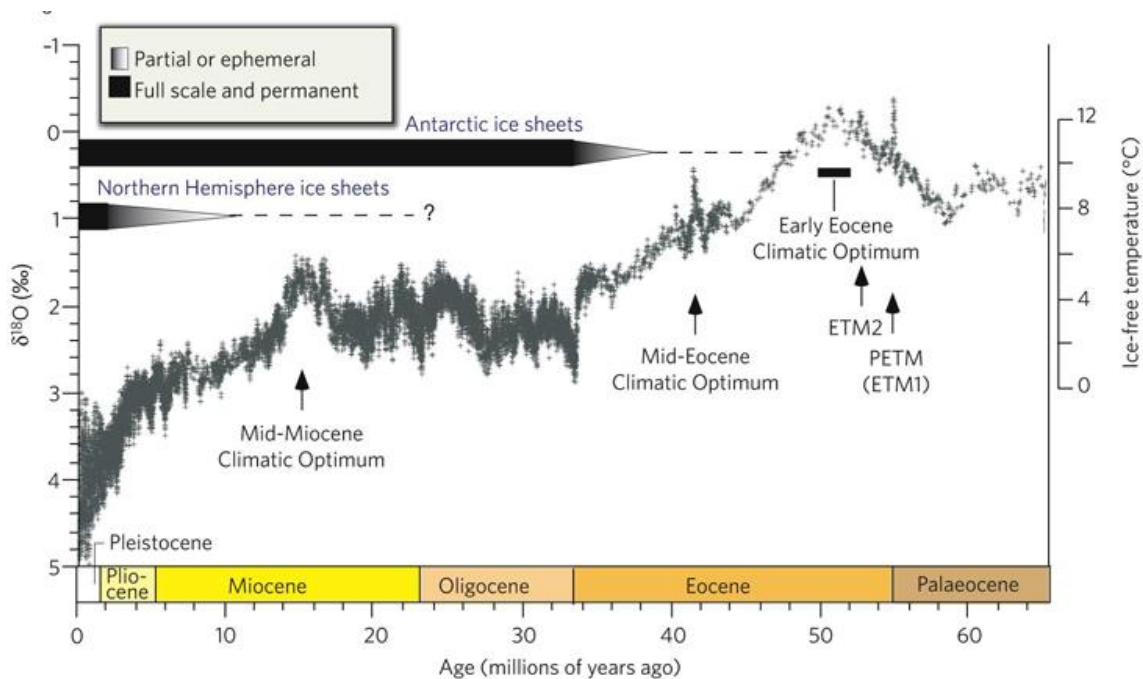
Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι στην πλειονότητά τους οι παλαιογεωγραφικοί χάρτες στηρίζονται στη σημερινή γεωγραφία του ελληνικού χώρου, παραβλέποντας την πιθανή θέση που είχαν οι περιοχές στο παρελθόν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι περιοχές του αιγαιακού χώρου, εξαιτίας των διαφόρων γεωλογικών φαινομένων, κινούνται και μάλιστα με διαφορετικές ταχύτητες. Για παράδειγμα, η Κρήτη κινείται προς το νότο με ταχύτητα της τάξης των 30mm ανά έτος. Βάσει αυτού και της γωνίας μετακίνησης της Κρήτης και της Πελοποννήσου, μπορεί να εκτιμηθεί ότι η Κρήτη στο ανώτερο Μειόκαινο ήταν πολύ βορειότερα σε σύγκριση με σήμερα, προσεγγίζοντας τη θέση της Πελοποννήσου (Kissel and Laj, 1988) (Εικ. 6.6).



Εικόνα 6.6. Σχηματική απεικόνιση της κίνησης και των διαδοχικών θέσεων του Ελληνικού Τόξου. Η διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει τις εξωτερικές Ελληνίδες οροσειρές.

## 2.2. Παλαιοκλιματολογία και παγετωνικά «καταφύγια»

Μετά την τελευταία μεγάλη εξαφάνιση ειδών που συμπίπτει με την έναρξη του Καινοζωικού Αιώνα (65 εκατομμύρια χρόνια πριν), το κλίμα, σε παγκόσμιο επίπεδο, άρχισε να γίνεται πιο θερμό μέχρι το Κατώτερο Ηώκαινο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.7. Έκτοτε άρχισε να γίνεται πιο ψυχρό, ακολούθησε μια περίοδος σταθερότητας από το Ολιγόκαινο έως το Κατώτερο Μειόκαινο, και στη συνέχεια άρχισε πάλι να παρατηρείται μια σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας (Zachos et al., 2008). Στο Ανώτερο Μειόκαινο αρχίζει η δημιουργία αρκτικών παγετώνων, με την επέκτασή τους να κορυφώνεται στο Πλειστόκαινο, οπότε και εμφανίζονται αυξανόμενης έντασης παγετώδεις/μεσοπαγετώδεις περιόδους (Hewitt, 2000). Οι πιο πρόσφατες περιόδους είχαν περιοδικότητα της τάξης των 100.000 ετών, η οποία προκαλείται από την εκκεντρότητα της τροχιάς της Γης γύρω από τον Ήλιο (ένας από τους τρεις Κύκλους Μιλάνκοβιτς). Στο Κατώτερο Πλειστόκαινο - Πλειόκαινο, οι περιόδους ήταν μικρότερης έντασης και είχαν περιοδικότητα της τάξης των 41.000 ετών που αντικατοπτρίζει τη λοξότητα του άξονα της Γης (Δεύτερος Κύκλος Μιλάνκοβιτς). Σε συνδυασμό με τον Τρίτο Κύκλο Μιλάνκοβιτς που σχετίζεται με την περιοδικότητα (23.000/19.000 χρόνια) της αλλαγής κατεύθυνσης του άξονα της Γης, οι τρεις αυτοί Κύκλοι επηρεάζουν την απορρόφηση ηλιακής ακτινοβολίας από τη Γη (λόγω δηλαδή απόστασης και γωνίας) και επομένως το κλίμα της.



Εικόνα 6.7. Η εξέλιξη του κλίματος της Γης σε συνδυασμό με τα κύρια γεωλογικά γεγονότα κατά τον Καινοζωικό Αιώνα [σύμφωνα με τους Zachos et al. (2008)].

Η συνεχιζόμενη ψύχρανση του κλίματος κατά το Τεταρτογενές χαρακτηρίζεται από κλιματικές ταλαντώσεις, απεριθωπώντας στο τελευταίο ένα εκατομμύριο χρόνια 10 κύριες παγετώδεις περιόδους, με ενδιάμεσες θερμότερες μεσοπαγετώδεις περιόδους. Εντός κάθε περιόδου έχουν καταγραφεί πολλές απότομες μικρότερες αλλαγές κλίματος διάρκειας από εκατοντάδες έως λίγες χιλιάδες χρόνια (επονομαζόμενες ως ταλαντώσεις χιλιετίας) και εμφανίζουν μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος (Hewitt, 2011). Κατά τη διάρκεια του τελευταίου παγετωνικού μέγιστου (25.000 - 18.000 χρόνια πριν) η Ευρώπη καλυπτόταν με πάγο μέχρι το Νόργουιτς και τη Βαρσοβία. Νοτιότερα ξεκινούσαν οι ζώνες τούνδρας και στέπας. Σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων, οι γεωγραφικές κατανομές των ειδών συρρικνώθηκαν προς τα νότια τμήματα της Ευρώπης και συγκεκριμένα στην Ιβηρική, Ιταλική και Βαλκανική χερσόνησο, οι οποίες θεωρούνται για αυτόν τον λόγο παγετωνικά «καταφύγια» ζωής. Από εκεί, κάποια είδη μπόρεσαν και άρχισαν πάλι την εξάπλωσή τους προς τα βόρεια, μετά το πέρας της τελευταίας παγετώδους περιόδου, στα σημερινά τους (μεσο-παγετώδη) εύρη κατανομών (Hewitt,

2000). Για τα είδη της Ιταλικής χερσονήσου αυτό ήταν σχεδόν ανέφικτο διότι οι Άλπεις αποτελούν ισχυρό βιογεωγραφικό φράγμα. Αντίθετα, στη Βαλκανική χερσόνησο υπάρχουν πολλά παραδείγματα επανεπέκτασης των κατανομών στα βόρεια, λόγω του ότι είναι «ανοικτή» προς την κεντρική Ευρώπη (Hewitt, 2011).

Για τα περισσότερα ευρωπαϊκά είδη οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του τελευταίου παγετωνικού μεγίστου ήταν ακατάλληλες για επιβίωση και μετατοπίστηκαν στα παγετωνικά «καταφύγια» της νότιας Ευρώπης, ωστόσο η συγκεκριμένη τοποθεσία των «καταφυγίων» εξαρτάται από τα διαθέσιμα προσαρμοστικά χαρακτηριστικά κάθε είδους, την οικοθέση του και την κατανομή του ενδιατημάτος του. Έτσι, είδη μη καλά προσαρμοζόμενα σε ψυχρές συνθήκες μετατοπίστηκαν πιο νότια, ενώ αντίθετα είδη ανθεκτικά στο ψύχος επιβίωσαν πλησίον των πάγων (Hewitt, 2011). Δεδομένων των επαναλαμβανόμενων κλιματικών ταλαντώσεων χιλιετίας κατά τη διάρκεια του τελευταίου παγετωνικού μεγίστου, τα είδη των καταφυγίων έχουν περάσει από πολλές δημογραφικές αλλαγές, επηρεάζοντας έτσι τη γενετική τους δομή και ποικιλότητα.

Τα πρότυπα επανεποίκισης του βορρά από τα καταφύγια της νότιας Ευρώπης ποικίλλουν μεταξύ των ειδών που είχαν τη δυνατότητα να εξαπλωθούν βόρεια μετά το τέλος της τελευταίας παγετώδους περιόδου. Ενδιαφέρον αποτελεί η περίπτωση στην οποία διαφορετικές εξελικτικές γραμμές του ίδιου είδους προερχόμενες από διαφορετικά «καταφύγια» συναντιούνται βόρεια και συχνά δημιουργούν ζώνες υβριδισμού, και οι περιπτώσεις όπου περιοχές έχουν βιοκοινότητες μικτής προέλευσης, όπως για παράδειγμα η Σκανδιναβία, η οποία έχει βαλκανικές ακρίδες, σκαντζόχοιρους και βελανιδιές από την ιταλική χερσόνησο, αρκούδες από την Ιβηρική χερσόνησο αλλά και από τον Καύκασο και κυπρίνους από τη Μαύρη Θάλασσα μέσω των ποταμών της Ρωσίας (Hewitt, 2011). Τα παραπάνω δίνουν έμφαση στη σημαντικότητα των παγετωνικών «καταφυγίων» ως «δεξαμενές» διατήρησης της βιοποικιλότητας.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν οι περιπτώσεις εξελικτικών γραμμών που περιορίστηκαν σε διαφορετικά «καταφύγια» και των οποίων οι εξελικτική τους απόκλιση ποικίλλει. Για παράδειγμα, οι βαλκανικοί σκαντζόχοιροι (*Erinaceus concolor*) έχουν

διαχωριστεί πριν από 4 εκατομμύρια χρόνια περίπου από αυτούς της Ιταλίας και της Ιβηρικής χερσονήσου (*E. europaeus*), ενώ οι εξελικτικές γραμμές των δύο τελευταίων περιοχών διαχωρίστηκαν πριν από 2 εκατομμύρια χρόνια (Seddon et al., 2001). Αντίστοιχες περιπτώσεις μεγάλης απόκλισης σε ερπετά και αμφίβια αποτελούν τα γένη *Bombina* (Hofman et al., 2007), *Triturus* (Babik et al., 2005) και *Natrix* (Joger et al., 2007). Η μεγάλη απόκλιση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα είδη μπόρεσαν και επιβίωσαν στα διαφορετικά «καταφύγια» για αρκετές παγετώδεις/μεσοπαγετώδεις περιόδους και απέκλιναν γενετικά.

Αντίστοιχο και ίσως μεγαλύτερο ενδιαφέρον προσελκύουν οι περιπτώσεις ειδών που διαφοροποιήθηκαν στην ίδια χερσόνησο – «καταφύγιο», επιβιώνοντας σε πολλαπλά τοπικά «καταφύγια», η λεγόμενη υπόθεση «καταφύγια» εντός «καταφυγίων» ή «refugia within refugia» (Gomez and Lunt, 2007). Η υπόθεση αυτή αναπτύχθηκε αρχικά για την περίπτωση της Ιβηρικής χερσονήσου, όπου ένα πλήθος ειδών ακολουθεί αυτό το πρότυπο, με ήδη οριοθετημένες επτά κύριες περιοχές ως τοπικά «καταφύγια». Ωστόσο αργότερα περιεγράφηκαν αντίστοιχες περιπτώσεις ειδών και από τις άλλες δύο χερσονήσους της νότιας Ευρώπης. Η σημαντικότητα αυτού του βιογεωγραφικού προτύπου όσον αφορά τη βιοποικιλότητα είναι διττή: από τη μία αυξάνει τα ποσοστά ενδημισμού, όπως αναμένεται από μια απομονωμένη περιοχή σταθερού κλίματος (Abellán and Svenning, 2014), και από την άλλη αυξάνει την παραπατρική ειδογένεση σε πιθανές ζώνες υβριδισμού ανάμεσα σε τοπικά «καταφύγια» κατά τις μεσο-παγετώδεις περιόδους (Hewitt, 2011).

Όσον αφορά τη βαλκανική χερσόνησο, μπορεί να είναι λιγότερη μελετημένη σε σχέση με τις άλλες δύο, ωστόσο είναι πλουσιότερη σε αριθμό ειδών και ποσοστό παλαιοενδημισμού. Έχουν βρεθεί πολλές καθαρές περιπτώσεις ειδών όπου φαίνεται φυλογενετικά η ύπαρξη τοπικών «καταφυγίων», όπως τα έντομα *Chorthippus parallelus*, *Melanargia galathea*, *Parnassius mnemosyne* και *Drusus croaticus*, το χερσαίο σαλιγκάρι *Arion fuscus*, τα αμφίβια *Mesotriton alpinus* και *Bombina variegata*, τα ερπετά *Testudo hermanni*, *Emys orbicularis*, *Lacerta viridis* και *Vipera ammodytes* και τα θηλαστικά *Erinaceus*

*concolor*, *Apodemus flavicollis*, *Dinaromys bogdanovi* και *Lepus europaeus* (Hewitt, 2011 και αναφορές εκεί).

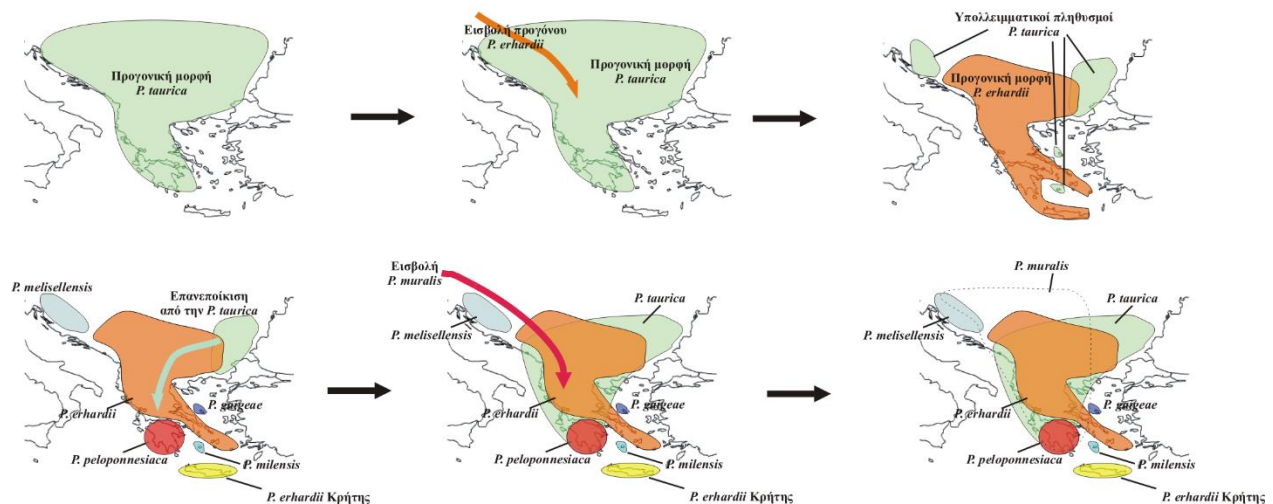
### 2.3. Φυλογεωγραφικό σενάριο της εξελικτικής ιστορίας των βαλκανικών *Podarcis*

Η φυλογεωγραφία των βαλκανικών *Podarcis* εξετάστηκε για πρώτη φορά σε μια σειρά μελετών (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005c; Poulakakis et al., 2005d), στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα αλληλουχιών δύο mtDNA γονιδίων και δείγματα κυρίως από τον ελληνικό χώρο. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τις φυλογενετικές και τις χρονοφυλογενετικές αναλύσεις με δεδομένα παλαιογεωγραφίας δημιούργησαν ένα φυλογεωγραφικό σενάριο (Εικ. 6.8.) που δείχνει πώς έγινε η εποίκηση της βαλκανικής χερσονήσου από το γένος *Podarcis*.

Σύμφωνα με το τελικό συμπέρασμα των παραπάνω μελετών, το παραπάνω σενάριο αποτελείται από μια ακολουθία γεγονότων. Αρχικά ο πρόγονος της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» εποικίζει πριν από 10,8 εκατομμύρια χρόνια την τότε Βαλκανική χερσόνησο και κατανέμεται σε όλη την έκτασή της. Στη συνέχεια ένα ιστορικό γεγονός, που μπορεί να ήταν η άφιξη του προγόνου της υποομάδας ειδών *P. erhardii* πριν από 9 περίπου εκατομμύρια χρόνια, οδήγησε στον περιορισμό της κατανομής της προγονικής μορφής της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» σε λίγους και πιθανώς μικρούς πληθυσμούς. Ένας από αυτούς τους πληθυσμούς πιθανά εντοπιζόνταν κοντά στις Δαλματικές ακτές και έδωσε γένεση στη μορφή που σήμερα αναγνωρίζεται ως *P. melisellensis*. Δύο διαφορετικοί πληθυσμοί, ο ένας νοτιοανατολικά και ο δεύτερος κεντροανατολικά του τότε ελληνικού χώρου, που θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι αντιστοιχούν στις σημερινές περιοχές των νησιωτικών συγκροτημάτων της Μήλου και της Σκύρου, αντίστοιχα, διαφοροποιήθηκαν στα είδη που αναγνωρίζουμε σήμερα ως *P. milensis* και *P. gaiageae*. Όσον αφορά τη δημιουργία του είδους *P. tauricus* sensu stricto έγινε υπόθεση δύο υπο-σεναρίων που διέφεραν ως προς το εάν το taxon αυτό αντιστοιχεί σε ένα ή δύο διακριτά είδη. Επειδή τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών δεν δικαιολογούσαν ξεκάθαρα την παρουσία δύο διαφορετικών ειδών, έκριναν ως πιο πιθανό το πιο φειδωλό σενάριο, το οποίο υποστηρίζει την επιβίωση ενός μόνο πληθυσμού στον χώρο της

βορειοανατολικής Ελλάδας ή αντίστοιχης περιοχής στον χώρο των ανατολικών Βαλκανίων. Όταν οι συνθήκες από την άφιξη του προγόνου της υποομάδας ειδών *P. erhardii* έγιναν κατάλληλες, το είδος *P. tauricus* επανεποίκισε την περιοχή του ελληνικού χώρου και διαφοροποιήθηκε περαιτέρω στους σημερινούς πληθυσμούς του.

Όσον αφορά την υποομάδα ειδών *P. erhardii*, η σύγχρονη κατανομή της, όντας σπάνια στα παράλια της Αδριατικής και της Δυτικής Ελλάδας, μαρτυρά ότι η προγονική της μορφή έφτασε στον ελληνικό χώρο από τα βορειοδυτικά, ακολουθώντας ένα μονοπάτι ανατολικά των Διναριδών και των Ελληνίδων. Το γεγονός αυτό έλαβε χώρα μετά το σχηματισμό της αύλακας του Αιγαίου, όπως φαίνεται από την απουσία της υποομάδας από περιοχές ανατολικά του φράγματος. Η διαφοροποίηση της υποομάδας στα σημερινά αναγνωρισμένα είδη *P. erhardii*, *P. peloponnesiacus*, *P. cretensis* και *P. levendis* οφείλεται σε επακόλουθες γεωλογικές και τεκτονικές μεταβολές που σχετίζονται με την απομόνωση της Πελοποννήσου από την ηπειρωτική Ελλάδα και της Κρήτης και των νησίδων Πορί και Λαγουβάρδος (Λαγκούβαρδος/Λαγούβαρδος/Πορέτι) από την Πελοπόννησο.



Εικόνα 6.8. Υποθετικό βιογεωγραφικό σενάριο για την προέλευση των *Podarcis* στο χώρο της Βαλκανικής χερσονήσου από τους Roulakakis et al. (2005d). Να σημειωθεί ότι το taxon «*P. erhardii* Κρήτης» αντιστοιχεί στο πλέον αναγνωρισμένο *P. cretensis* και ότι το *P. levendis* δεν είχε αναγνωριστεί ακόμα ως ξεχωριστό είδος.



## 2.4. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου

Στο παρόν κεφάλαιο γίνεται μια προσπάθεια διερεύνησης της φυλογεωγραφικής ιστορίας της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», χρησιμοποιώντας γενετικά δεδομένα και εφαρμόζοντας μια σειρά από βιογεωγραφικές, χρονοφυλογενετικές, δημογραφικές και φυλογενετικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των προηγούμενων κεφαλαίων και την υπάρχουσα γνώση σχετικά με την παλαιογεωγραφία και την παλαιοκλιματολογία των Βαλκανίων μπορούν να οδηγήσουν στην απόκτηση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας της εξελικτικής ιστορίας των ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*». Συνεπώς, κεντρικός στόχος του κεφαλαίου είναι η περιγραφή ενός φυλογεωγραφικού σεναρίου που να συμφωνεί με όλα τα υπάρχοντα δεδομένα.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Εκτίμηση χρόνων απόκλισης

Για την εκτίμηση των χρόνων απόκλισης μεταξύ των κύριων φυλογενετικών κλάδων και υποκλάδων της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» χρησιμοποιήθηκε το Σύνολο Δειγμάτων VI (72 δείγματα, Παράρτημα II). Το σύνολο αυτό περιέχει δεδομένα από πέντε γενετικούς τόπους με αντιπροσώπους όλων των κλάδων/υποκλάδων που αναγνωρίστηκαν στο Δεύτερο Κεφάλαιο καθώς και επιπλέον αλληλουχίες άλλων τάξων που χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία βαθμονόμησης του δέντρου της χρονοφυλογενετικής ανάλυσης. Η ανάλυση\* πραγματοποιήθηκαν στο Bayesian τύπου λογισμικό πακέτο BEAST (v.1.8.1; Drummond et al., 2012) με τους πέντε γενετικούς τόπους του Συνόλου Δειγμάτων VI να διαχωρίζονται πλήρως όσον αφορά την εφαρμογή των μοντέλων και την παραμετροποίηση, αλλά να γίνεται προβολή ενός ενιαίου τελικού φυλογενετικού δέντρου. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη εκτίμηση των χρόνων απόκλισης, της τοπολογίας και των ρυθμών μοριακής εξέλιξης για όλους τους γενετικούς τόπους. Το αρχείο εισαγωγής του BEAST (xml input files) διαμορφώθηκε με την εφαρμογή BEAUti v. 1.8.1, η οποία εμπεριέχεται στο παραπάνω λογισμικό πακέτο. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν έξι «εξωτερικά» σημεία βαθμονόμησης για την ανάλυση του Συνόλου Δειγμάτων VI: (α) η εποίκηση του νησιού El Hierro (Κανάριοι Νήσοι) (Guillou et al., 1996) πριν από 1,12 εκατομμύρια χρόνια από το ενδημικό υποείδος *Gallotia caesaris caesaris* προερχόμενο από το γειτονικό νησί La Gomera (Cox et al., 2010), (β) η απόσχιση του είδους *Podarcis peloponnesiacus* από τα είδη *P. cretensis* και *P. levendis* στα 5-5,5 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα (Poulakakis et al., 2005c), το οποίο αντιστοιχεί στον διαχωρισμό της Κρήτης και των νησίδων Πορί και Λαγούβαρδος από την Πελοπόννησο (Meulenkamp, 1985; Schule, 1993), (γ) η απόσχιση του είδους *P. lilfordi* από το είδος *P. pityusensis* στα ~5 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα (Brown et al., 2008),

---

\* Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στη συστοιχία υπολογιστών (160 cores) που διαθέτει το εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης.

όταν και συνέβη ο διαχωρισμός των νησιωτικών συγκροτημάτων στα οποία αυτά ενδημούν (Terrasa et al., 2004), (δ) ο διαχωρισμός μεταξύ των γενών *Lacerta* και *Timon*, όπως μαρτυρούν απολιθώματα (Čerňanský, 2010) στο Κατώτερο Μειόκαινο (Ottungian - Μέσο Βουρδιγάλιο - 18,1-17,2 εκατομμύρια χρόνια πριν), (ε) ο διαχωρισμός των ευρωπαϊκών αντιπροσώπων του γένους *Timon* από τους αντίστοιχους βορειοαφρικάνικους στα 5,3 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα (Estes, 1983), και (στ) η διαφοροποίηση της ομάδας ειδών *L. viridis* στα είδη της στο Ανώτερο Μειόκαινο (Turolian - 9,0-5.3 εκατομμύρια χρόνια πριν), βάσει απολιθωμάτων (Venczel, 2006). Ο τύπος κατανομής των εκ των προτέρων πιθανοτήτων ορίστηκε η κανονική για κάθε σημείο βαθμονόμησης, λαμβάνοντας τις ακόλουθες τιμές (μέση τιμή - τυπική απόκλιση): (α) 0,55 - 0,30, (β) 5,30 - 0,10, (γ) 5,25 - 0,03, (δ) 17,50 - 0,30 (ε) 5,30 - 0,70 και (στ) 8,70 - 0,50. Όσον αφορά τις άλλες *a priori* πληροφορίες για τα μοντέλα ορίστηκε το Yule model για τη διαδικασία ειδογένεσης και το «χαλαρό» μοριακό «ρολόι» βάσει του μοντέλου «uncorrelated lognormal model». Σύμφωνα με το jModelTest ως μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω: *16S rRNA*- GTR+G; *cyt b* - GTR+G; *MC1R* - HKY+I; *Pod55* - HKY+I; και *Pod15b* - GTR+G. Η ανάλυση MCMC «έτρεξε» για  $10^8$  «γενιές» με αποθήκευση αποτελέσματος ανά 5.000 «γενιές». Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο λογισμικό Tracer (v.1.6, Rambaut et al., 2014) για να ελεγχθεί η σύγκλιση των αναλύσεων και τα αποτελεσματικά μεγέθη δειγμάτων (effective sample sizes, ESSs) για όλες τις παραμέτρους (αποδεκτές τιμές >200). Η τιμή  $-lnL$  σταθεροποιήθηκε πριν από τις  $10^8$  «γενιές» και οι πρώτες 10% από τις 20.000 αποθηκευμένες αφαιρέθηκαν όπως προτάθηκε από το λογισμικό Tracer. Το τελικό δέντρο με τους εκτιμώμενους χρόνους απόκλισης υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος TreeAnnotator v.1.8.1 (μέρος του πακέτου BEAST) και το δέντρο οπτικοποιήθηκε στο πρόγραμμα FigTree v.1.4.2 (πακέτο BEAST).

### 3.2. Κατασκευή δικτύων μιτοχονδριακών απλοτύπων

Δίκτυα μιτοχονδριακών απλοτύπων για κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο και υποκλάδο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», όπως αυτοί εκτιμήθηκαν στο Δεύτερο Κεφάλαιο, κατασκευάστηκαν βάσει του κριτηρίου της Φειδωλότητας (με όριο 95%) στο λογισμικό TCS (v. 1.8.0\_11, Clement et al., 2000). Αφαιρέθηκαν δείγματα για τα οποία έλειπε η αλληλουχία ενός από τα δύο μιτοχονδριακά γονίδια, ενώ αφαιρέθηκαν και οι νουκλεοτιδικές θέσεις με μεγάλο ποσοστό έλλειψης δεδομένων, για την αποφυγή λανθασμένων εκτιμήσεων (Joly et al., 2007). Για το είδος *P. melisellensis* δεν πραγματοποιήθηκε αυτή η ανάλυση καθώς η πλειονότητα των δειγμάτων προέρχεται από ήδη δημοσιευμένες εργασίες (Podnar et al., 2004; Podnar et al., 2014), στις οποίες έχει κατασκευαστεί δίκτυο mtDNA απλοτύπων. Αυτής της μορφής οι αναλύσεις μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τις σχέσεις των δειγμάτων σε περιπτώσεις που το φυλογενετικό δέντρο αδυνατεί να δώσει ξεκάθαρη λύση, όπως στις περιπτώσεις πολυτομίας ανάμεσα σε πολύ συγγενικά δείγματα, π.χ. εντός ενός πληθυσμού. Επίσης μπορούν να εμφανίσουν ενδείξεις δημογραφικών γεγονότων, όπως για παράδειγμα πρόσφατης απότομης εξάπλωσης, ή ακόμα και ενδείξεις ύπαρξης τοπικού παγετωνικού καταφυγίου (Podnar et al., 2004; Podnar et al., 2014).

### 3.3. Εκτίμηση γενετικής ποικιλότητας και αναλύσεις ιστορικής δημογραφίας

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα των δύο mtDNA γενετικών τόπων και φτιάχνοντας υποσύνολα του Συνόλου Δειγμάτων I (Παράρτημα II) που να αντιστοιχούν σε κάθε μία από τις παραπάνω ομάδες έγινε εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας για κάθε έναν από τους κύριους φυλογενετικούς κλάδους και υποκλάδους της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» και επιπλέον πραγματοποιήθηκε μια σειρά ιστορικών δημογραφικών αναλύσεων.

Η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας, μέσω της εκτίμησης διαφόρων δεικτών όπως οι αριθμός απλοτύπων ( $h$ ), ποικιλότητα απλοτύπων ( $h_d$ ), αριθμός ποικιλόμορφων νουκλεοτιδικών θέσεων ( $S$ ), νουκλεοτιδική ποικιλότητα ( $\pi$ ) και Watterson's theta ( $\theta_w$ ), έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα DNAsp (v.5.10.0.1, Librado and Rozas, 2009).

Για τον εντοπισμό των μηχανισμών εκείνων που είναι υπεύθυνοι για τα παρατηρούμενα πρότυπα ποικιλότητας mtDNA σε ποικίλες χωρικές και χρονικές κλίμακες, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι ανάλυσης δεδομένων. Εξαιτίας των περιορισμών και των αδυναμιών κάθε μεθόδου, ο συνδυασμός όλων των αποτελεσμάτων θεωρείται η καταλληλότερη προσέγγιση για την εκτίμηση της δημογραφικής ιστορίας και των αντίστοιχων γεγονότων. Οι παρακάτω μέθοδοι, αν και αρχικά σχεδιάστηκαν για τον εντοπισμό ενδείξεων φυσικής επιλογής, άρχισαν να χρησιμοποιούνται και για τον εντοπισμό γεγονότων αύξησης ή μείωσης του πληθυσμού στον χώρο ή στο μέγεθός του.

Για κάθε μία από τις προαναφερόμενες ομάδες εξετάστηκε η παρατηρούμενη κατανομή του αριθμού των διαφορών ανά νουκλεοτιδική θέση μεταξύ ζευγών αλληλουχιών (mismatch distribution) χρησιμοποιώντας το λογισμικό DNAsp. Οι παρατηρούμενες τιμές υπολογίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάγραμμα έναντι των αναμενόμενων τιμών ενός μοντέλου σταθερού πληθυσμιακού μεγέθους. Θεωρητικές μελέτες έδειξαν ότι συνήθως κατανομές με μία κορυφή (unimodal distributions) υποδεικνύουν απότομη δημογραφική αύξηση του πληθυσμού στο πρόσφατο παρελθόν, ενώ κατανομές με πολλές κορυφές (multimodal distributions) υποδεικνύουν δημογραφική ισορροπία (Rogers and Harpending, 1992). Ο δείκτης τραχύτητας του Harpending (1994, Harpending's raggedness index,  $r$ ), όπως εμπεριέχεται στο πρόγραμμα DNAsp, χρησιμοποιήθηκε για να γίνει αξιολόγηση του μοντέλου απότομης αύξησης/επέκτασης του Rogers (1995, Rogers' sudden expansion model), το οποίο εναρμονίζεται με την κατανομή mismatch που αποτελείται από μία κορυφή (Rogers and Harpending, 1992). Η στατιστική υποστήριξη των τιμών των παραπάνω παραμέτρων εκτιμήθηκε μέσω 1.000 προσομοιώσεων coalescence και η στατιστικά σημαντική τιμή τους

θεωρήθηκε ένδειξη απόκλισης από το εκτιμώμενο μοντέλο απότομης αύξησης/επέκτασης.

Για την περαιτέρω εξέταση της απότομης αύξησης/επέκτασης πραγματοποιήθηκαν τρεις ακόμα στατιστικές μετρήσεις. Η παράμετρος  $D$  του Tajima (1989, Tajima's  $D$ ) που είναι μια από τις πιο κλασικές μετρήσεις για ένδειξη δημογραφικής ανισορροπίας, αλλά όχι απαραίτητα ένδειξη απότομης αύξησης, και η οποία εκτιμήθηκε μέσω του λογισμικού ARLEQUIN (v.3.5.2.1, Excoffier and Lischer, 2010). Οι πλέον κατάλληλες εκτιμήσεις για την ανίχνευση δημογραφικών προτύπων απότομης αύξησης/επέκτασης (Ramírez-Soriano et al., 2008), που είναι ο έλεγχος  $F_s$  του Fu (1997, Fu's  $F_s$  test) για μεγάλο αριθμό δειγμάτων και ο έλεγχος  $R_2$  των Ramos-Onsins and Rozas (2002, Ramos-Onsins & Rozas'  $R_2$  test) για μικρό αριθμό δειγμάτων, εκτιμήθηκαν κάνοντας χρήση του λογισμικού ARLEQUIN (10.000 bootstrap ψευδο-επαναλήψεις) και του λογισμικού DNAsp (1.000 προσομοιώσεις coalescence), αντίστοιχα. Ενδείξεις γεγονότος απότομης αύξησης/επέκτασης αποτελούν οι στατιστικά σημαντικές αρνητικές τιμές των παραπάνω τιμών. Αντίθετα, οι στατιστικά σημαντικές θετικές τιμές υποδεικνύουν φαινόμενο στενωπού (bottleneck).

Αλλαγές με την πάροδο του χρόνου στις μη παραμετρικές εκτιμήσεις του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους ( $N_e$ ) κάθε μιας από τις εξεταζόμενες ομάδες αξιολογήθηκαν με χρήση της μεθόδου «Bayesian Skyline Plots, BSPs» (Drummond et al., 2005), το οποίο είναι ενσωματωμένο στο λογισμικό πακέτο BEAST 2. Αυτή η μέθοδος υπολογίζει την τιμή  $N_e$  απευθείας από τις αλληλουχίες και δεν απαιτεί συγκεκριμένο *a priori* υποθετικό δημογραφικό μοντέλο. Βάσει αυτού μπορεί να παραχθεί ένα βασικό πρότυπο πληθυσμιακής δημογραφικής διακύμανσης. Τα αρχεία εισαγωγής BEAST (xml input files) διαμορφώθηκαν με την εφαρμογή BEAUti. Τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης δεν δόθηκαν *a priori*, αλλά έγινε επιλογή του «BEAST Model Test» για την εκτίμησή τους βάσει των εμπειρικών δεδομένων. Όσον αφορά άλλα *a priori* στοιχεία για τη διαδικασία ειδογένεσης ορίστηκε η κατηγορία «Coalescent Bayesian Skyline», ενώ έγινε επιλογή του «αυστηρού» μοριακού «ρολογιού». Ο ρυθμός εξέλιξης των δύο mtDNA

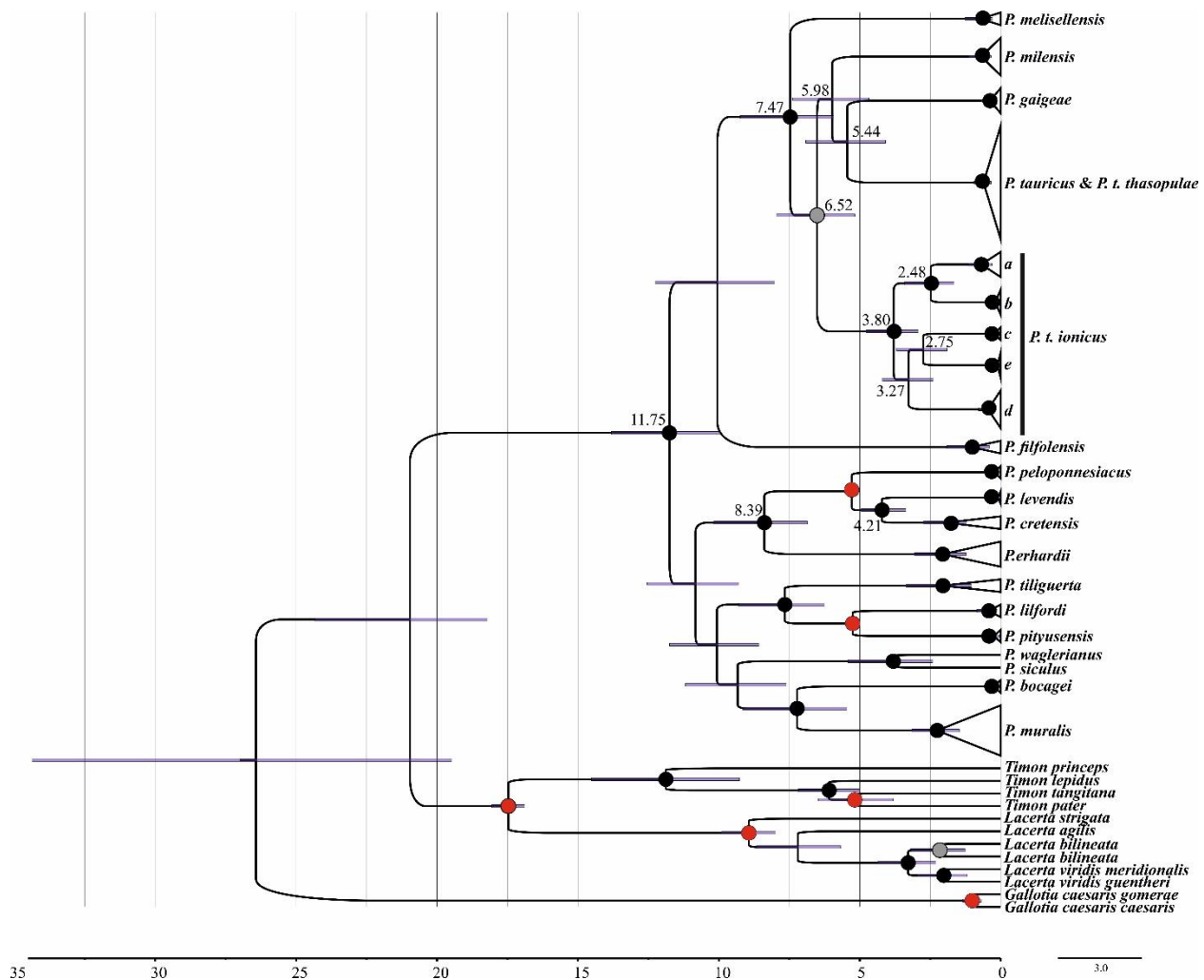
γονιδίων για κάθε μια από τις περιπτώσεις υπολογίστηκε με βάση τη γενετική απόσταση και την ηλικία διαφοροποίησης της κάθε ομάδας από την πιο συγγενική εξελικτική γραμμή ή γραμμές, όπως εκτιμήθηκε από τη χρονοφυλογενετική ανάλυση. Σε περιπτώσεις πολυτομίας χρησιμοποιήθηκαν μέσοι όροι αποστάσεων και ηλικίας. Η ανάλυση MCMC «έτρεξε» για  $5 \times 10^7$  «γενιές» με αποθήκευση αποτελέσματος ανά 1.000 «γενιές». Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο λογισμικό Tracer (μέρος του πακέτου BEAST) για να ελεγχθεί η σύγκλιση των αναλύσεων και τα αποτελεσματικά μεγέθη δειγμάτων (effective sample sizes, ESSs) για όλες τις παραμέτρους (αποδεκτές τιμές >200). Το πρώτο 10% από τις 20.000 αποθηκευμένες αφαιρέθηκε όπως προτάθηκε από το λογισμικό. Στο ίδιο λογισμικό επιλέχθηκε η επιλογή για κατασκευή των τελικών διαγραμμάτων.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Χρόνοι απόκλισης

Στις αναλύσεις εκτίμησης των χρόνων απόκλισης παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές ESS (> 250) για όλες τις παραμέτρους, ενώ η σύγκλιση συνέβη πριν από τις  $10^8$  «γενιές» ( $\ln L = -9.732,46$ ). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρώτης ανάλυσης (Εικ. 6.9) το γένος *Podarcis* άρχισε τη διαφοροποίησή του στα 11,75 εκατομμύρια χρόνια πριν, ενώ οι υποομάδες ειδών «*P. erhardii*» και «*P. tauricus*» διαφοροποιήθηκαν πριν από 8,39 και 7,47 εκατομμύρια χρόνια, αντίστοιχα. Εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», το είδος *P. melisellensis* διαχωρίστηκε πρώτο στα 7,47 εκατομμύρια χρόνια πριν, ενώ στα 6,52 άρχισε η διαφοροποίηση των υπολοίπων taxa. Το taxon *P. t. ionicus* άρχισε να διαφοροποιείται στους υποκλάδους του πριν από 3,80 εκατομμύρια χρόνια, ενώ ο διαχωρισμός μεταξύ των υποκλάδων *a* και *b* έγινε στα 2,48 εκατομμύρια χρόνια πριν. Τέλος, η διαφοροποίηση όλων των εξεταζόμενων taxa στους πληθυσμούς τους συνέβη προς το τέλος του Πλειστοκαίνου και εντός του Ολοκαίνου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της αποτυχίας πολλαπλασιασμού των τριών πυρηνικών γονιδίων για το δείγμα από την Καλαμάτα (947), το οποίο αποτελεί διακριτή εξελικτική γραμμή εντός του υποκλάδου *e*, η διαφοροποίηση αυτού του υποκλάδου αναμένεται να έχει αρχίσει νωρίτερα. Αντίστοιχη περίπτωση αποτελεί το είδος *P. melisellensis* για το οποίο έχουν χρησιμοποιηθεί αντιπρόσωποι μόνο για έναν («*fiutana*») από τους τρεις κύριους φυλογενετικούς υποκλάδους του είδους (δεν υπήρχαν nDNA αλληλουχίες στη βάση GenBank) και επομένως ενδέχεται ο χρόνος διαφοροποίησης του είδους στο σύνολό του να διαφέρει. Επαναλαμβάνοντας την ανάλυση χρησιμοποιώντας το παραπάνω σύνολο δειγμάτων, αλλά μόνο για τους δύο mtDNA γενετικούς τύπους και προσθέτοντας το δείγμα από την Καλαμάτα και δύο δείγματα - αντιπρόσωπους για τους φυλογενετικούς υποκλάδους «*lastovo*» και «*melisellensis*» του είδους *P. melisellensis*, φάνηκε ότι ο υποκλάδος *e* του taxon *P. t. ionicus* διαφοροποιήθηκε πριν από ~1,13 εκατομμύρια χρόνια, ενώ το είδος *P. melisellensis* πριν από 3,40 εκατομμύρια χρόνια (Συμπλ. Εικόνα Σ8, Παράρτημα III).



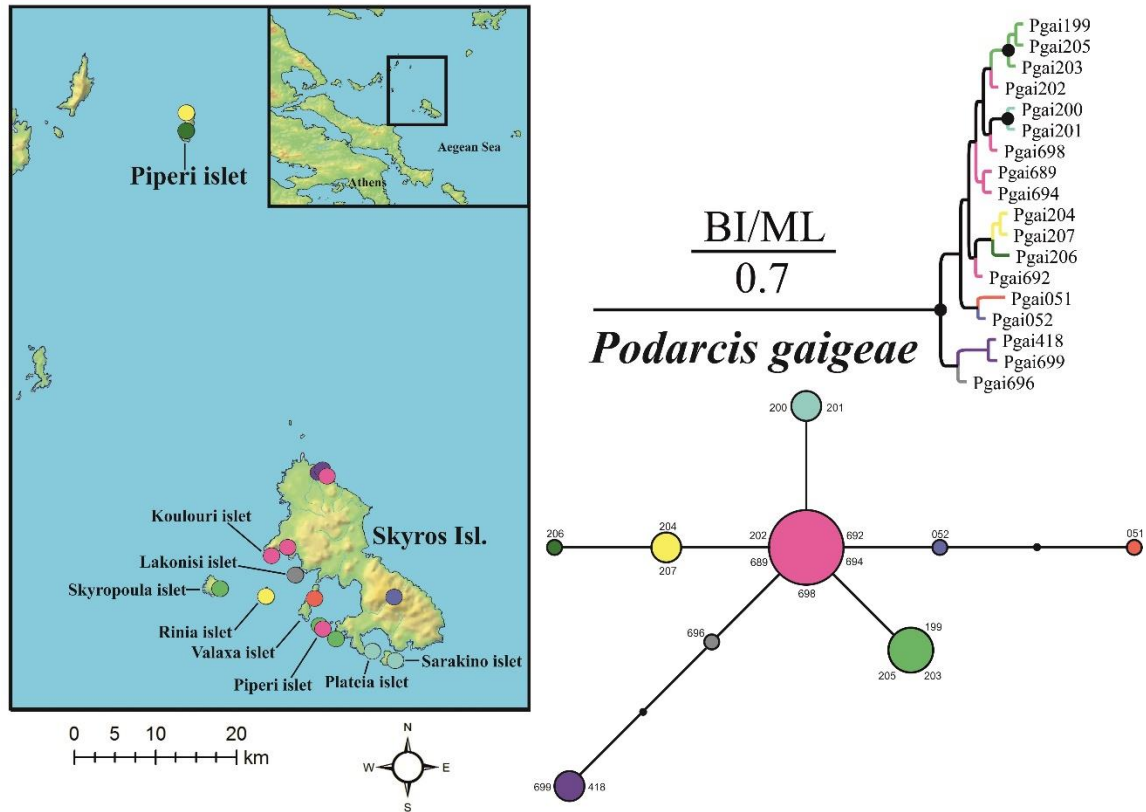


Εικόνα 6.9. Το παραγόμενο βαθμονομημένο Bayesian δέντρο της χρονοφυλογενετικής ανάλυσης βάσει του Συνόλου Δειγμάτων VI. Οι χρωματισμένοι με μαύρο και γκριζο χρώμα κόμβοι υποδηλώνουν απόλυτη (εκ των υστέρων πιθανότητα = 1,00) και πολύ καλή ( $0,95 < \text{εκ των υστέρων πιθανότητα} < 1,00$ ) στατιστική υποστήριξη, ενώ η έλλειψη κύκλου υποδηλώνει χαμηλή στατιστική υποστήριξη. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι κόμβοι που χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία βαθμονόμησης. Οι αριθμοί στους κλάδους αποτελούν τους χρόνους απόκλισης σε εκατομμύρια χρόνια μερικών επιλεγμένων φυλογενετικών κλάδων, ενώ οι οριζόντιες μπάρες δείχνουν την αβεβαιότητα (95% HPD) της εκτίμησης των χρόνων. Η μπάρα στο κάτω μέρος είναι βαθμονομημένη επίσης σε εκατομμύρια χρόνια.

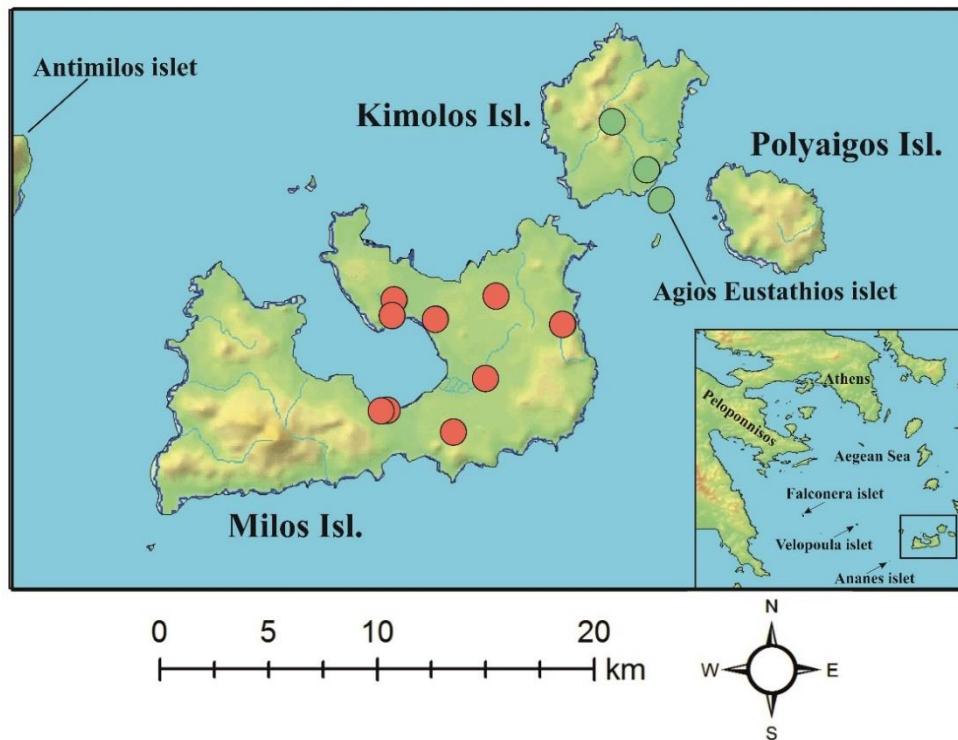
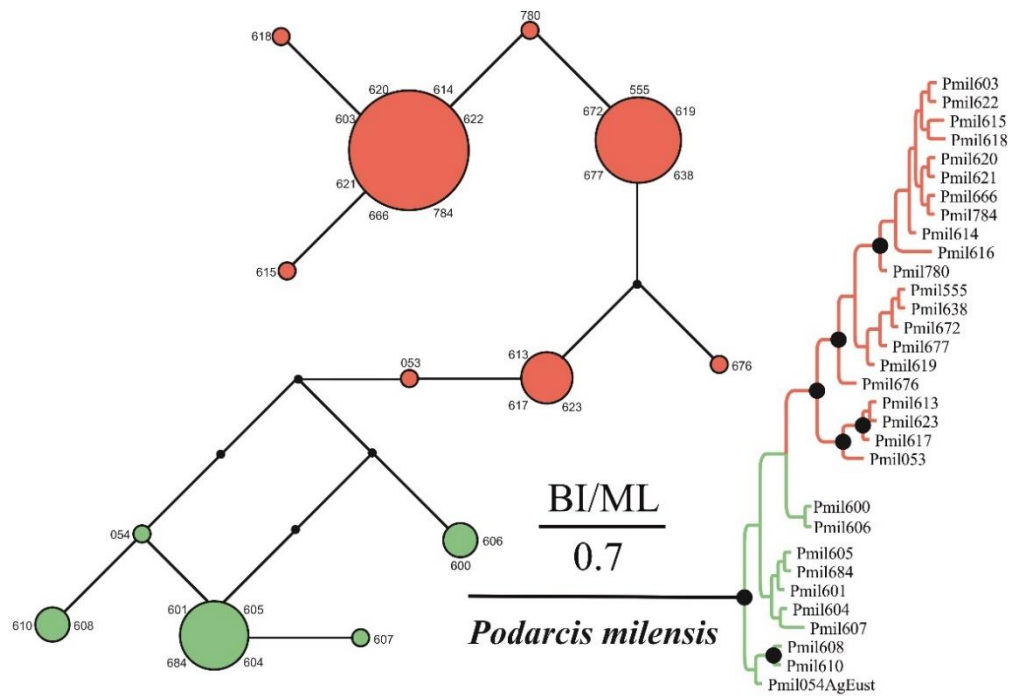
## 4.2. Δίκτυα μιτοχονδριακών απλοτύπων

Στις Εικόνες 6.10 έως 6.15 εμφανίζονται τα δίκτυα μιτοχονδριακών απλοτύπων για κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο και υποκλάδο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Για το νησιωτικό είδος *P. gaiageae* το πρότυπο που προκύπτει (Εικ. 6.10) είναι η ύπαρξη ενός ή περισσότερων μεγάλης και μεσαίας συχνότητας απλοτύπων που μοιράζονται ανάμεσα στο κεντρικό νησί του συγκροτήματος και τις δορυφόρες νησίδες του και η ύπαρξη μιας πλειάδας μικρής συχνότητας απλοτύπων που αντιστοιχούν κυρίως σε διαφορετικές νησίδες. Το δίκτυο αυτών των απλοτύπων έχει τη μορφή αστεριού, με τους απλοτύπους μικρής συχνότητας να έχουν διαφορά 1-3 νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων από τον πιο συχνό. Η μορφή αυτή ταυτίζεται με τη μορφή «χτένας» του φυλογενετικού δέντρου. Ενδιαφέρον πρότυπο εμφανίζει το είδος *P. milensis* στο οποίο εμφανίζονται δύο ομάδες απλοτύπων, οι οποίες κατανέμονται διακριτά στα δύο μεγάλα νησιά του συγκροτήματος, τη Μήλο και την Κίμωλο (Εικ. 6.11). Οι δύο αυτές ομάδες έχουν τουλάχιστον τρεις νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις διαφορά, ενώ η διάκριση των δειγμάτων των δύο νησιών είναι εμφανής και στο φυλογενετικό δέντρο, όπου οι γενεαλογίες της Μήλου εμφανίζονται ως μονοφυλετική ομάδα. Η ομαδοποίηση των taxa *P. t. tauricus*/*P. t. thasopulae* χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο πολύ συχνών απλοτύπων με μεγάλη γεωγραφική κατανομή, κάποιων λιγότερο συχνών απλοτύπων ευρείας γεωγραφικής κατανομής και αρκετών απλοτύπων χαμηλής συχνότητας από διάφορα σημεία της κατανομής του taxon (Εικ. 6.12). Λόγω της μεγάλης ποικιλότητας απλοτύπων (43 σε αριθμό), έχει δημιουργηθεί ένα αρκετά πολύπλοκο δίκτυο, το οποίο σε κάποιες περιπτώσεις δεν είναι επιλυμένο (λόγω της ίδιας αριθμητικής διαφοράς συγκεκριμένων υποκαταστάσεων μεταξύ πολλαπλών ατόμων). Ως συνέπεια, δεν μπορεί να διακριθεί σαφής γεωγραφική δομή. Υπάρχουν μικρά δίκτυα απλοτύπων που κατανέμονται μόνο στα δυτικά Βαλκάνια ή μόνο στα ανατολικά Βαλκάνια και στην Κριμαία, ενώ επίσης παρατηρούνται παρόμοιοι απλότυποι να κατανέμονται στη νησίδα της Θασοπούλας (ωστόσο υπάρχει και ένας απομακρυσμένος γενετικά). Χαρακτηριστικό

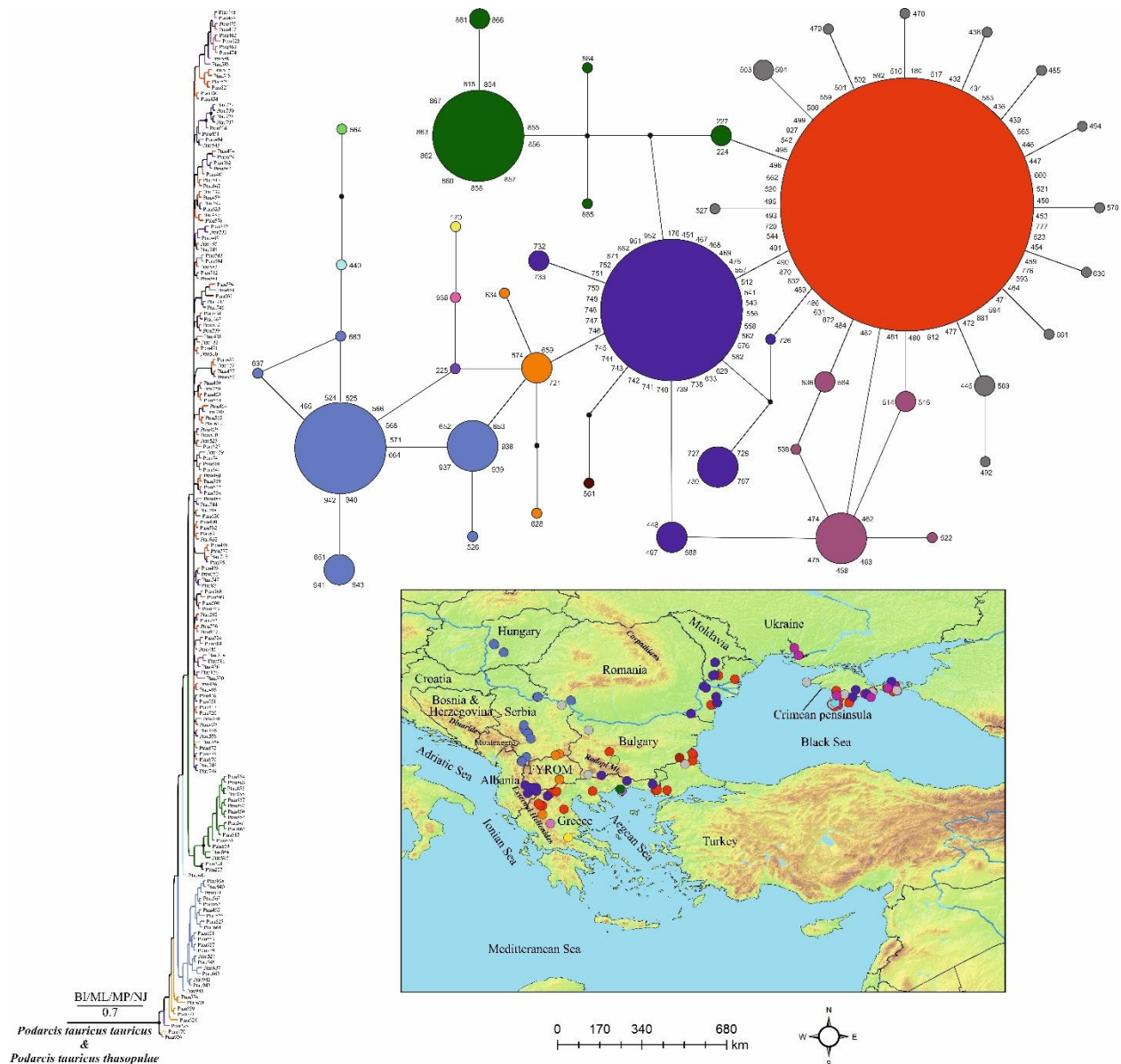
είναι επίσης ο μεγάλος αριθμός (12) μοναδικών, αλλά παρόμοιων, απλοτύπων της χερσονήσου της Κριμαίας. Η μορφή αυτή του δικτύου, η οποία συμφωνεί με τη δομή του φυλογενετικού δέντρου (μορφή «χτένας»), σε έναν τόσο μεγάλο γεωγραφικό χώρο υποδηλώνει πρόσφατη εξάπλωση. Ο φυλογενετικός υποκλάδος a του taxon *P. t. ionicus* παρουσιάζει, επίσης, ενδιαφέρον πρότυπο δικτύου (Εικ. 6.13). Εμφανίζονται δύο ομάδες απλοτύπων με διακριτή γεωγραφική δομή, η μία από την Κεφαλονιά και η άλλη από τη Ζάκυνθο, με τουλάχιστον πέντε νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις διαφορά. Η μορφή αυτή ταυτίζεται με τις φυλογενετικές σχέσεις που απορρέουν από το φυλογενετικό δέντρο και υποδηλώνει σαφή γενετική απομόνωση μεταξύ των νησιών. Ο φυλογενετικός υποκλάδος b του taxon *P. t. ionicus* αποτελείται από λίγα δείγματα μεγάλης γεωγραφικής εγγύτητας, αλλά παρατηρείται ύπαρξη ενός μικρού δικτύου απλοτύπων μικρής συχνότητας (Εικ. 6.13) και όχι ένας ενιαίος απλότυπος, κάτι που παρατηρείται και στο φυλογενετικό δέντρο. Το παραπάνω δηλώνει την ύπαρξη πρόσφατης διαφοροποίησης. Οι φυλογενετικοί υποκλάδοι c και d του taxon *P. t. ionicus* εμφανίζουν παρόμοια δομή δικτύου, με την ύπαρξη ενός απλοτύπου μεγάλης συχνότητας και λίγων απλοτύπων μικρής συχνότητας κατανεμημένων σε μικρή γεωγραφική απόσταση (Εικ. 6.14), κάτι που φαίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο και υποδηλώνει πρόσφατη εξάπλωση. Τέλος, ο φυλογενετικός υποκλάδος e του taxon *P. t. ionicus* μοιάζει με αυτόν του *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae* με πολύπλοκο δίκτυο απλοτύπων μικρής, μεσαίας και μεγάλης συχνότητας που κατανέμονται στη δυτική ηπειρωτική Ελλάδα, στην Αλβανία και στην Πελοπόννησο (Εικ. 6.15), το οποίο αντικατοπτρίζει και τη δομή του φυλογενετικού δέντρου και υποδεικνύει πρόσφατη εξάπλωση στη δυτική Ελλάδα και τη βορειοδυτική Πελοπόννησο. Ενδιαφέρουσα περίπτωση είναι αυτή του απλοτύπου της Καλαμάτας (δείγμα 947), ο οποίος διαφέρει κατά τουλάχιστον 10 νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις από τους υπόλοιπους απλοτύπους και στο δέντρο φαίνεται να αποτελεί διακριτή εξελικτική γραμμή, γεγονός που δείχνει την ύπαρξη γενετικής απομόνωσης του πληθυσμού αυτού από τους υπόλοιπους.



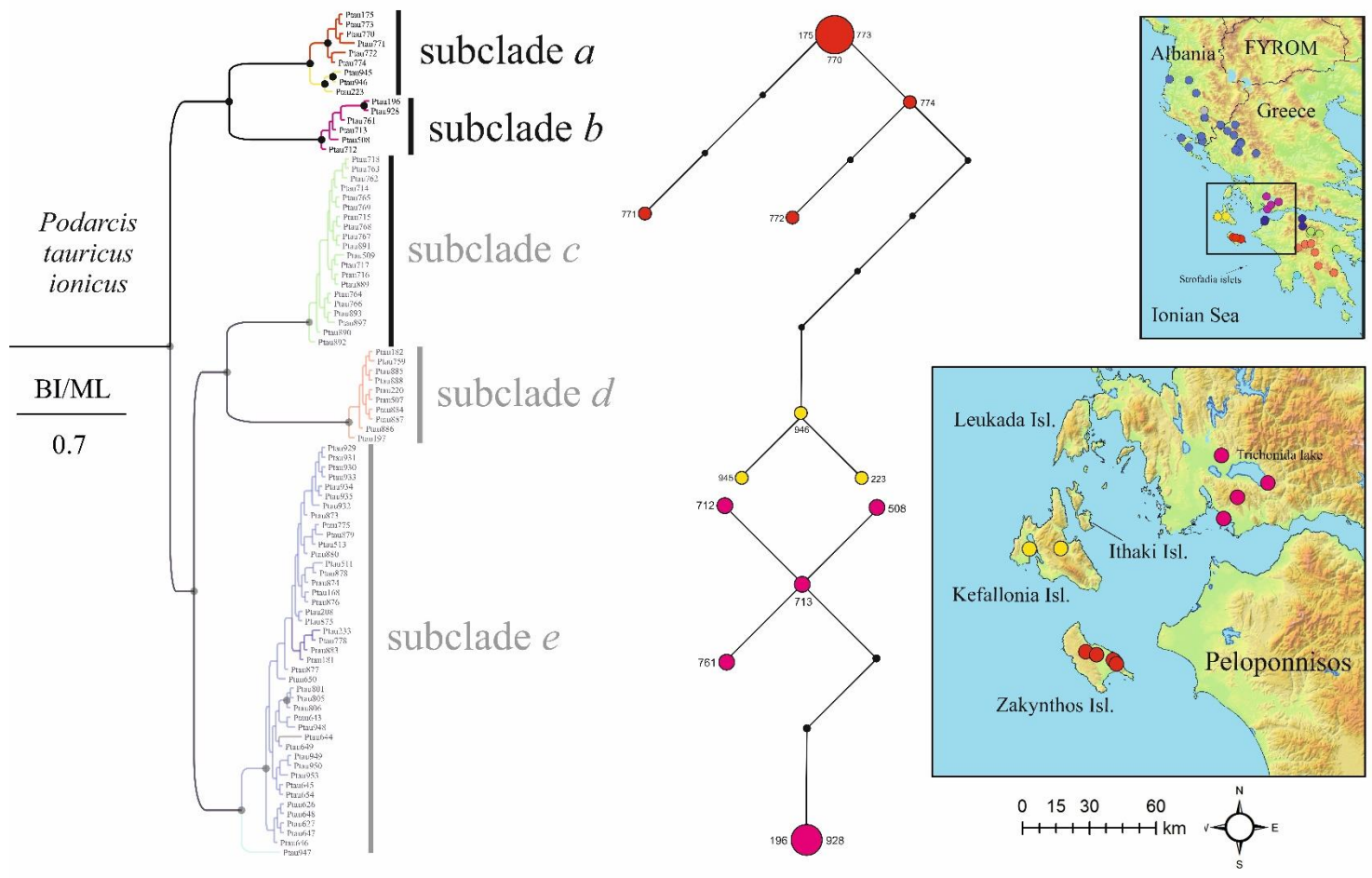
Εικόνα 6.10. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων του είδους *P. gaigeae* και η αντιστοίχιση του κάθε απλοτύπου στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη. Το μέγεθος του κύκλου αντιστοιχεί στη συχνότητα κάθε απλοτύπου.



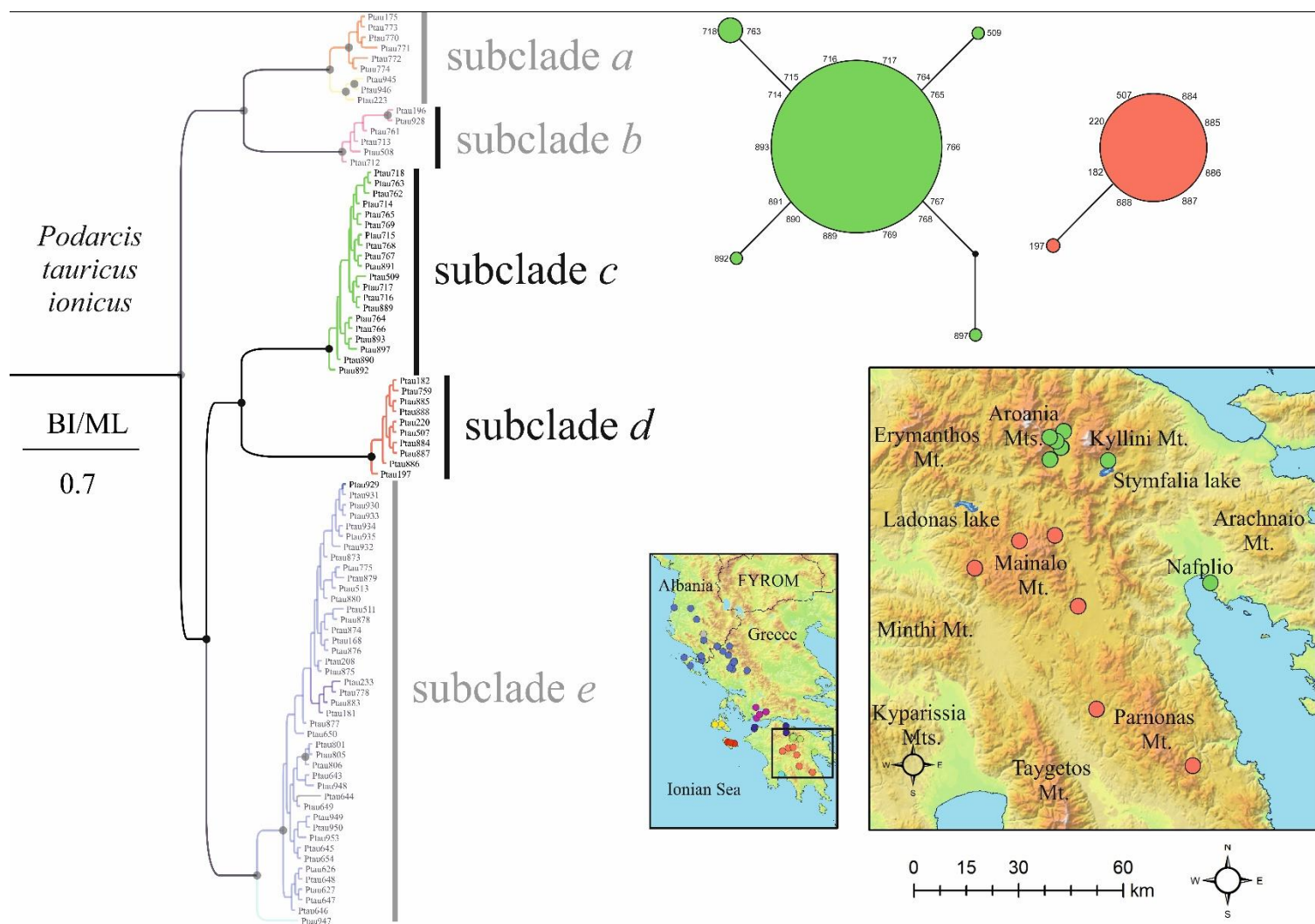
Εικόνα 6.11. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων του είδους *P. milensis* και η αντιστοιχία της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη. Το μέγεθος του κύκλου αντιστοιχεί στη συχνότητα κάθε απλοτύπου.



Εικόνα 6.12. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων των taxa *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae* και η αντιστοιχία της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη. Η ομαδοποίηση δεν αντιστοιχεί απαραίτητα σε γεωγραφικό ή γενετικό διαχωρισμό, αλλά έγινε με σκοπό την απλουστευμένη παρουσίαση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων. Το μέγεθος του κύκλου αντιστοιχεί στη συχνότητα κάθε απλοτύπου, με εξαίρεση τους δύο μεγάλους κύκλους των οποίων το μέγεθος μειώθηκε κατά 50% για λόγους ευκολίας παρουσίασης.

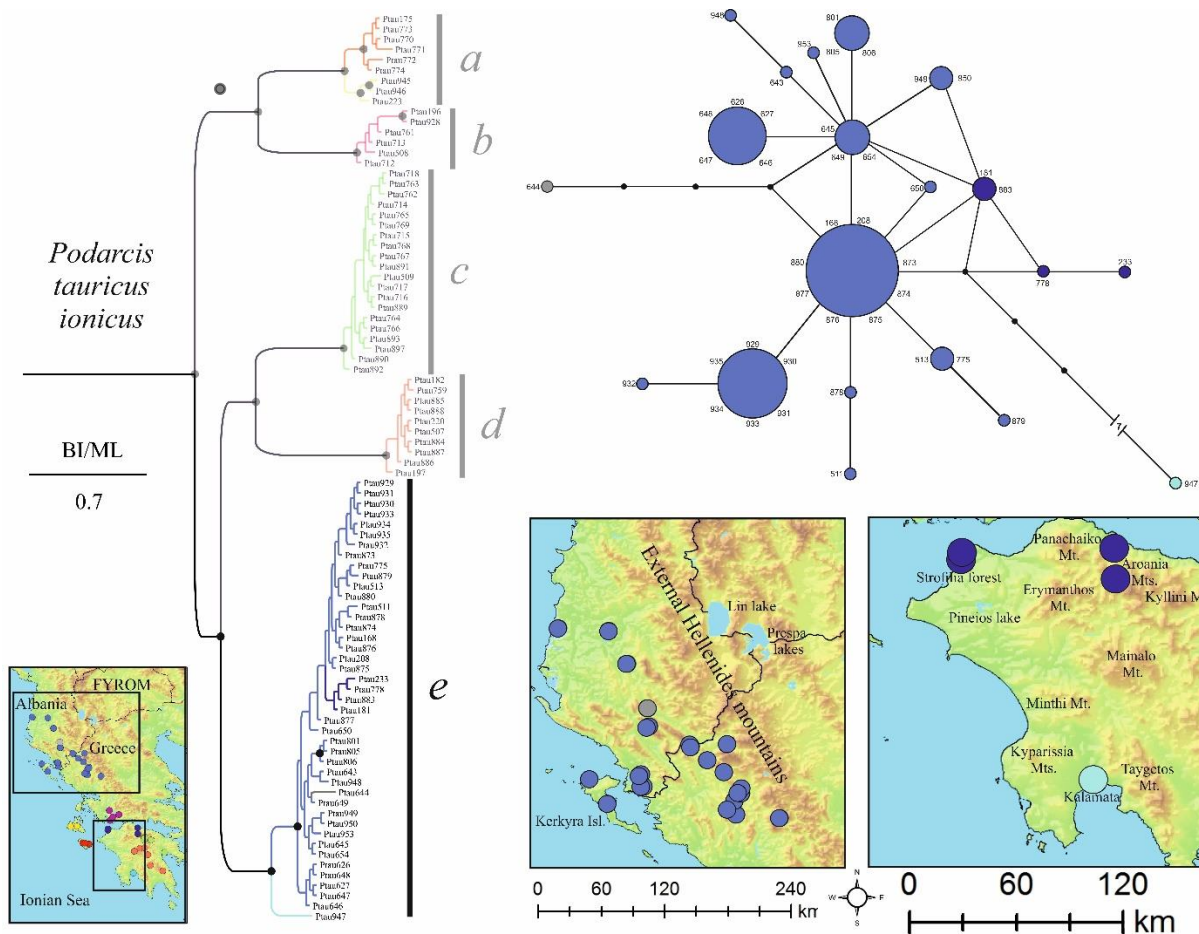


Εικόνα 6.13. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων των φυλογενετικών υποκλάδων *a* και *b* του ταχον *P. t. ionicus* και η αντιστοιχιση της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη. Το μέγεθος του κύκλου αντιστοιχει στη συχνότητα κάθε απλοτύπου.



Εικόνα 6.14. Δίκτυο μιτοχondριακών απλοτύπων των δειγμάτων των φυλογενετικών υποκλάδων *c* και *d* του taxon *P. t. ionicus* και η αντιστοιχισή της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη.





Εικόνα 6.15. Δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων των δειγμάτων του φυλογενετικού υποκλάδου e του taxon *P. t. ionicus* και η αντιστοιχία της κάθε ομάδας απλοτύπων στον φυλογενετικό κλάδο και στον γεωγραφικό χάρτη. Το μέγεθος του κύκλου αντιστοιχεί στη συχνότητα κάθε απλοτύπου.

### 4.3. Γενετική ποικιλότητα και ιστορικά δημογραφικά στοιχεία

Στον Πίνακα 6.1 φαίνονται τα αποτελέσματα των δεικτών της γενετικής ποικιλότητας. Τη μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα εμφανίζει το taxon *P. t. ionicus*, ενώ μεγάλη ποικιλότητα εμφανίζει και το είδος *P. melisellensis*. Ενδιάμεσα επίπεδα ποικιλότητας εμφανίζει το νησιωτικό *P. milensis* σε αντίθεση με το *P. gaegeae*. Η ομαδοποίηση των taxa *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae*, παρότι εμφανίζει σεβαστό αριθμό διαφορετικών απλοτύπων, φαίνεται να έχει μικρή γενετική ποικιλότητα. Μεταξύ των φυλογενετικών υποκλάδων του taxon *P. t. ionicus* τα μεγαλύτερα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας εμφανίζουν οι υποκλάδοι *b* και *e* παρότι έχουν εκ διαμέτρου αντίθετο αριθμό απλοτύπων. Οι υπόλοιποι τρεις υποκλάδοι χαρακτηρίζονται από μικρότερη ποικιλότητα.

Τα αποτελέσματα των δημογραφικών αναλύσεων έδωσαν ποικιλία προτύπων μεταξύ των υπό μελέτη taxa, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στον Πίνακα 6.2 και τις Εικόνες 6.16 - 6.19. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου όλοι οι δείκτες και οι μετρήσεις υποδεικνύουν απότομη δημογραφική αύξηση/επέκταση στο πρόσφατο παρελθόν, όπως για παράδειγμα για τον φυλογενετικό κλάδο που περιέχει τα taxa *P. t. thasopulae* και *P. t. tauricus* και τον υποκλάδο *e* του taxon *P. t. ionicus*. Αντίθετα, υπάρχουν περιπτώσεις με ενδείξεις δημογραφικής ισορροπίας, όπως για παράδειγμα οι φυλογενετικοί υποκλάδοι *a* και *b* του taxon *P. t. ionicus*. Επιπλέον, όπως μαρτυρά η απουσία στατιστικά σημαντικών θετικών τιμών Tajima's *D* ή Fu's *F<sub>s</sub>*, δε φαίνεται να έχει υπάρξει κάποιο ισχυρό φαινόμενο στενωπού (bottleneck) στο πρόσφατο παρελθόν για κανένα από τα εξεταζόμενα taxa. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης «Bayesian Skyline Plots», το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος του είδους *P. gaegeae* παρέμεινε σταθερό και το ίδιο συνέβη για το είδος *P. melisellensis*, το οποίο ωστόσο εμφανίζει μικρή αύξηση. Αντίθετα, τα taxa *P. milensis* και *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae* εμφανίζουν αύξηση του πληθυσμιακού μεγέθους, ενώ το taxon *P. t. ionicus* εμφανίζει απότομη μείωση του πληθυσμιακού

μεγέθους η οποία ακολουθείται από αύξηση. Όσον αφορά τους υποκλάδους του taxon *P. t. ionicus* η παραπάνω ανάλυση έδειξε την ύπαρξη σταθερού πληθυσμιακού μεγέθους στο πρόσφατο παρελθόν για τους υποκλάδους *a* και *c*, με μικρή σταδιακή πληθυσμιακή αύξηση για τον υποκλάδο *a*, ενώ ο υποκλάδος *e* χαρακτηρίζεται από μικρή απότομη μείωση στο δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος, την οποία ακολουθεί μικρή απότομη αύξηση, φέρνοντας το πληθυσμιακό μέγεθος στα επίπεδα πριν από τη μείωση. Η ανάλυση για τον υποκλάδο *b* και *c* δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων ή/και μικρής ποικιλότητας.

Πίνακας 6.1. Σύνοψη των δεικτών γενετικού πολυμορφισμού για κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο και υποκλάδο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

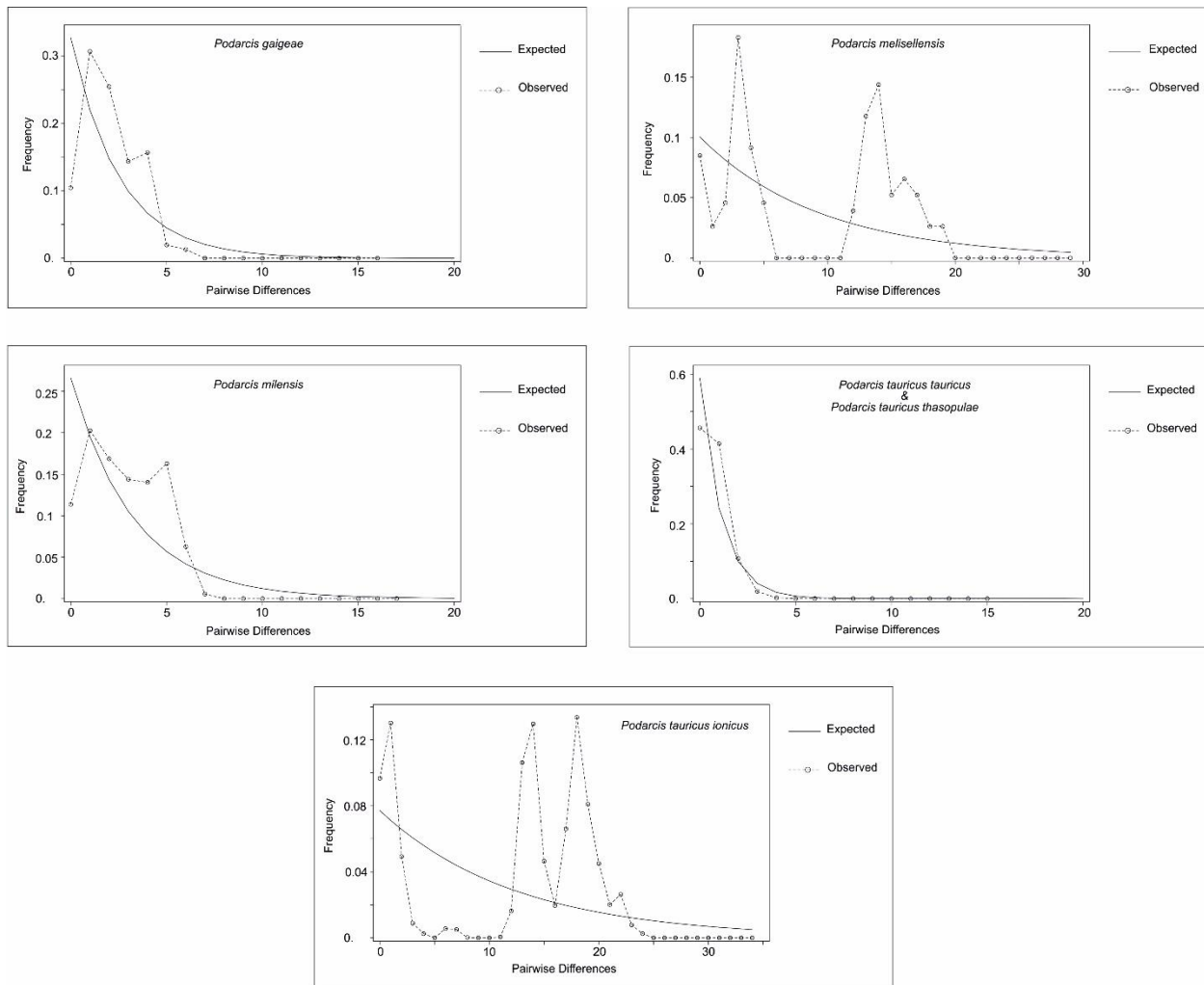
Φυλογενετικοί Κλάδοι και Υποκλάδοι	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>S</i>	$\pi$	$h_d$	$\theta_w$
<i>P. gaiageae</i>	18	9	10	0,003	0,895	0,004
<i>P. melisellensis</i>	18	10	28	0,029	0,915	0,026
<i>P. milensis</i>	33	11	11	0,015	0,886	0,015
<i>P. t. ionicus</i>	85	28	50	0,054	0,903	0,045
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>a</i>	9	7	12	0,005	0,917	0,005
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>b</i>	6	4	5	0,009	0,867	0,008
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>c</i>	20	5	4	0,002	0,505	0,004
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>d</i>	10	2	1	0,001	0,200	0,001
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>e</i>	43	18	64	0,007	0,884	0,026
<i>P. t. tauricus</i> και <i>P. t. thasopulae</i>	178	18	18	0,003	0,544	0,016

*n*: πλήθος δειγμάτων *h*: πλήθος απλοτύπων,  $h_d$ : ποικιλότητα απλοτύπων, *S*: αριθμός ποικιλόμορφων νουκλεοτιδικών θέσεων,  $\pi$ : νουκλεοτιδική ποικιλότητα και  $\theta_w$ : Watterson's theta.

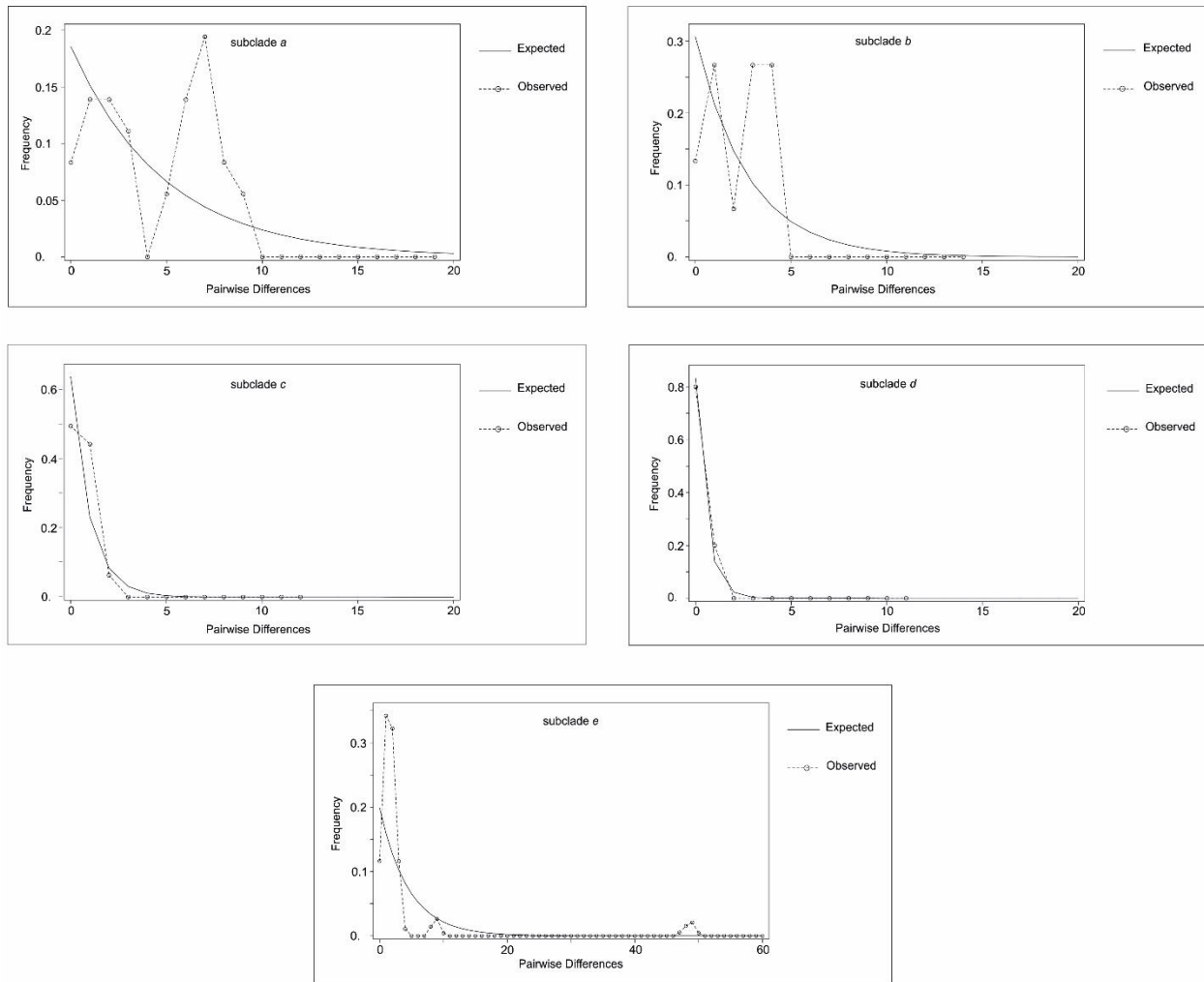
Πίνακας 6.2. Οι τιμές των παραμέτρων (Harpending's raggedness index  $r$ , Fu's  $F_S$ , Ramos-Onsins & Rozas'  $R_2$ , Tajima's  $D$ ) των δημογραφικών αναλύσεων όπως περιεγράφηκαν στο κείμενο για κάθε κύριο φυλογενετικό κλάδο και υποκλάδο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

Φυλογενετικοί Κλάδοι και Υποκλάδοι	$n$	$r$	Fu's $F_S$	Tajima's $D$	$R_2$
<i>P. gaigeae</i>	18	0,075 <i>n.s.</i>	-2,966 <i>n.s.</i>	-1,059 <i>n.s.</i>	0,099 <i>n.s.</i>
<i>P. melisellensis</i>	18	0,054 <i>n.s.</i>	-6,110 ***	0,403 <i>n.s.</i>	0,153 <i>n.s.</i>
<i>P. milensis</i>	33	0,022 <i>n.s.</i>	-20,641 ***	-0,221 <i>n.s.</i>	0,116 <i>n.s.</i>
<i>P. t. ionicus</i>	85	0,015 <i>n.s.</i>	-8,188 <i>n.s.</i>	0,689 <i>n.s.</i>	0,118 <i>n.s.</i>
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>a</i>	9	0,085 <i>n.s.</i>	-2,953 <i>n.s.</i>	-0,028 <i>n.s.</i>	0,144 <i>n.s.</i>
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>b</i>	6	0,169 <i>n.s.</i>	-4,005 *	0,196 <i>n.s.</i>	0,186 <i>n.s.</i>
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>c</i>	20	0,150 <i>n.s.</i>	-4,145 ***	-1,43 <i>n.s.</i>	0,095 <i>n.s.</i>
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>d</i>	10	0,400 <i>n.s.</i>	-0,339 <i>n.s.</i>	-1,112 <i>n.s.</i>	0,300 <i>n.s.</i>
<i>P. t. ionicus</i> υποκλάδος <i>e</i>	43	0,106 <i>n.s.</i>	-16,411 ***	-2,603 ***	0,097 <i>n.s.</i>
<i>P. t. tauricus</i> και <i>P. t. thasopulae</i>	178	0,024 <i>n.s.</i>	-27,179 ***	-2,176 ***	0,022 *

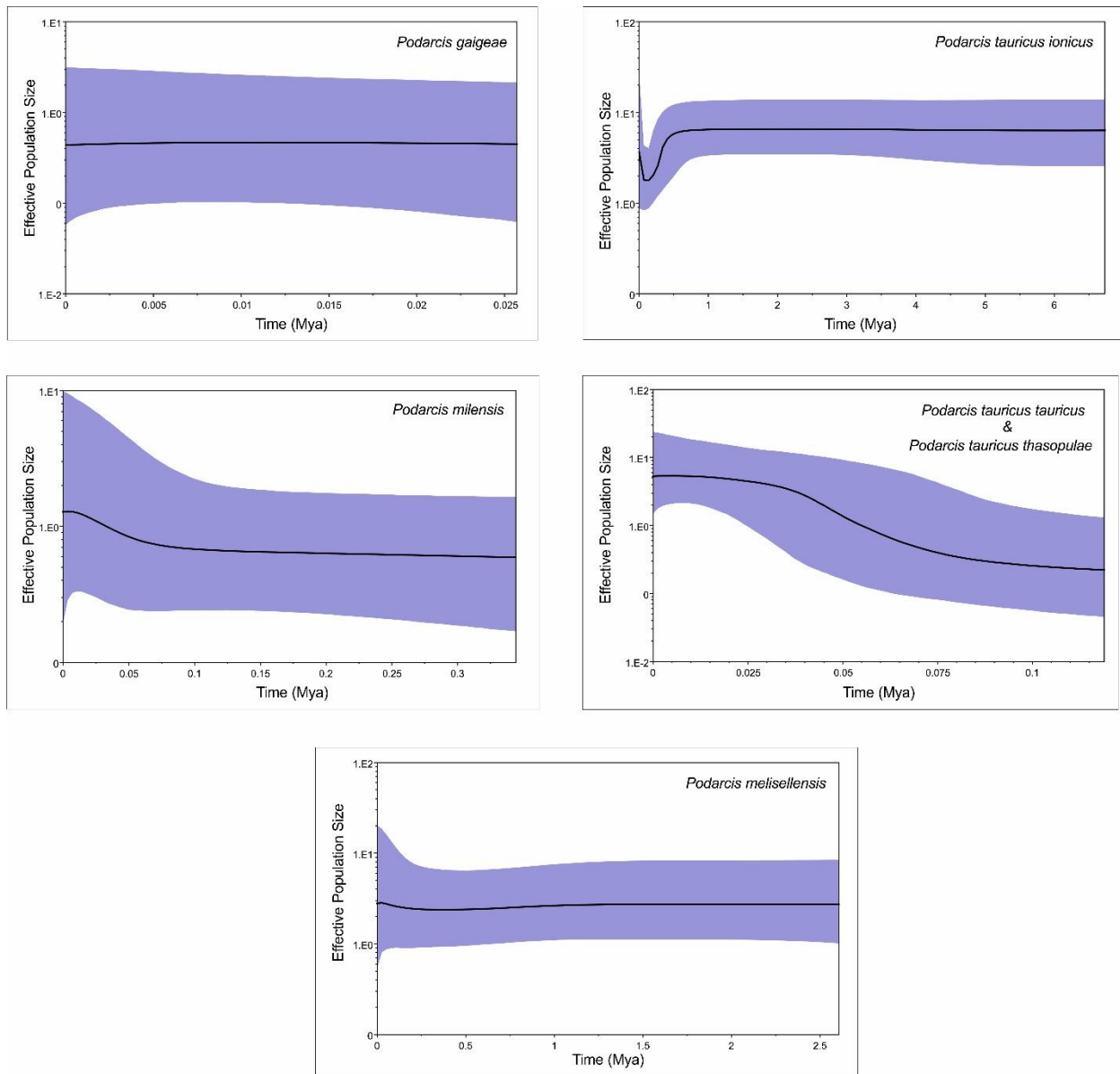
$n$ : πλήθος δειγμάτων. Ενδείξεις γεγονότος απότομης αύξησης/επέκτασης αποτελούν οι στατιστικά μη σημαντικές (*n.s.*) τιμές  $r$  (μη σημαντικότητα  $P > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ) και οι στατιστικά σημαντικές αρνητικές τιμές Fu's  $F_S$  (όριο σημαντικότητας \*  $P < 0,02$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ). Για μικρό αριθμό δειγμάτων αντίστοιχη ένδειξη αποτελούν οι στατιστικά σημαντικές τιμές  $R_2$  (μη σημαντικότητα  $P > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ). Οι στατιστικά σημαντικές θετικές τιμές Tajima's  $D$  και Fu's  $F_S$  υποδεικνύουν φαινόμενο στενωπού (bottleneck). Οι τρεις παύλες υποδηλώνουν τη μη σύγκλιση της ανάλυσης στο λογισμικό Arlequin για τον έλεγχο δημογραφικής αύξησης/επέκτασης.



Εικόνα 6.16. Δημογραφική mismatch distribution ανάλυση για τα υπό εξέταση taxa. Η συνεχής γραμμή δείχνει τις αναμενόμενες τιμές δημογραφικής ισορροπίας, ενώ η διακεκομμένη τις παρατηρούμενες τιμές.

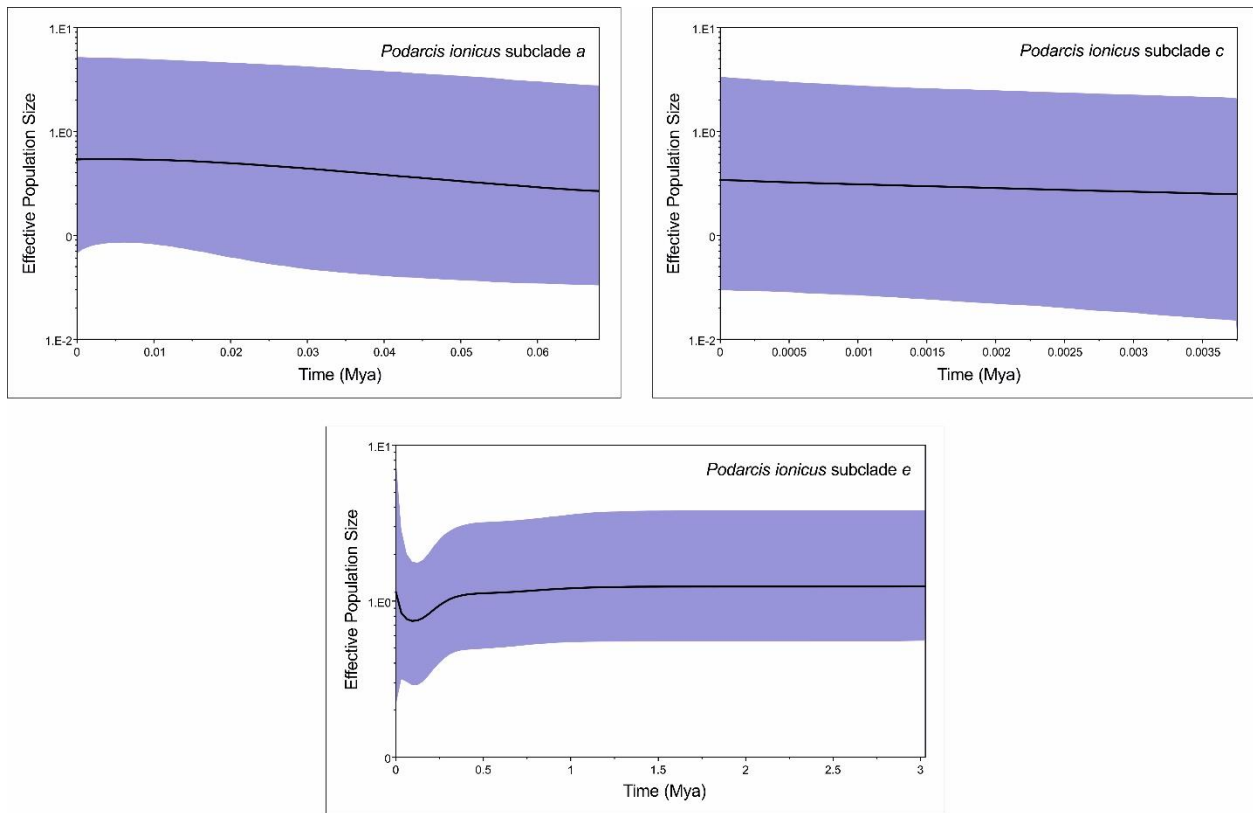


Εικόνα 6.17. Δημογραφική mismatch distribution ανάλυση για τους φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon *P. t. ionicus*. Η συνεχής γραμμή δείχνει τις αναμενόμενες τιμές δημογραφικής ισορροπίας, ενώ η διακεκομμένη τις παρατηρούμενες τιμές.



Εικόνα 6.18. Αποτελέσματα ανάλυσης τύπου «Bayesian Skyline Plots» για τα υπό εξέταση taxa. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στις τιμές της διαμέσου, ενώ η μοβ στην τοπική απόκλιση.





Εικόνα 6.19. Αποτελέσματα ανάλυσης τύπου «Bayesian Skyline Plots» για τους φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon *P. t. ionicus*. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στις τιμές της διαμέσου, ενώ η μοβ στην τυπική απόκλιση. Η ανάλυση για τους υποκλάδους *b* και *d* δεν ήταν εφικτό να εφαρμοστεί λόγω ανεπαρκούς αριθμού δειγμάτων ή / και χαμηλής ποικιλομορφίας.

## 5. Συζήτηση

Οι αναλύσεις του παρόντος κεφαλαίου είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πλήθους δεδομένων σχετικά με τη φυλογενετική δομή και τη γενετική ποικιλότητα κάθε εξεταζόμενου taxon, την ιστορική δημογραφία του, την πιθανή προγονική κατανομή του και τον χρόνο εξελικτικής του απόκλισης. Συμπεριελήφθησαν δείγματα από όλο σχεδόν το εύρος των γεωγραφικών κατανομών των υπό εξέταση ειδών και εφαρμόστηκαν οι απαραίτητες αναλύσεις για τη διερεύνηση των παραπάνω. Τα παραγόμενα αποτελέσματα και ευρήματα του παρόντος κεφαλαίου σε συνδυασμό με αυτά των προηγούμενων κεφαλαίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας κάθε ενός από τα εξεταζόμενα taxa και εν συνεχεία για την κατασκευή ενός εύλογου σεναρίου φυλογεωγραφίας της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

### 5.1. Ποικιλία εξελικτικών και δημογραφικών προτύπων εντός κάθε taxon

#### 5.1.1. Τα ενδημικά νησιωτικά είδη *Podarcis gaiageae* και *Podarcis milensis*

Εκτός από το νησιωτικό ενδημισμό, ως κοινό χαρακτηριστικό τους τα δύο αυτά είδη έχουν εκ πρώτης απόψεως παρόμοια ενδοειδική ποικιλότητα μιας και εμφανίζουν τον ίδιο σχεδόν αριθμό απλοτύπων (~10), ποικιλότητα απλοτύπων (~0,89) και αριθμό ποικιλόμορφων νουκλεοτιδικών θέσεων (~10) (Πίνακας 6.1). Ωστόσο, διαφέρουν σε χαρακτηριστικά δημογραφικής ιστορίας, νουκλεοτιδικής ποικιλότητας και φυλογενετικής δομής.

Το είδος *P. gaiageae* έχει μικρότερη νουκλεοτιδική ποικιλότητα (Πίνακας 6.1), ενώ οι ενδοειδικές φυλογενετικές σχέσεις και το δίκτυο απλοτύπων (Εικ. 6.10) υποδεικνύουν την ύπαρξη πολύ πρόσφατης διαφοροποίησης, χωρίς όμως να αποκλείεται πιθανή γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών, κυρίως μεταξύ των πληθυσμών του κεντρικού νησιού και των νησίδων. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι το νησιωτικό συγκρότημα

της Σκύρου πήρε τη σημερινή μορφή του ως ένα κεντρικό νησί με πολλές δορυφόρες νησίδες μετά τον κατακερματισμό της ενιαίας νησιωτικής μάζας πριν από 9.000 χρόνια περίπου (van Andel and Shackleton, 1982; Perissoratis and Conispoliatis, 2003) λόγω ευστατισμού και τεκτονισμού. Γειτονικές νησίδες πιθανότατα απομονώθηκαν πολύ πρόσφατα σε ιστορικά χρόνια, όπως για παράδειγμα οι νησίδες Σαρακινό και Πλατειά που φέρουν τον ίδιο απλότυπο, κάτι που ωστόσο μπορεί να δηλώνει και πρόσφατη διασπορά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μικρή γενετική απόσταση μεταξύ των ατόμων της νησίδας Πιπέρι των Βόρειων Σποράδων (Εικ. 6.10) και των υπόλοιπων και η ύπαρξη δύο διαφορετικών απλοτύπων σε αυτή τη νησίδα, με τον έναν να υπάρχει και στη νησίδα Ρήγεια, οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι η νησίδα Πιπέρι ήταν συνδεδεμένη γεωγραφικά με το συγκρότημα της Σκύρου εντός του Ανώτερου Πλειστοκαίνου. Το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να εξηγήσει και τις ενδείξεις γονιδιακής ροής μεταξύ των υποειδών *P. g. weigandi* (νησίδα Πιπέρι) και *P. g. gaiigae* (συγκρότημα Σκύρου) που παρατηρήθηκε με χρήση μικροδορυφορικών τόπων σε προηγούμενη μελέτη (Runemark et al., 2012). Η επίδραση του κατακερματισμού έχει ήδη θεωρεί ως ο σημαντικότερος παράγοντας διαφοροποίησης στους κυκλαδίτικους πληθυσμούς του είδους *P. erhardii* συγκριτικά με την απομόνωση λόγω απόστασης των νησίδων (Hurston et al., 2009). Όσον αφορά την ιστορική δημογραφία, οι στατιστικά μη σημαντικές τιμές των δεικτών  $F_u$ 's  $F_s$ , Tajima's  $D$  και  $R_2$  (Πίνακας 6.2) υποδεικνύουν την έλλειψη στοιχείων απόκλισης από το μοντέλο δημογραφικής ισορροπίας, κάτι που υποστηρίζεται και από την ανάλυση «Bayesian Skyline Plots» (Εικ. 6.18), η οποία δείχνει την ύπαρξη σταθερού δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους (τουλάχιστον τα τελευταία 25.000 χρόνια). Ομοίως, η ύπαρξη δύο κορυφών στο διάγραμμα «mismatch distribution» (Εικ. 6.16) και η στατιστικά μη σημαντική τιμή  $r$  (Πίνακας 6.2) υποδεικνύει μη καλή προσαρμογή των δεδομένων μας στο μοντέλο απότομης αύξησης. Τέλος, σύμφωνα με τις προβολές LGM και LIG της μοντελοποίησης χωρικής κατανομής του *P. gaiigae* του προηγούμενου κεφαλαίου (Εικ. 5.15, επίσης βλ. Εικ. 5.16 για όλη την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*») η σημερινή κατανομή του είδους μοιάζει με την αντίστοιχη δυνητική κατά τη διάρκεια της τελευταίας

παγετώδους περιόδου. Λαμβάνοντας υπόψιν τις οικολογικές προτιμήσεις του είδους (κυρίως ανοικτή βλάστηση τύπου μακί και αμμοθίνες), οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες δημιουργήθηκαν σταδιακά με το πέρασ της παραπάνω χρονικής περιόδου και παρέμειναν σχετικά σταθερές έως σήμερα ενισχύοντας την υπόθεση πληθυσμιακής σταθερότητας του taxon.

Το είδος *P. milensis* έχει σαφώς μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ποικιλότητα (Πίνακας 6.1), η οποία είναι εμφανής στον φυλογενετικό κλάδο του είδους και στο αντίστοιχο δίκτυο απλοτύπων (Εικ. 6.11). Τα δύο μεγάλα νησιά του συγκροτήματος, Μήλος και Κίμωλος, αποτελούνται από διακριτές ομάδες απλοτύπων, αν και στο φυλογενετικό δέντρο μόνο οι γενεαλογίες της νήσου Κιμώλου εμφανίζονται μονοφυλετικές, με τη διαφοροποίηση να έχει συμβεί στο Ανώτερο Πλειστόκαινο (Εικ. 6.9). Το πρότυπο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τον ευστατικό διαχωρισμό των δύο αυτών νησιών που πιθανολογείται να συνέβη πριν από 9.000 χρόνια περίπου (Lambeck, 1996). Δημογραφικά, το είδος φαίνεται να έχει υποστεί απότομη πληθυσμιακή αύξηση στο παρελθόν σύμφωνα με τη στατιστικά σημαντική τιμή  $F_u$ 's  $F_s$ , αν και αντίθετη ένδειξη αποτελούν οι τιμές Tajima's  $D$  και  $R_2$  όπως και η ανάλυση «mismatch distribution» και η τιμή  $r$  (Πίνακας 6.2 και Εικ.6.16). Ωστόσο, η πρώτη και η τρίτη αποτελούν λιγότερο ισχυρές μετρήσεις, ενώ η δεύτερη είναι καταλληλότερη για μικρό αριθμό δειγμάτων (στην περίπτωση αυτή  $n=33$ ). Η ανάλυση «Bayesian Skyline Plots» (Εικ. 6.18) φανέρωσε μικρή αύξηση του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους πριν από 50.000 χρόνια, η οποία συνεχίζεται και σήμερα, κάτι που δικαιολογεί την παραπάνω ασυμφωνία μεταξύ των δεικτών αφού δε συνέβη πολύ απότομη αύξηση ώστε να επηρεαστούν οι λιγότερο ευαίσθητοι δείκτες. Οι προβολές LGM και LIG της μοντελοποίησης χωρικής κατανομής του είδους (Εικ. 5.15, επίσης βλ. Εικ. 5.16 για όλη την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*») έδειξαν ότι η σημερινή κατανομή του είδους μοιάζει με την αντίστοιχη δυνητική κατά τη διάρκεια της τελευταίας παγετώδους περιόδου. Η σταδιακή αλλαγή στις παρούσες συνθήκες πιθανόν να είναι η αιτία της βαθμιαίας αύξησης του πληθυσμιακού μεγέθους του είδους *P. milensis*.

### 5.1.2. Το δαλματικό *Podarcis melisellensis*

Η μελέτη της ποικιλότητας του συγκεκριμένου taxon έδειξε σημαντική ενδοειδική ποικιλότητα (Πίνακας 6.1), η οποία αντικατοπτρίζεται και στην ανεπτυγμένη φυλογενετική δομή που παρατηρείται εντός του κλάδου (Podnar et al., 2004; Podnar et al., 2014, και Συμπλ. Εικόνα Σ3, Παράρτημα III) με την ύπαρξη τριών κύριων φυλογενετικών υποκλάδων (*fiumana*, *Lastovo* και *melisellensis*). Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες, τα τρία διακριτά δίκτυα μιτοχονδριακών απλοτύπων που αντιστοιχούν στους δύο πρώτους υποκλάδους του είδους *P. melisellensis* παρουσιάζουν μορφή αστεριού, δείγμα διαφοροποίησης εντός μικρού χρονικού διαστήματος, με τον υποκλάδο *fiumana* ωστόσο να αποτελείται από δύο διακριτές ομάδες απλοτύπων. Αντίθετα, ο υποκλάδος *melisellensis* χαρακτηρίζεται από πιο πολύπλοκο δίκτυο απλοτύπων με αρκετές νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις μεταξύ των ομάδων απλοτύπων, στοιχεία πιο έντονης διαφοροποίησης. Η διαφοροποίηση αυτή είναι αναμενόμενη αφού ο υποκλάδος κατανέμεται σε τρία νησιωτικά συγκροτήματα κοντινής απόστασης. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Podnar et al., 2004), η διαφοροποίηση εντός κάθε υποκλάδου οφείλεται κυρίως στις διακυμάνσεις της στάθμης της θάλασσας κατά τη διάρκεια των παγετωδών - μεσοπαγετωδών περιόδων του Πλειστοκαίνου, με την πιθανή ύπαρξη παγετωνικών καταφυγίων κατά τη Βούρμιο Φάση (Würm) πριν από 70.000 - 18.000 χρόνια. Σε αυτήν την κατεύθυνση οδηγούν και οι προβολές LGM και LIG της μοντελοποίησης χωρικής κατανομής (Εικ. 5.14, επίσης βλ. Εικ. 5.16 για όλη την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*») του είδους *P. melisellensis* που δείχνουν ότι η τότε δυνητικές κατανομές σε σύγκριση με τη σημερινή είχαν περιοριστεί αρκετά κατά τη διάρκεια εκείνων των περιόδων. Πρόσφατα γεγονότα διασποράς επίσης είχαν κάποια συμβολή στη μορφοποίηση της σύγχρονης κατανομής του είδους (Podnar et al., 2004). Αν και στην παρούσα διατριβή δεν εξετάστηκε η εξελικτική και δημογραφική ιστορία κάθε υποκλάδου του είδους αυτού (λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων, τα οποία στην πλειονότητά τους προέρχονται από τη βάση GenBank), στο σύνολό του φαίνεται ότι το

είδος *P. melisellensis* έχει υποστεί απότομη πληθυσμιακή αύξηση στο παρελθόν σύμφωνα με τη στατιστικά σημαντική τιμή  $F_u$ 's  $F_s$ , αν και αντίθετη ένδειξη αποτελούν οι τιμές Tajima's  $D$  και  $R_2$  (Πίνακας 6.2). Η ανάλυση «mismatch distribution» (Εικ.6.16) και η στατιστικά μη σημαντική τιμή  $r$  (Πίνακας 6.2) έδειξαν κατανομή με πολλές κορυφές, ένδειξη δημογραφικής ισορροπίας, η οποία όμως μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη ανεπτυγμένης φυλογενετικής δομής εντός του είδους. Η ανάλυση «Bayesian Skyline Plots» (Εικ. 6.18) φανέρωσε σταθερό δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος (τουλάχιστον τα τελευταία 2,5 εκατομμύρια χρόνια), με μικρή βαθμιαία αύξηση στο πολύ πρόσφατο παρελθόν. Τα παραπάνω δείχνουν ότι συνολικά το είδος πιθανότατα βρίσκεται σε δημογραφική ισορροπία, χωρίς αυτό όμως να σημαίνει ότι κάθε υποκλάδος του δεν έχει υποστεί δημογραφικές αλλαγές στο παρελθόν ως αποτέλεσμα της επιρροής των παγετωδών – μεσοπαγετωδών περιόδων.

### 5.1.3. Το ευρέως εξαπλωμένο taxon *Podarcis tauricus* *tauricus* / *Podarcis tauricus thasopulae*

Τα αποτελέσματα των φυλογενετικών αναλύσεων σχετικά με τις ενδοειδικές σχέσεις της ομαδοποίησης των μορφολογικών υποειδών *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae*, φανέρωσαν άλυτες φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ όλων των δειγμάτων, με χαρακτηριστική την παρουσία πολλών γενεαλογικών γραμμών με μικρό μήκος κλάδων (Εικ. 6.12 και Συμπλ. Εικ. Σ1, Παράρτημα ΙΙΙ) σχηματίζοντας μορφή «χτένας». Είναι χαρακτηριστικό ότι το είδος εμφανίζει μέτρια ποικιλότητα απλοτύπων (ωστόσο υπερβολικά μικρή για τον αριθμό των δειγμάτων και την καταγωγή τους) και μικρή νουκλεοτιδική ποικιλότητα (Πίνακας 6.1). Παρόμοιο πρότυπο εμφάνισε και το δίκτυο μιτοχονδριακών απλοτύπων (Εικ. 6.12) με την παρουσία δύο συγγενικών απλοτύπων μεγάλης συχνότητας με τους οποίους συνδέονται οι περισσότεροι μικρότερης συχνότητας απλότυποι, δημιουργώντας έτσι μορφή «θάμνων». Οι κύριοι αυτοί απλότυποι εντοπίζονται σε όλη την έκταση της κατανομής του taxon. Δεδομένης της μεγάλης σε

έκταση κατανομής, τα παραπάνω υποδηλώνουν πρόσφατη και απότομη εξάπλωση του taxon. Οι αναλύσεις ιστορικής δημογραφίας συμφωνούν όλες με την παραπάνω υπόθεση μιας και εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές αρνητικές τιμές  $F_u$ 's  $F_s$ , Tajima's  $D$ ,  $R_2$  και στατιστικά μη σημαντική τιμή  $r$  (Πίνακας 6.2) που ταιριάζει με το διάγραμμα «mismatch distribution» (Εικ.6.16), στο οποίο εμφανίζεται μια μοναδική κορυφή, δείγμα απότομης δημογραφικής αύξησης. Η ανάλυση «Bayesian Skyline Plots» (Εικ. 6.18) φανέρωσε σταδιακή αύξηση του πληθυσμιακού μεγέθους πριν από τα 100.000 χρόνια, η οποία έγινε πιο απότομη λίγο αργότερα και την οποία ακολούθησε δημογραφική σταθερότητα πριν από ~15.000 - 30.000 χρόνια που συνεχίζεται έως σήμερα. Η παραπάνω παρατηρούμενη απότομη αύξηση θα μπορούσε να οφείλεται στη σταδιακή επέκταση του taxon προς τα βόρεια κατά τη διάρκεια των μεσοπαγετωδών περιόδων. Η απουσία στενωπού ίσως εξηγείται με την ύπαρξη πολλών παγετωνικών καταφυγίων. Το παραπάνω πρότυπο επιβεβαιώνεται και από τις προβολές LGM και LIG (Εικ. 5.14, επίσης βλ. Εικ. 5.16 για όλη την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*») όπου φαίνεται ξεκάθαρα η μείωση των τότε δυνητικών κατανομών με την ύπαρξη κάποιων τοπικών πληθυσμών στα κεντρικά προς νότια Βαλκάνια. Αυτές οι περιοχές θα μπορούσαν να αποτελούν δυνητικά τοπικά κλιματικά καταφύγια, όπως έχει ήδη προταθεί (Taberlet et al., 1998; Joger et al., 2007) και παρατηρηθεί σε άλλες φυλογεωγραφικές μελέτες βαλκανικών Lacertidae (π.χ., Sagonas et al., 2014; Marzahn et al., 2016). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από την παρατήρηση στο δίκτυο mtDNA απλοτύπων (Εικ. 6.12) εντοπισμένων θέσεων μοναδικών απλοτύπων ή ομάδων απλοτύπων στην κεντρική Ελλάδα και στη Μακεδονία (ευρύτερη περιοχή γύρω από τις Εσωτερικές Ελληνίδες), αλλά και στην Αλβανία, την Π.Γ.Δ.Μ. και τη Βουλγαρία.

#### 5.1.4. Το ποικιλόμορφο *Podarcis tauricus ionicus*

Δύο από τα κυριότερα ευρήματα της μελέτης των φυλογενετικών σχέσεων (Δεύτερο Κεφάλαιο) και της οριοθέτησης ειδών (Πέμπτο Κεφάλαιο) της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» ήταν η ανακάλυψη της μεγάλης γενετικής απόκλισης του taxon *P. t. ionicus* από τα υπόλοιπα είδη και ταυτόχρονα η ύπαρξη μεγάλης ποικιλότητας εντός του taxon με την ύπαρξη πέντε διακριτών και βαθιά αποκλινόντων υποκλάδων. Η μεγάλη ποικιλότητα του taxon είναι επίσης εμφανής σε όλους τους δείκτες ποικιλότητας (Πίνακας 6.1) και ιδιαίτερα στη νουκλεοτιδική ποικιλότητα. Η ανάλυση κατασκευής δικτύων απλοτύπων mtDNA είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή πέντε διακριτών δικτύων που δεν συνδέονται (Εικ. 6.13 – 6.15, συζητούνται παρακάτω), ένδειξη της μεγάλης εξελικτικής τους απόκλισης. Οι περισσότερες αναλύσεις δημογραφικής ιστορίας του taxon εμφανίζονται επηρεασμένες από την έντονη φυλογενετική δομή με αποτέλεσμα να μην εντοπίζεται κάποιο γεγονός απότομης αύξησης (Πίνακας 6.2), με χαρακτηριστική την εικόνα του διαγράμματος «mismatch distribution» όπου εμφανίζονται πολλές κορυφές. Ωστόσο, η ανάλυση «Bayesian Skyline Plots» (Εικ. 6.19), η οποία λαμβάνει υπόψιν της περισσότερα δεδομένα από τους υπόλοιπους δημογραφικούς δείκτες, όπως για παράδειγμα την τοπολογία του δέντρου, εμφάνισε διαφορετική εικόνα. Φαίνεται ότι ύστερα από μια περίοδο σταθερότητας, το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος του taxon μειώθηκε απότομα στο σύντομο παρελθόν (~500.000 χρόνια πριν), πιθανή ένδειξη δηλαδή κάποιου φαινομένου στενωπού, και στη συνέχεια άρχισε να αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό συνεχίζοντας έως και σήμερα, χωρίς ωστόσο να έχει φτάσει ακόμη το προηγούμενο επίπεδο σταθερότητας. Η εικόνα αυτή ταυτίζεται με τις προβολές LGM και LIG τόσο για το taxon αυτό καθ' αυτό (Εικ. 5.14) όσο και για όλη την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» (Εικ. 5.16), υποδηλώνοντας την έντονη επίδραση των παγετωδών και μεσοπαγετωδών κύκλων.

Αναφορικά με την εξελικτική και δημογραφική ιστορία εντός κάθε φυλογενετικού υποκλάδου του taxon *P. t. ionicus*, το μικρό δειγματοληπτικό μέγεθος (με



την εξαίρεση του υποκλάδου *e* και *c*) αποτελεί τροχοπέδη για την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων βάσει των δημογραφικών αναλύσεων και της μοντελοποίησης χωρικών κατανομών (εδώ ο υποκλάδος *c* έχει μικρό δειγματοληπτικό μέγεθος). Λόγω αυτού, κάποια αντικειμενικά συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν μόνο από τη μελέτη των δικτύων μιτοχονδριακών απλοτύπων. Παρόλα αυτά, όπου κρίνεται ορθό η συζήτηση θα περιέχει κάποια στοιχεία από αυτές τις αναλύσεις.

Ξεκινώντας από τους υποκλάδους *a* (νότια Επτάνησα) και *b* (δυτική Στερεά Ελλάδα) που αποτελούν αδελφές ομάδες σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο (Εικ. 6.13), οι δύο αυτές ομάδες παρά τον μικρό αριθμό δειγμάτων και τη μικρή γεωγραφική εξάπλωση εμφανίζουν αξιοσημείωτο βαθμό ποικιλότητας (Πίνακας 6.1). Το παραπάνω γίνεται εμφανές στα δίκτυα απλοτύπων (Εικ.6.13), όπου δεν εμφανίζεται ενιαίος απλότυπος μεγάλης συχνότητας αλλά πολλοί μικρής, στην πλειονότητά τους μοναδικοί. Η γενετική ποικιλότητα του υποκλάδου *a* πηγάζει από τη διαφοροποίηση που παρατηρείται μεταξύ των γενεαλογιών που ενδημούν στην Κεφαλονιά και τη Ζάκυνθο, αλλά και από την διαφοροποίηση εντός της Ζακύνθου. Το πρότυπο αυτό υποδηλώνει είτε παλαιότερη εξελικτική ιστορία για τους πληθυσμούς της Ζακύνθου σε σχέση με αυτή των πληθυσμών της Κεφαλονιάς είτε φαινόμενο στενωπού για τους πληθυσμούς της δεύτερης. Από την άλλη, οι απλότυποι του υποκλάδου *b* κατανέμονται στην ευρύτερη περιοχή της λίμνης Τριχωνίδας και πιθανότατα η μικρή πρόσφατη διαφοροποίηση που εμφανίζεται εντός του υποκλάδου να οφείλεται στη γεωμορφολογία της περιοχής και στις αυξομειώσεις της στάθμης της θάλασσας κατά τη διάρκεια των πλειστοκαινικών παγετωδών και μεσοπαγετωδών περιόδων. Λόγω του μικρού μεγέθους δειγμάτων των δύο υποκλάδων, ο μόνος αξιόπιστος δείκτης δημογραφικής ιστορίας θεωρείται ο  $R_2$ , οι τιμές του οποίου δεν είναι στατιστικά σημαντικές για καμία από τις δύο περιπτώσεις (Πίνακας 6.2) υποδεικνύοντας την ύπαρξη δημογραφικής ισορροπίας. Ομοίως, η ανάλυση «Bayesian Skyline Plots» για την περίπτωση του υποκλάδου *a* (Εικ. 6.19) δείχνει σταθερό πληθυσμιακό μέγεθος στο πέρασμα του χρόνου (τελευταία 60.000 χρόνια), με

μικρή βαθμιαία αύξηση. Για τον υποκλάδο *b* η ανάλυση αυτή δεν ήταν εφικτή λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων.

Οι υποκλάδοι *c* και *d* που εντοπίζονται στη βορειοανατολική και στην κεντρική και νοτιοανατολική Πελοπόννησο, αντίστοιχα, εμφανίζουν ομοιογένεια όσον αφορά την ποικιλομορφία τους, με την παρουσία ενός απλοτύπου μεγάλης συχνότητας και λίγων μοναδικών (Εικ.6.14), χαρακτηριστικό πρόσφατης εξάπλωσης ή ενιαίου πληθυσμού. Οι δείκτες γενετικής ποικιλότητας (Πίνακας 6.1) επαληθεύουν τα παραπάνω. Αν και για τον μικρό, σε αριθμό δειγμάτων, υποκλάδο *d* η στατιστικά μη σημαντική τιμή  $R_2$  (Πίνακας 6.2) υποδηλώνει δημογραφική σταθερότητα, για τον υποκλάδο *c* που περιέχει αρκετά δείγματα, η στατιστικά σημαντική αρνητική τιμή  $F_u$ 's  $F_s$  υποδεικνύει γεγονός πρόσφατης εξάπλωσης. Ωστόσο, οι υπόλοιποι δείκτες (Πίνακας 6.2 και Εικ. 6.17), καθώς και οι αναλύσεις «Bayesian Skyline Plots» (Εικ. 6.19) υποδεικνύουν την ύπαρξη δημογραφικής ισορροπίας και σταθερού πληθυσμιακού μεγέθους και για τους δύο υποκλάδους.

Ο υποκλάδος *e* εμφανίζει ιδιαίτερη κατανομή που σε συνδυασμό με το παραγόμενο δίκτυο mtDNA απλοτύπων (Εικ.6.15) και τις υπόλοιπες αναλύσεις, φανερώνει πολύ ενδιαφέρουσα εξελικτική ιστορία. Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο, εντός του υποκλάδου αυτού εντοπίζονται δύο κύριες εξελικτικές γραμμές. Η μία αποτελείται από ένα και μοναδικό δείγμα από την περιοχή της Καλαμάτας (Πάμισος ποταμός), ενώ η άλλη από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Η εξάπλωση της δεύτερης εξελικτικής γραμμής αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές. Η πρώτη καλύπτει τη βορειοδυτική Ελλάδα (ευρύτερη περιοχή Ηπείρου), την Κέρκυρα και τη νοτιοδυτική Αλβανία, ενώ η δεύτερη τη βορειοδυτική και νοτιοδυτική Πελοπόννησο. Δυστυχώς, από την ενδιάμεση περιοχή, που περιλαμβάνει τις περιοχές δυτικά της νότιας οροσειράς της Πίνδου και την ευρύτερη περιοχή του Αμβρακικού, δεν είχαμε διαθέσιμα δείγματα, ενώ στην περιοχή της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου και της λίμνης Τριχωνίδας εντοπίζεται ο υποκλάδος *b*. Παρά την ευρεία κατανομή του όμως, ο υποκλάδος *e* εμφανίζει χαμηλή γενετική ποικιλότητα (Πίνακας 6.1). Το δίκτυο απλοτύπων (Εικ. 6.15),

οι στατιστικά αρνητικές τιμές των δημογραφικών δεικτών  $F_u$ 's  $F_s$  και Tajima's  $D$  (Πίνακας 6.2) και το διάγραμμα «mismatch distribution» (Εικόνα 6.17) υποδεικνύουν την απότομη εξάπλωση του είδους στο πρόσφατο παρελθόν. Την υπόθεση αυτή υποστηρίζει και η ανάλυση «Bayesian Skyline Plots» (Εικ. 6.19) με την εμφάνιση μικρής μείωσης του πληθυσμιακού μεγέθους (μετά τα ~ 500.000 χρόνια πριν) ύστερα από μακρά περίοδο σταθερότητας, την οποία ακολουθεί αρκετά απότομη αύξηση. Η αυξομείωση αυτή ταυτίζεται με τις προβολές LGM και LIG για τον υποκλάδο αυτό (Εικ. 5.15), αλλά και για όλη την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» (Εικ. 5.16), υποδηλώνοντας την έντονη επίδραση των παγετωδών και μεσοπαγετωδών περιόδων. Πιθανή εξήγηση της παρουσίας του υποκλάδου  $e$  τόσο στην ηπειρωτική Ελλάδα όσο και στην Πελοπόννησο αποτελεί η διασπορά από τη μια περιοχή στην άλλη σε κάποια ή κάποιες από τις πλειστοκαινικές περιόδους καθόδου της στάθμης της θάλασσας μέσω πιθανής σύνδεσης ξηράς. Η προτίμηση ενδιαιτημάτων χαμηλής βλάστησης από το taxon *P. t. ionicus* δίνει επιπλέον πιθανότητες σε αυτό το σενάριο. Εντούτοις, η κατεύθυνση της διασποράς δεν είναι εύκολο να διαπιστωθεί. Η ύπαρξη μεγάλης γενετικής ποικιλότητας για το taxon *P. t. ionicus* εντός της Πελοποννήσου, αλλά και η ύπαρξη της αποκλίνουσας εξελικτικής γραμμής στην Καλαμάτα, δίνει περισσότερες πιθανότητες στο να έγινε η διασπορά του υποκλάδου  $e$  από τα νότια προς τα βόρεια. Σε αντίστοιχο συμπέρασμα διασποράς από την Πελοπόννησο προς τη Στερεά Ελλάδα και τη Δυτική ηπειρωτική Ελλάδα κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου έχουν καταλήξει και άλλες μελέτες στο παρελθόν (Klossa-Kilia et al., 2006; Parmakelis et al., 2008; Kotsakiozi et al., 2012; Psonis et al., 2015b). Η μεγάλη γεωγραφική κατανομή της εξελικτικής γραμμής στη δυτική ηπειρωτική Ελλάδα μπορεί να εξηγηθεί ως πρόσφατη απότομη εξάπλωση, όπως προτείνουν και οι δημογραφικές αναλύσεις, προσομοιάζοντας την περίπτωση της ευρείας εξάπλωσης προς τα βόρεια του taxon *P. t. tauricus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Μεσσηνία φαίνεται να αποτελεί διακριτό παγετωνικό καταφύγιο μιας η ύπαρξη διακριτής εξελικτικής γραμμής σε σχέση με την υπόλοιπη κατανομή σε Πελοπόννησο και δυτική Ελλάδα έχει παρατηρηθεί και στο είδος νερόφιδου *Natrix tessellata* (Guicking et al., 2009).

## 5.2. Φυλογεωγραφικά Πρότυπα

Σύμφωνα με το χρονοφυλογενετικό δέντρο των πέντε γενετικών τόπων (Εικ. 6.9) η διαφοροποίηση των *Podarcis* άρχισε να πραγματοποιείται πριν από 11,75 (HPD: 13,81 – 9,96) εκατομμύρια χρόνια. Αυτό έπεται χρονικά της φάσης ολοκλήρωσης της σύνδεσης του Αδριατικού-Απούλιου «ακρωτηρίου» με την Ευρασία στα ~14 – 15 εκατομμύρια χρόνια πριν (Steininger and Rögl, 1984). Η έντονη ορογενετική δραστηριότητα σε αυτή την περίοδο αποτελεί την πιθανότερη αιτία αρχικής διαφοροποίησης του γένους, με τη δημιουργία πιθανών βικαριανιστικών φραγμών ανάμεσα στους πληθυσμούς, οι οποίοι δεδομένης της δυτικοευρωπαϊκής καταγωγής του γένους (Oliverio et al., 2000), φαίνεται να αρχίζουν την εποίκιση της τότε Βαλκανικής χερσονήσου.

Στην παρούσα μελέτη η Βαλκανική ομάδα ειδών του γένους *Podarcis* εμφανίζεται τοπολογικά διακριτή, αλλά χωρίς υψηλή στατιστική υποστήριξη. Αυτό έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα της χρονοφυλογενετικής ανάλυσης, όπου η ομάδα αυτή δεν εμφανίζεται μονοφυλετική και ως εκ τούτου δεν γίνεται εκτίμηση του χρόνου απόσχισης μεταξύ των υποομάδων ειδών «*P. erhardii*» και «*P. tauricus*». Η ύπαρξη μονοφυλετικότητας υποδεικνύεται στα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών (Oliverio et al., 2000; Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d), αλλά και από τα δεδομένα ddRADseq αν και με διαφορετικά σύνολα δεδομένων. Ωστόσο, σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις δεν συμπεριλαμβάνονται όλες οι ομάδες ειδών των *Podarcis* με αποτέλεσμα να μην είναι ξεκάθαρο εάν είναι όντως μονοφυλετική η Βαλκανική ομάδα ειδών. Σύμφωνα με τη χρονοφυλογενετική ανάλυση της παρούσας μελέτης (Εικ. 6.9) η διαφοροποίηση της κάθε μιας υποομάδας άρχισε μετά τα ~8,5 εκατομμύρια χρόνια. Συνεπώς με βάση τα παραπάνω, η απόσχιση μεταξύ των δύο υποομάδων πραγματοποιήθηκε πριν από ~11,75 με 8,5 εκ. χρόνια, τιμή που ταυτίζεται με την αντίστοιχη εκτίμηση στα 10,6 εκατομμύρια χρόνια προηγούμενων μελετών (Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d). Στα ~10,5 εκατομμύρια χρόνια ολοκληρώνεται ο σχηματισμός του λεγόμενου «Φράγματος του Αιγαίου» με διείσδυση της θάλασσας από την περιοχή ανάμεσα στην ανατολική

Κρήτη και τη δυτική Κάρπαθο, η οποία ξεκίνησε στα ~12 εκατομμύρια χρόνια πριν (Creutzburg, 1963; Dermitzakis and Papanikolaou, 1981). Η απουσία του γένους *Podarcis* από την Ανατολία και τα ανατολικά νησιά του Αιγαίου υποδηλώνει ότι η εξάπλωση του γένους στον χώρο των αντίστοιχων σημερινών νοτιών Βαλκανίων πιθανότατα συνέβη μετά τον σχηματισμό της αύλακας του Αιγαίου, δηλαδή μετά τα ~10,5 εκατομμύρια χρόνια πριν.

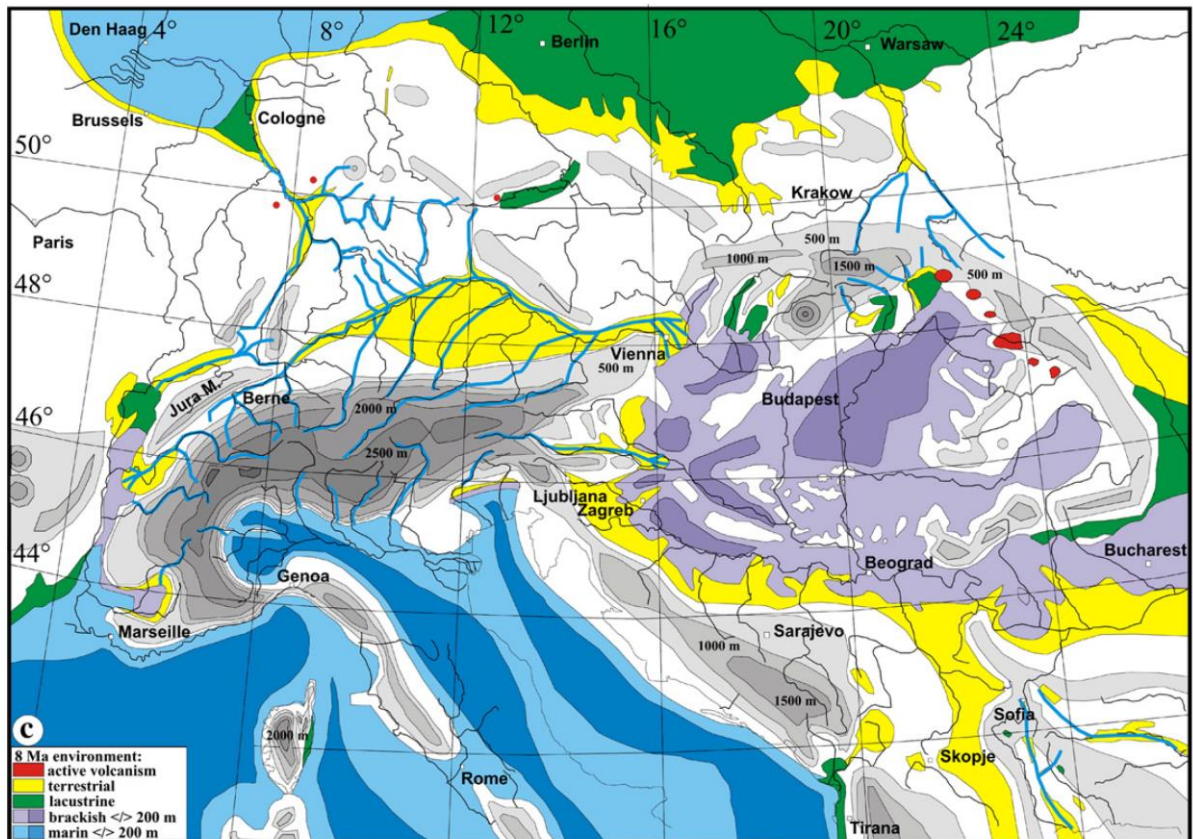
Προηγούμενες μελέτες (Oliverio et al., 2000; Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d), θέτουν την ύπαρξη ανταγωνισμού ως έναν από τους κύριους παράγοντες διαμόρφωσης της εξελικτικής ιστορίας των βαλκανικών *Podarcis* (Εικ. 6.8) και σε άμεση συνάρτηση με τον αριθμό και την ακολουθία των γεγονότων εποίκησης της βαλκανικής χερσονήσου. Σύμφωνα με τους Oliverio et al. (2000), το είδος *P. erhardii* θεωρείται το παλαιότερο είδος των *Podarcis* στον χώρο των Βαλκανίων με ευρύτερη κατανομή η οποία «επιλεκτικά» αντικαταστάθηκε από τα είδη *P. gaigeae* και *P. milensis* μόνο στις περιοχές των νησιωτικών συγκροτημάτων Σκύρου και Μήλου, αντίστοιχα. Ουσιαστικά, δηλαδή, προτείνουν μια αρχική εποίκηση από τον πρόγονο της υποομάδας ειδών «*P. erhardii*» και μια μεταγενέστερη από την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*», η οποία αντικαθιστά τοπικούς πληθυσμούς του πρώτου. Αντίθετα, μεταγενέστερες μελέτες (Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d) θεωρούν την πρώτη υπόθεση αρκετά εικολογική και επιλεκτική και προτείνουν η αρχική εποίκηση να έγινε από τον πρόγονο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» και στη συνέχεια η προγονική μορφή της υποομάδας «*P. erhardii*» να «εισβάλλει» στη βαλκανική χερσόνησο και να εκτοπίζει την πρώτη σε απομονωμένους πληθυσμούς, στις αντίστοιχες περιοχές που εντοπίζονται σήμερα τα μέλη της (περιοχές Σκύρου και Μήλου, παράλια Διναρίδων, ανατολική ηπειρωτική Ελλάδα, δυτική ηπειρωτική Ελλάδα/Πελοπόννησος/Ιόνιο), με κάποιες από αυτές να επανεποικίζουν τα Βαλκάνια.

Ένα δύσκολο προς απάντηση φυλογεωγραφικό ερώτημα είναι εάν οι δύο υποομάδες ειδών («*P. erhardii*» και «*P. tauricus*») εισήλθαν στον βαλκανικό χώρο ως μία ή ως δύο διακριτές φυλογενετικά ομάδες, κάτι που σχετίζεται εν μέρει με το αν είναι όντως

αδελφά taxa. Δεδομένης της οικολογικής διαφοροποίησης των δύο ομάδων, ένα επιπλέον ερώτημα αποτελεί το αν η οικολογική διαφοροποίηση ήταν η αιτία της φυλογενετικής διαφοροποίησης (άρα πρώτα οικολογική και μετά φυλογενετική διαφοροποίηση) ή όχι (ανεξαρτησία μεταξύ φυλογενετικής και οικολογικής διαφοροποίησης). Ωστόσο, το δεύτερο ερώτημα έχει άμεση σχέση με το εάν υπήρχε ανταγωνισμός μεταξύ των υποομάδων που οδήγησε στην οικολογική διαφοροποίηση και εντέλει με το ποια υποομάδα εισήλθε πρώτη στα Βαλκάνια. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ όλων αυτών των ερωτημάτων, η οποία δημιουργεί πολλαπλές υποπεριπτώσεις υποθετικών σεναρίων. Δεδομένης της έλλειψης σαφούς γνώσης όσον αφορά τις προγονικές κατανομές, την ύπαρξη ή όχι ανταγωνισμού, τη μονοφυλετικότητα των Βαλκανικών *Podarcis* κ.ο.κ., η προσπάθεια ανάπτυξης όλων των πιθανών σεναρίων, αν και ενδιαφέρουσα, ξεφεύγει από τον σκοπό της παρούσας μελέτης. Θα γίνει μια προσπάθεια λοιπόν να παρουσιαστεί η εξελικτική ιστορία μόνο για την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*», αποφεύγοντας εικασίες και επικεντρώνοντας σε σενάρια που μπορούν να εξηγηθούν με τα δεδομένα που έχουμε στη διάθεσή μας.

Η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» άρχισε τη διαφοροποίησή της στα 7,47 (HPD: 7,96 - 5,18) εκατομμύρια χρόνια με την απόσχιση του *P. melisellensis*, ενώ η διαφοροποίηση των υπολοίπων taxa της υποομάδας πραγματοποιείται λίγο αργότερα, στη χρονική περίοδο 6,52 - 5,44 εκατομμύρια χρόνια πριν. Η σημερινή κατανομή του νοτιότερου taxon (*P. t. ionicus*) στη νότια Πελοπόννησο, αλλά όχι στην Κρήτη, μπορεί να οφείλεται στο ότι α) η εποίκιση της τότε περιοχής της Πελοποννήσου έγινε μετά την απομόνωση της Κρήτης από την Πελοπόννησο (μετά τα 5,33 εκατομμύρια χρόνια), β) η υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» εποίκισε την Κρήτη αλλά στη συνέχεια εξαφανίστηκε, γ) κάποιος οικολογικός φραγμός (π.χ. απουσία κατάλληλων ενδιαιτημάτων) δεν επέτρεψε στην υποομάδα αυτή να φτάσει στην Κρήτη. Το ποια από τις τρεις αυτές υποθέσεις ισχύει είναι σχεδόν αδύνατο να απαντηθεί με τα στοιχεία που υπάρχουν αυτή τη στιγμή στη διάθεσή μας (π.χ. έλλειψη δεδομένων απολιθωμάτων).

Όπως προαναφέρθηκε, η εξελικτική ιστορία της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» ξεκινά με την απόσχιση του είδους *P. melisellensis* (Εικ. 6.9). Η αποκλειστική παρουσία του είδους στα παράλια των Διναρίδων υποδηλώνει την παραπάνω διαφοροποίηση σε αυτήν την περιοχή. Οι Διναρίδες άρχισαν να ανυψώνονται κατά μήκος των τότε Δαλματικών ακτών στη διάρκεια του Μέσου Μειοκαίνου και, όπως φαίνεται από τον παλαιογεωγραφικό χάρτη της Εικόνας 6.20 (Kuhlemann, 2007), στα ~8 εκατομμύρια χρόνια έχουν διαμορφωθεί σε τέτοιο βαθμό που να αποτελούν πιθανό βιογεωγραφικό φράγμα. Εναλλακτικά, η απομόνωση του προγονικού πληθυσμού του είδους *P. melisellensis* θα μπορούσε να οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των υποομάδων «*P. erhardii*» και «*P. tauricus*», όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται στο δημοσιευμένο φυλογεωγραφικό σενάριο (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005c; Poulakakis et al., 2005d) της Εικόνας 6.8. Δεν αποκλείεται, ωστόσο, και οι δύο παραπάνω παράγοντες να έδρασαν συνεργατικά. Η απόκλιση των τριών φυλογενετικών υποκλάδων του είδους υπολογίζεται στην παρούσα μελέτη στα 3,40 (HPD: 4.58 – 2.37) εκατομμύρια χρόνια πριν (Πλειόκαινο) (Συμπλ. Εικ. Σ8, Παράρτημα III). Η εκτίμηση αυτή δεν είναι σύμφωνη με αυτή προηγούμενης μελέτης (Podnar et al., 2004), στην οποία η εκτιμώμενη χρονική περίοδος απόσχισης των υποκλάδων είναι 1,2 – 1,9 χρόνια (δεν παρέχεται απόκλιση). Ωστόσο, στην προηγούμενη μελέτη η εκτίμηση έγινε βάσει ρυθμού εξέλιξης που υπολογίστηκε από δεδομένα άλλων αντιπροσώπων της οικογένειας Lacertidae και όχι βάσει σημείων βαθμονόμησης, όπως πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Εντούτοις, τα συμπεράσματα της παραπάνω μελέτης δεν αναιρούνται σε μεγάλο βαθμό. Φαίνεται λοιπόν ότι η σταδιακή άνοδος της στάθμης της θάλασσας από το Πλειόκαινο έως στο τέλος του Πλειστοκαίνου (De Giuli et al., 1987) αποτέλεσε την αιτία διαφοροποίησης των τριών υποκλάδων του είδους, ενώ η διαφοροποίηση εντός κάθε υποκλάδου οφείλεται κυρίως στις διακυμάνσεις της στάθμης της θάλασσας κατά τη διάρκεια των παγετωδών – μεσοπαγετωδών περιόδων του Πλειστοκαίνου με την πιθανή ύπαρξη παγετωνικών καταφυγίων κατά τη Βούρμιο παγετώδη περίοδο (Würm), πριν από 70.000 – 18.000 χρόνια.



Εικόνα. 6.20. Παλαιογεωγραφικός χάρτης της κεντρικής νότιας Ευρώπης και των δυτικών Βαλκανίων κατά την περίοδο του Ανώτερου Μειόκαινου (~8 εκατομμύρια χρόνια πριν) (Kuhlemann, 2007).

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των υπόλοιπων ειδών (Εικ. 6.9) παραμένουν άλυτες με βάση τα Sanger δεδομένα προσθέτοντας επιπλέον δυσκολία στη διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας της εξεταζόμενης υποομάδας ειδών, αφού δεν είναι δυνατή η εξακρίβωση της ακολουθίας των γεγονότων διαφοροποίησης. Ο μεγάλος αριθμός των πιθανών σεναρίων που ταιριάζουν με όλες τις δυνατές τοπολογίες, δεν επιτρέπει την αξιολόγηση όλων των εναλλακτικών υποθέσεων. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η τοπολογία που προτείνεται από τα ddRADseq δεδομένα, σύμφωνα με την οποία τα υπόλοιπα είδη της ομάδας διαφοροποιούνται με την εξής σειρά: πρώτα το είδος *P. milensis*, μετά το είδος *P. gaigeae* και ύστερα τα αδελφά taxa *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus*/*P. t. thasopulae*.



Κατά τη διάρκεια του Μέσου Μειοκαινού, μετά το σχηματισμό του «Φράγματος του Αιγαίου» και έως την έναρξη της «κρίσης αλατότητας» του Μεσσηνίου (Εικόνα 6.5), δηλαδή στο διάστημα ~9 με 7 εκατομμύρια χρόνια πριν, η νότια Ελλάδα αποτελούνταν από δύο μεγάλες χερσονήσους. Η μία βρισκόταν νοτιοδυτικά, εκεί που στη σημερινή εποχή βρίσκονται οι περιοχές της Πελοποννήσου και της Κρήτης, και η δεύτερη στα νοτιοανατολικά, η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή της Αττικής και των Κυκλάδων. Ωστόσο, η θέση των δύο αυτών χερσονήσων θα πρέπει να βρισκόταν αρκετά βορειότερα την περίοδο εκείνη λόγω της κίνησης του Αιγαιακού τόξου (Εικ. 6.6), με αυτή της Αττικής-Κυκλάδων στο ύψος της σημερινής νότιας Εύβοιας και αυτή της Πελοποννήσου και Κρήτης στο ύψος του σημερινού κορινθιακού κόλπου.

Όπως προαναφέρθηκε, μετά την απόσχιση του *P. melisellensis* η διαφοροποίηση των υπόλοιπων taxa της υποομάδας φαίνεται να πραγματοποιείται στη χρονική περίοδο 6,52 - 5,44 (HPD: 7,96 - 4,08) εκατομμύρια χρόνια πριν (Εικ. 6.9). Η εκτίμηση αυτή συμπίπτει με παλιότερες εκτιμήσεις (Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d). Η είσοδος της υποομάδας στα νότια Βαλκάνια επομένως υπολογίζεται ανάμεσα στα ~ 10,5 (ολοκλήρωση του φράγματος του Αιγαίου) με ~7 εκατομμύρια χρόνια πριν. Σε αυτό το σημείο δημιουργείται το φυλογεωγραφικό ερώτημα της διαδρομής που ακολουθήθηκε όσον αφορά την κατεύθυνση ανατολικά ή δυτικά των Διναρίδων και Εξωτερικών Ελληνίδων οροσειρών (ή προς και τις δύο κατευθύνσεις). Οι οροσειρές αυτές, αλλά και η ζώνη Βαρδουσιών - Παρνασσού, πιθανώς αποτέλεσαν σημαντικό εμπόδιο στη διασπορά προς τα νότια Βαλκάνια και τις δύο προαναφερόμενες χερσονήσους. Σίγουρα όμως έδρασαν και εξακολουθούν να δρουν ως φράγματα από τη δυτική Ελλάδα και Αλβανία προς την ανατολική Ελλάδα και τα λοιπά Βαλκάνια, όπως προαναφέρθηκε στο εισαγωγικό Πρώτο Κεφάλαιο. Επιχειρήματα υπέρ και κατά της επιλογής της μίας ή της άλλης (ή και των δύο ταυτόχρονα) διαδρομών μπορούν να δοθούν δίχως όμως να είναι δυνατή η σαφής και οριστική απάντηση. Ανεξάρτητα όμως της διαδρομής, με βάση τη σημερινή κατανομή της υποομάδας «*P. tauricus*» και σύμφωνα με το χρονοφυλογενετικό δέντρο, πριν από ~10 με 7 εκατομμύρια έτη ο πρόγονος της υποομάδας θα πρέπει να είχε

αποικίσει τμήματα ή όλη την ηπειρωτική Ελλάδα καθώς και τμήματα ή και ολόκληρες τις δύο παραπάνω χερσονήσους. Η ακριβής κατανομή είναι δύσκολο να προσδιοριστεί αφού σχετίζεται άμεσα με την ύπαρξη ή όχι ανταγωνισμού μεταξύ των υποομάδων ειδών «*P. erhardii*» και «*P. tauricus*».

Βάσει του σεναρίου απουσίας ανταγωνισμού (και άρα προϋπάρχουσας οικολογικής διαφοροποίησης μεταξύ των προγόνων των υποομάδων) τα γεγονότα που οδήγησαν στην απομόνωση των πληθυσμών του προγόνου της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» οφείλονται μόνο σε ιστορικούς και οικολογικούς φραγμούς. Όπως φαίνεται από δεδομένα στρωματογραφίας (Decima and Wezel, 1973), βαθμιαίες τροποποιήσεις στην ανταλλαγή όγκων νερού μεταξύ του Ατλαντικού Ωκεανού και της Μεσογείου Θάλασσας, οι οποίες προκάλεσαν μεγάλες παλαιοκεανογραφικές αλλαγές (Krijgsman et al., 1999), υπήρξαν πριν από την έναρξη της «Κρίσης Αλατότητας» στα ~6 εκατομμύρια χρόνια (Hsü, 1972; Kenneth et al., 1977; Krijgsman et al., 1999; Jolivet et al., 2006) και τις αλληπάληλες περιοδικές εξατμίσεις της Μεσογείου μέχρι τα 5,3 εκατομμύρια χρόνια. Αυτά τα γεγονότα να μεν μπορεί να δημιουργήσαν φαινομενικές ευκαιρίες διασποράς προς τη χερσόνησο των Κυκλάδων με την ύπαρξη γεφυρών ξηράς, ωστόσο για ένα υγρόφιλο σχετικά taxon όπως αυτό της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», οι μεγάλες θερμοκρασίες που πιθανώς δημιουργήθηκαν, σε συνέργεια με την πιθανή έλλειψη κατάλληλων ενδιαιτημάτων, να λειτούργησαν αποτρεπτικά. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήγει κανείς λαμβάνοντας υπόψιν και την απουσία του taxon από τις ξηρές περιοχές της ανατολικής Αττικής και της Ευβοίας, όπου δεν παρατηρούνται λιβαδικές εκτάσεις. Αντίθετα, για την ξηρόφιλη υποομάδα *P. erhardii* οι συνθήκες αυτές μπορεί να ήταν οι κατάλληλες για την εξάπλωση σε όλη την τότε κυκλαδική μάζα. Η απουσία από την περιοχή της Μήλου μπορεί να ήταν είτε στοχαστική είτε λόγω φραγμού διασποράς, αφού το είδος *P. erhardii* δεν παρατηρείται ανατολικά ή νότια της Μήλου, παρά μόνο δυτικά (συγκροτήματα Σίφνου - Φολεγάνδρου). Πιθανώς οι αλλαγές στη βλάστηση και στις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά το διάστημα ~7 με 6 εκατομμύρια χρόνια (οικολογικά φράγματα) και η απότομη διεύδυση της θάλασσας που σηματοδοτεί τη λήξη της

παραπάνω περιόδου στα 5,3 εκατομμύρια χρόνια (βικαριανιστικά φράγματα), να αποτέλεσαν τις τελικές αιτίες απομόνωσης των ειδών. Η σταδιακή απομόνωση με αυτόν τον τρόπο, κατά σειρά, των περιοχών του συγκροτήματος της Μήλου (ενιαία μάζα ξηράς), της Σκύρου (ενιαία μάζα ξηράς) και της Πελοποννήσου/δυτικής ηπειρωτικής Ελλάδας από την ανατολική ηπειρωτική Ελλάδα οδήγησαν στην εξέλιξη των πληθυσμών αυτών στα taxa *P. milensis*, *P. gaigeae*, *P. t. ionicus* και *P. tauricus*/*P. thasopulae*, αντίστοιχα. Η λήξη της κρίσης αλατότητας έχει επίσης θεωρηθεί η αιτία απομόνωσης των νησιωτικών (κυρίως των κυκλαδικών) πληθυσμών από αυτούς της ηπειρωτικής Ελλάδας για αρκετά είδη της ευρύτερης περιοχής του Αιγαίου, όπως για παράδειγμα για τη σαύρα *Ablepharus kitaibelii* (Skourtanioti et al., 2016), τη σαύρα *P. erhardii* (Roulakakis et al., 2005d) και το (υπο)γένος σαλιγκαριών *Thiessea* (Psonis et al., 2015b).

Βάσει της υπόθεσης ανταγωνισμού, όπως προτείνεται από το υπάρχον φυλογεωγραφικό σενάριο (Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d) της Εικόνας 6.8, ο πρόγονος της υποομάδας είχε αποικίσει το μεγαλύτερο μέρος της ηπειρωτικής Ελλάδας και των δυο χερσονήσων όταν η είσοδος του προγόνου της υποομάδας ειδών «*P. erhardii*» εκτόπισε μέσω ανταγωνισμού τον πρόγονο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» σε απομονωμένους πληθυσμούς (α) στην περιοχή της Μήλου, (β) στην περιοχή της Σκύρου, (γ) στις Δαλματικές ακτές, (δ) κάπου στην ηπειρωτική Ελλάδα και λοιπά Βαλκάνια ανατολικά των εξωτερικών Ελληνίδων, και (ε) βάσει των δεδομένων της παρούσας μελέτης, κάπου στα δυτικά των Εξωτερικών Ελληνίδων (πιθανώς στην τότε περιοχή της βορειοδυτικής Ελλάδας και νοτιοδυτικής Αλβανίας / δυτικής Στερεάς Ελλάδας / Επτανήσων) όπου δεν παρατηρείται αντιπρόσωπος της υποομάδας *P. erhardii*). Η απόσχιση του είδους *P. erhardii* (χερσονήσος Αττικής - Κυκλάδων) από τα υπόλοιπα είδη (χερσονήσος Πελοποννήσου - Κρήτης) της ομώνυμης υποομάδας στα ~8,7 εκατομμύρια έτη πριν υποδηλώνει την πιθανή παρουσία της υποομάδας αυτής στις παραπάνω περιοχές ήδη στα ~9 εκατομμύρια χρόνια πριν. Αυτό συνεπάγεται ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ των υποομάδων είχε αρχίσει από τότε και σίγουρα υπήρχε έως ένα βαθμό και μέχρι τα γεγονότα του Μεσσηνίου. Η σχετική αρχική απομόνωση λόγω

ανταγωνισμού στις παραπάνω περιοχές, παράλληλα με τα γεγονότα του Μεσσηνίου που προαναφέρθηκαν, θα μπορούσε να αποτελεί την αιτία της τελικής απομόνωσης των πληθυσμών του προγόνου της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Επομένως, η οικολογική διαφοροποίηση μεταξύ των υποομάδων αναμένεται να συνέβη βαθμιαία στο διάστημα ~9 με 5,3 εκατομμύρια χρόνια πριν.

Για το νησιωτικό συγκρότημα της Μήλου, η παλαιογεωγραφία δεν είναι ξεκάθαρη για το πότε απομονώθηκε από τα υπόλοιπα νησιά των Κυκλάδων, ωστόσο φαίνεται να έγινε μετά το τέλος της κρίσης του Μεσσηνίου (Εικ. 6.5). Με εξαίρεση πιθανώς τις νησίδες, τα νησιά του παραπάνω συγκροτήματος περιλαμβάνουν κατάλληλα ενδιαιτήματα και για τις δύο υποομάδες ειδών, ωστόσο το είδος *P. milensis* φαίνεται να εξακολουθεί να προτιμά τα χαμηλά μακί, τις επίπεδες επιφάνειες βράχων, τις αμμοθίνες, τις καλλιέργειες και τα ξέφωτα, αφήνοντας σχετικά ελεύθερα τα πιθανά μικροενδιαιτήματα του *P. erhardii*. Αυτό δείχνει ότι πιθανότατα τα δύο συγκροτήματα ήταν απομονωμένα ακόμα και κατά τη διάρκεια των παγετωδών περιόδων του Πλειστοκαίνου όταν για παράδειγμα πολλά κυκλαδίτικα νησιά συνενώθηκαν λόγω της πτώσης της στάθμης της θάλασσας που έφτασε μέχρι και 120 μέτρα χαμηλότερα από σήμερα (π.χ. Lambeck, 1996). Το νησιωτικό συγκρότημα της Σκύρου δε φαίνεται να επανενώθηκε με την ηπειρωτική περιοχή (Dermitzakis, 1989, 1990), ενώ με βάση και την ηλικία απόσχισης του είδους *P. gaigeae*, η υπόθεση ότι το συγκρότημα της Σκύρου βυθίστηκε πριν από 2 εκατομμύρια χρόνια (Creutzburg, 1963) δεν υποστηρίζεται.

Ο διαχωρισμός των φυλογενετικών κλάδων *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae* φαίνεται να αποτέλεσε το τελευταίο γεγονός διαφοροποίησης εντός της υπομελέτης υποομάδας σύμφωνα με το φυλογενωμικό δέντρο. Καίριο ερώτημα αποτελεί το ποια ήταν πιθανώς η τότε εξάπλωσή τους στον ηπειρωτικό χώρο. Δεδομένης της διαφοροποίησης των πληθυσμών της Στερεάς Ελλάδας και των νότιων Επτανήσων του taxon *P. t. ionicus* από αυτούς της Πελοποννήσου στα 3,8 εκατομμύρια χρόνια πριν, περίπου 1,5 εκατομμύρια χρόνια μετά τη λήξη της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου, η εξάπλωση του taxon φαίνεται να περιλάμβανε τις περιοχές αυτές. Να σημειωθεί ότι μόνο

για την περίπτωση του σεναρίου ύπαρξης ανταγωνισμού, η εξάπλωση στην Πελοπόννησο από τον απομονωμένο πληθυσμό της τότε περιοχής της βορειοδυτικής Ελλάδας και νοτιοδυτικής Αλβανίας / δυτικής Στερεάς Ελλάδας / Επτανήσων θα πρέπει να έγινε αφού πραγματοποιήθηκε μερική η ολική οικολογική διαφοροποίηση μεταξύ των υποομάδων ώστε να είναι δυνατή η συντοπικότητα μεταξύ *P. t. tauricus* και *P. peloropnesiacus*. Όσον αφορά την εξάπλωση ανατολικά από τις Εξωτερικές Ελληνίδες της ηπειρωτικής Ελλάδας, αυτό είναι δύσκολο να απαντηθεί. Σίγουρα κατανέμονταν στην περιοχή της Ελλάδας αφού αποτελεί συγγενικό taxon του *P. gaigeae*. Πιθανώς το taxon να κατανεμόταν σε κάποιες από τις περιοχές βορειότερα από την Ελλάδα που απαντάται σήμερα, ωστόσο δεν υπάρχει κάποια επιπλέον πληροφορία (π.χ. απολίθωμα) που να βοηθά στην αποσαφήνιση του παραπάνω θέματος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η εξελικτική ιστορία του taxon *P. t. ionicus* ξεκινά λοιπόν μετά την απομόνωση της Πελοποννήσου από την Κρήτη και τη Στερεά Ελλάδα πριν από ~ 5,5 και 5,5-3,5 εκατομμύρια χρόνια, αντίστοιχα. Η απομόνωση της Πελοποννήσου από την Κρήτη ήταν μόνιμη και παραμένει μέχρι και σήμερα, ενώ με τη Στερεά Ελλάδα διήρκεσε περίπου δύο εκατομμύρια χρόνια (Creutzburg, 1963). Όπως φαίνεται στην Εικ. 6.5, στα 3,5 εκατομμύρια χρόνια πριν η Πελοπόννησος έχει μειωθεί πολύ σε μέγεθος, με τις σημερινές ορεινές περιοχές να αποτελούν την μη καταβυθισμένη επιφάνεια. Σύμφωνα με τον Creutzburg (1963), μετά τα πρώτα ρήγματα στον Κορινθιακό κόλπο και βόρεια της Κρήτης που απομόνωσαν την Πελοπόννησο στα ~5,5 με 5 εκατομμύρια χρόνια πριν, αρχίζουν να εμφανίζονται τα ρήγματα στη δυτική Πελοπόννησο, όπως αυτό που χώρισε τη Ζάκυνθο από την Πελοπόννησο, καθώς και αυτά που δημιούργησαν τον Μεσσηνιακό και τον Λακωνικό κόλπο. Οι περιοχές που σήμερα είναι πεδιάδες (π.χ. δυτική Μεσσηνία, Ηλεία, δυτική Αχαΐα, βόρεια Κορινθία) την περίοδο εκείνη είναι βυθισμένες, ενώ την ίδια περίοδο παρατηρούνται και ορογενετικές κινήσεις (Νεοαλπικές Πτυχώσεις) που δημιουργούν λίμνες. Η παραπάνω περίοδος συμπίπτει με την περίοδο διαφοροποίησης εντός του taxon *P. t. ionicus* στο διάστημα 3,8 - 2,48 (HPD: 4,78 - 1,66) (Εικ. 6.9). Η απομόνωση της Πελοποννήσου από

την υπόλοιπη ηπειρωτική χώρα έχει θεωρηθεί αιτία διαφοροποίησης για αρκετά άλλα είδη, όπως για παράδειγμα η σαύρα *P. peloponnesiacus* (Poulakakis et al., 2005d), η σαύρα *Lacerta trilineata* (Sagonas et al., 2014), το μικροθηλαστικό *Talpa stankovici* (Tryfonopoulos et al., 2010), το γένος σαλιγκαριών *Codringtonia* (Kotsakiozi et al., 2012) και το (υπο)γένος σαλιγκαριών *Josephinella* (Psonis et al., 2015b). Σύμφωνα με το χρονοφυλογενετικό δέντρο, οι υποκλάδοι *a* και *b* που κατανέμονται στα νότια Επτάνησα και δυτική Στερεά Ελλάδα, αντίστοιχα, αποτελούν αδελφά taxa, τα οποία διαφοροποιούνται ως ζεύγος από τα υπόλοιπα πριν από 3,8 εκατομμύρια χρόνια (HPD: 4,78 – 2,92), ενώ μεταξύ τους πριν από 2,48 εκατομμύρια χρόνια (HPD: 3,41 – 1,66) (Εικ. 6.9). Η τοπολογία αυτή δείχνει ότι πρώτα απομονώθηκαν τα νότια Επτάνησα από την Πελοπόννησο και μετά από τη Στερεά Ελλάδα, κάτι που επιβεβαιώνεται από παλαιογεωγραφικά δεδομένα (Zelilidis et al., 1998). Ο διαχωρισμός των νήσων Ζακύνθου και Κεφαλονιάς στο Μέσο Πλειστόκαινο προκάλεσε και την απόσχιση στα 690.000 (HPD: 1.150.000 – 310.000) χρόνια πριν που παρατηρείται ανάμεσα στις δύο εξελικτικές γραμμές των δυο νησιών. Η διαφοροποίηση των υπόλοιπων τριών υποκλάδων του taxon *P. t. ionicus* φαίνεται να έγινε γύρω στα τρία εκατομμύρια χρόνια πριν (Εικ. 6.9). Η ηλικία αυτή συμπίπτει με το διάστημα που η Πελοπόννησος είχε συρρικνωθεί και πιθανότατα οι πρόποδες και τα οροπέδια των βουνών να αποτέλεσαν βιογεωγραφικά καταφύγια για τους τρεις παραπάνω φυλογενετικούς υποκλάδους. Ο υποκλάδος *c* φαίνεται να απομονώθηκε στην περιοχή ανάμεσα στα Αροάνια όρη (ή όρος Χελμός), ενώ ο υποκλάδος *d* γύρω από τα όρη Μαίναλο και Πάρνωνα. Ο υποκλάδος *e*, αν και κατανέμεται στη δυτική Πελοπόννησο, τη βορειοδυτική ηπειρωτική Ελλάδα και νοτιοδυτική Αλβανία, φαίνεται από την απομονωμένη εξελικτική γραμμή της Καλαμάτας ότι η προγονική κατανομή του βρισκόταν στην Πελοπόννησο. Οι Βαλαχικές ορογενετικές κινήσεις κατά τη διάρκεια της Κατώτερου Πλειστοκαίνου προκάλεσαν τη δημιουργία των μεγάλων πεδιάδων της δυτικής και βορειοδυτικής Πελοποννήσου (Creutzburg, 1963) και πιθανώς οδήγησαν στην επέκταση του υποκλάδου *e* προς αυτήν την κατεύθυνση. Η απόσχιση μεταξύ των δύο εξελικτικών γραμμών του υποκλάδου *e* εκτιμήθηκε ότι πραγματοποιήθηκε πριν από

1,13 εκατομμύρια χρόνια (HPD: 1,73 – 0,61) (Συμπλ. Εικ. Σ8, Παράρτημα ΙΙΙ). Τέλος, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η διασπορά του υποκλάδου *e* από την Πελοπόννησο στη Στερεά Ελλάδα πιθανότατα έγινε στο Ανώτερο Πλειστόκαινο κατά τη διάρκεια κάποιας ή κάποιων παγετωδών περιόδων λόγω πτώσης της στάθμης της θάλασσας και δημιουργίας γεφυρών ξηράς, ενώ η επέκταση προς τη βορειοδυτική Ελλάδα και την Αλβανία έγινε κατά τη διάρκεια ενός ή περισσότερων μεσοπαγετωδών περιόδων λόγω της δημιουργίας κατάλληλων συνθηκών, ή μέσα στο Ολόκαινο μετά το LGM. Η σημερινή κατανομή του υποκλάδου *e* στην Αλβανία είναι επικαλυπτόμενη με αυτή του είδους *P. melisellensis* (υποκλάδος *fiumana*) στην περιοχή βορειοδυτικά των Τιράνων.

### 5.3. Σύγκριση φυλογεωγραφίας με άλλα ερπετά/αμφίβια

Υπάρχουν αρκετά χαρακτηριστικά παραδείγματα ερπετών και αμφιβίων τα οποία έχουν παρόμοια κατανομή (ή τμήματα κοινής κατανομής) με την υποομάδα ειδών «*P. tauricus*» και για τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί φυλογενετικές/φυλογεωγραφικές μελέτες, όπως για παράδειγμα το γένος *Anguis* (Gvoždík et al., 2010; Thanou et al., 2014; Jablonski et al., 2016), είδη της υποομάδας ειδών «*P. erhardii*» (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005d), είδη του γένους *Lacerta* (Mayer and Beyerlein, 2001; Sagonas et al., 2014; Marzahn et al., 2016), το είδος *Ablepharus kitaibelli* (Poulakakis et al., 2005b; Skourtanioti et al., 2016), είδη του γένους *Pelophylax* (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010), είδη του γένους *Vipera* (Ursenbacher et al., 2008; Ferchaud et al., 2012) και το είδος *Natrix tessellata* (Guicking et al., 2009). Βικαριανιστικά γεγονότα του παρελθόντος αναμένεται να έχουν επηρεάσει με παρόμοιο τρόπο την εξελικτική ιστορία των ερπετών και αμφιβίων στα νότια Βαλκάνια. Αντίθετα, κλιματικές διακυμάνσεις αναμένεται να μην επηρέασαν με τον ίδιο τρόπο είδη που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές οικολογικές προτιμήσεις. Επιπλέον οι Διναρίδες και οι εξωτερικές Ελληνίδες της ηπειρωτικής Ελλάδας φαίνεται να έχουν δράσει και να εξακολουθούν να δρουν ως βιογεωγραφικά φράγματα για αρκετά ερπετά και αμφίβια. Η επίδραση του φράγματος αυτού στο γένος *Lacerta* έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση των ειδών *L. viridis* και *L. billineata* ανατολικά και δυτικά, αντίστοιχα, καθώς και του υποείδους *L. trilineata major* δυτικά του φράγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα υποείδη (Mayer and Beyerlein, 2001; Sagonas et al., 2014; Marzahn et al., 2016). Η επίδραση στο γένος *Pelophylax* οδήγησε στην απομόνωση του είδους *P. epiroticus* σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη στα δυτικά (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010), ενώ το ίδιο ισχύει και με το *P. shqipericus* με βάση την κατανομή του, για το οποίο όμως δεν έχει γίνει κάποια μελέτη ακόμα. Το είδος *Vipera ammodytes* επίσης φαίνεται να έχει επηρεαστεί μιας και στην ηπειρωτική Ελλάδα απαντώνται δύο φυλογενετικοί κλάδοι δυτικά και ανατολικά της Πίνδου (Ursenbacher et al., 2008; Ferchaud et al., 2012). Τέλος, τα είδη *Natrix tessellata* (Guicking et al., 2009) και



*N. natrix* (Kindler et al., 2013) εμφανίζουν και αυτά διακριτούς κλάδους στη δυτική ηπειρωτική Ελλάδα και Πελοπόννησο.

Όπως προαναφέρθηκε, τα πλέον σημαντικά βικαριανιστικά γεγονότα όσο αφορά την εξελικτική ιστορία της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» ήταν η κρίση της αλατότητας του Μεσσηνίου ύστερα από την οποία συνέβη η διαφοροποίηση της πλειονότητας των κύριων εξελικτικών κλάδων της υποομάδας, καθώς και τα τεκτονικά γεγονότα που προκάλεσαν άνοδο της στάθμης της θάλασσας πριν 4-3 εκατομμύρια χρόνια, η οποία προκάλεσε την απομόνωση και διαφοροποίηση εντός του taxon *P. t. ionicus* και εντός του είδους *P. melisellensis*. Το πρώτο γεγονός θεωρείται αιτία διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών του Αιγαίου και των αντίστοιχων της ηπειρωτικής Ελλάδας για το είδος *P. erhardii* (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005d). Εντός του είδους *Vipera ammodytes* εμφανίζονται ως διακριτοί κλάδοι οι πληθυσμοί των Κυκλάδων, της Πελοποννήσου και της ηπειρωτικής Ελλάδας με το χρόνο απόκλισης όμως να εκτιμάται αρκετά αργότερα της λήξης της κρίσης της αλατότητας, στα 4-3 εκατομμύρια χρόνια πριν (Ursenbacher et al., 2008). Ωστόσο, η μεθοδολογία της χρονολόγησης στην παραπάνω εργασία ενδέχεται να περιέχει σφάλματα όσο αφορά τα σημεία βαθμονόμησης. Τέλος, οι πληθυσμοί των ανατολικών Κυκλάδων του είδους *Lacerta trilineata* (*L. t. citrovittata*) εμφανίζονται αρκετά απομακρυσμένοι φυλογενετικά σε σχέση με αυτούς της ηπειρωτικής Ελλάδας και των δυτικών Κυκλάδων, αλλά και της Πελοποννήσου (Sagonas et al., 2014). Εντούτοις, η διαφοροποίηση που παρατηρείται φαίνεται να οφείλεται σε παλαιότερο παλαιογεωγραφικό γεγονός (σχηματισμός του φράγματος του Αιγαίου στα ~12-9 εκατομμύρια χρόνια πριν). Αντίθετα, η διαφοροποίηση των πληθυσμών της Πελοποννήσου από αυτούς της ηπειρωτικής Ελλάδας φαίνεται να οφείλονται στο παραπάνω παλαιογεωγραφικό γεγονός (Sagonas et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προηγούμενης εργασίας το υποείδος *L. t. hanssweizeri* που ενδημεί στη Μήλο δεν αποτελεί παλαιοενδημικό είδος όπως το *P. milensis*, αλλά προϊόν πρόσφατης διαφοροποίησης, ενώ οι πληθυσμοί του υποείδους *L. t. trilineata* της Σκύρου εμφανίζονται σχεδόν αδιαφοροποίητα σε σχέση με πληθυσμούς της ηπειρωτικής

Ελλάδας, σε αντίθεση δηλαδή με τη μεγάλη εξελικτική απόκλιση του είδους *P. gaigeae*. Το ίδιο πρότυπο πρόσφατης διαφοροποίησης εμφανίζεται να ισχύει και για άλλα είδη ερπετών και αμφιβίων των Κυκλάδων και των Σποράδων όπως το είδος *Ablepharus kitaibelli* (Poulakakis et al., 2005b; Skourtanioti et al., 2016) και το *Pelophylax kurtmuelleri* (Lymberakis et al., 2007), αντίστοιχα. Το δεύτερο παλαιογεωγραφικό γεγονός επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την Πελοπόννησο υποβυθίζοντας μεγάλες πεδινές εκτάσεις με τα βουνά να αποτελούν τις μόνες περιοχές επιβίωσης για πολλά είδη ζώων και φυτών. Οι φυλογενετικές/φυλογεωγραφικές μελέτες που αφορούν ερπετά και αμφίβια και συμπεριλαμβάνουν δείγματα από τη Πελοπόννησο δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση με την παρούσα μελέτη όσο αφορά την επίδραση του παραπάνω γεγονότος μιας και εμφανίζουν διάφορους περιορισμούς. Είτε περιλαμβάνουν λίγα δείγματα μη αντιπροσωπευτικά της κατανομής και της ποικιλότητας που αναμένεται όπως στην περίπτωση των ειδών *Ablepharus kitaibelli* (Poulakakis et al., 2005b; Skourtanioti et al., 2016), *Vipera ammodytes* (Ursenbacher et al., 2008), *Natrix tessellata* (Guicking et al., 2009), *Ophiomorus punctatissimus* (Poulakakis et al., 2008) και του γένους *Pelophylax* (Lymberakis et al., 2007), είτε δεν έχει γίνει χρονολόγηση όπως στην περίπτωση του είδους *Anguis graeca* (Thanou et al., 2014; Jablonski et al., 2016), είτε τέλος, δεν εμφανίζονται τιμές στατιστικής υποστήριξης στους εξωτερικούς κλάδους ώστε να είναι δυνατή η μελέτη των σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών της Πελοποννήσου όπως στην περίπτωση των ειδών *Lacerta trilineata* (Sagonas et al., 2014) και *Podarcis peloponnesiacus* (Poulakakis et al., 2005d). Τέλος, η επίδραση των παγετωδών-μεσοπαγετωδών περιόδων του Πλειστοκαίνου σε άλλα είδη ερπετών και αμφιβίων είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία παγετωνικών καταφυγίων στα νότια Βαλκάνια για αρκετά είδη ερπετών και αμφιβίων. Έτσι, πολλαπλά Πλειστοκαινικά καταφύγια ανιχνεύτηκαν στις Ελληνίδες, τα Καρπάθια Όρη και τις Δυναρίδες για τα είδη του γένους *Anguis* (Jablonski et al., 2016), τα είδη του γένους *Triturus* (Wielstra et al., 2013), το είδος *Vipera ursinii* (Zinenko et al., 2015), το είδος *Lacerta viridis* (Marzahn et al., 2016), το είδος *Podarcis muralis* (Salvi et al., 2013) και τα είδη *Dalmatolacerta oxyphela* και *Dinarolacerta mosorensis* (Podnar et al., 2014).

## 6. Συμπεράσματα

Συνοπτικά, το φυλογεωγραφικό σενάριο μπορεί να περιγραφεί σε μια σειρά σταδίων. Πριν από ~14-9 εκατομμύρια χρόνια γίνεται η αποίκηση των Βαλκανίων από την προγονική μορφή της υποομάδας «*P. tauricus*». Το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης συμβαίνει πριν από ~8-7 εκατομμύρια χρόνια με την απομόνωση του προγόνου του είδους *P. melisellensis*. Πριν από ~7-6 εκατομμύρια χρόνια, η κατανομή της υποομάδας περιλαμβάνει ολόκληρες τις περιοχές (ή τμήματα αυτών) της Πελοποννήσου, της ηπειρωτικής Ελλάδας (ανατολικά και δυτικά των Εξωτερικών Ελληνίδων), την περιοχή της Σκύρου και την περιοχή της Μήλου. Στα ~5-4 εκατομμύρια χρόνια, λόγω του τέλους της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου, συμβαίνει η οριστική απομόνωση των ανωτέρω περιοχών και η επακόλουθη διαφοροποίηση των απομονωμένων πληθυσμών στα taxa *P. milensis*, *P. gaiageae*, *P. t. ionicus* και *P. t. tauricus* / *P. t. thasopulae*. Ακολουθεί η διαφοροποίηση του είδους *P. melisellensis* και του taxon *P. t. ionicus* στους υποκλάδους τους πριν από ~4-3 εκατομμύρια χρόνια. Στο διάστημα ~2,5-0,018 εκατομμύρια χρόνια πριν η επίδραση των πλειστοκαινικών παγετωδών και μεσοπαγετωδών περιόδων είναι έντονη διαμορφώνοντας σε μεγάλο βαθμό τη σημερινή γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών. Μετά το τέλος της τελευταίας παγετώδους περιόδου (~18.000 χρόνια πριν) και μέχρι σήμερα οι πληθυσμοί αρχίζουν και εξαπλώνονται σταδιακά, ιδιαίτερα προς τα βόρεια των κατανομών τους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ

---

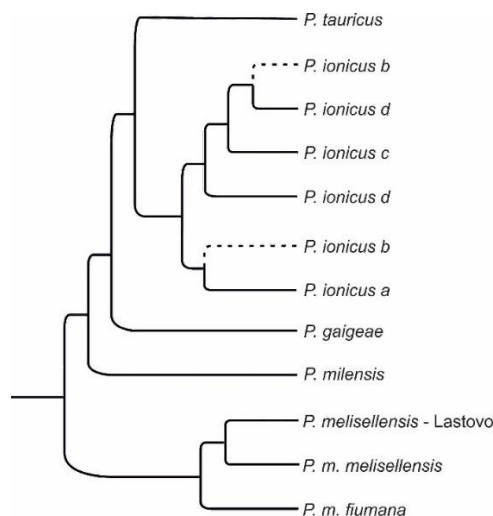
### Συμπεράσματα

## 6.1. Τελικά, πόσα είδη; Μια προτεινόμενη Ταξινόμηση της υποομάδας ειδών «*Podarcis tauricus*»

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανασύστασης των φυλογενετικών δέντρων, υπάρχουν εννέα διακριτοί φυλογενετικοί κλάδοι και υποκλάδοι εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», οι οποίοι δύνανται να θεωρηθούν ξεχωριστά είδη. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι δύο φυλογενετικοί κλάδοι του taxon *P. tauricus sensu stricto* είναι μορφολογικά, γεωγραφικά και φυλογενετικά διακριτοί, προτείνεται η ταξινόμηση του παραπάνω είδους να αλλάξει με τον διαχωρισμό του σε δύο ξεχωριστά taxa. Το πρώτο taxon είναι το *Podarcis tauricus* (Pallas, 1814) με τυπική τοποθεσία (type locality) τη Βόρεια Κριμαία και συμπεριλαμβάνει όλους τους πληθυσμούς που, έως σήμερα, αντιστοιχούσαν στα υποείδη *P. t. tauricus* και *P. t. thasopulae*. Αυτά τα δύο υποείδη γίνονται συνώνυμα κάτω από το μονοτυπικό πλέον είδος *P. tauricus*. Το δεύτερο taxon αντιστοιχεί είτε σε ένα διακριτό εξελικτικό είδος, ονόματι *Podarcis ionicus* (Lehrs, 1902) με τυπική τοποθεσία τη νήσο Κέρκυρα και με χαρακτηριστικό του τα υψηλά επίπεδα ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας [σύμφωνα με το σύστημα των Radial et al. (2010) παρατηρούνται πέντε Deep Conspecific Lineages (DCL)], είτε σε ένα σύμπλεγμα ειδών αποτελούμενο από ένα έως και πέντε είδη [σύμφωνα με το σύστημα των Radial et al. (2010) αντιστοιχούν σε πέντε Unconfirmed Candidate Species (UCS)]. Επί του παρόντος, προτείνουμε να γίνεται αναφορά στο δεύτερο taxon ως σύμπλεγμα ειδών *P. ionicus*, έως ότου να πραγματοποιηθούν εκτεταμένες γενετικές, μορφολογικές και οικοφυσιολογικές μελέτες πάνω σε αυτό το taxon. Όπως αναφέρθηκε στο Πέμπτο Κεφάλαιο κάποιες οικολογικές μελέτες έχουν γίνει για πληθυσμούς των υποκλάδων *a* και *e*, ωστόσο οι υποκλάδοι μεταξύ τους δεν έχουν συγκριθεί. Σύμφωνα με το σύστημα των Radial et al. (2010), τα προσωρινά ονόματα των φυλογενετικών υποκλάδων *a* έως *e* του taxon *P. ionicus* θα πρέπει να είναι: (a) *Podarcis ionicus* [Ca1 Poulakakis et al. 2005a], (b) *Podarcis ionicus* [Ca2 Psonis et al. 2016], (c) *Podarcis ionicus* [Ca3 Psonis et al. 2016], (d) *Podarcis ionicus* [Ca4 Poulakakis et al. 2005a] και (e) *Podarcis ionicus* [Ca5 Lehrs, 1902]. Αναφορικά με τα ελληνικά ενδημικά νησιωτικά είδη *P. milensis* και *P. gaigeae* είναι εμφανές ότι δεν παρουσιάζουν

ανεπτυγμένη φυλογενετική δομή ή ξεκάθαρο γεωγραφικό πρότυπο. Εντός αυτών των δύο ειδών, οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ ατόμων διαφορετικών νησιών και νησιδών παραμένουν άλυτες εμφανίζοντας χαρακτηριστική θαμνοειδή φυλογενετική δομή, υποδεικνύοντας είτε πρόσφατη ιστορία αποίκησης είτε υψηλή γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών νησιών και νησιδών. Ωστόσο, μόνο όσον αφορά το είδος *P. milensis*, θα πρέπει να συμπεριληφθούν σε μεταγενέστερες μελέτες δείγματα και από τα υπόλοιπα υποείδη του (*P. m. adolfjordansi* και *P. m. gerakuniae*) για πιο αξιόπιστα συμπεράσματα. Υπό το φως αυτών των ευρημάτων, η υποειδική ταξινόμηση του είδους *P. gaignae* τροποποιείται, με τα υποείδη *P. g. weigandi* και *P. g. gaignae* να γίνονται συνώνυμα κάτω από το μονοτυπικό πλέον είδος *P. gaignae*, πρόταση η οποία έχει ήδη διατυπωθεί προηγουμένως από τους Roulakakis et al. (2005d). Κλείνοντας, το είδος *P. melisellensis* αντιπροσωπεύεται από τρεις υποκλάδους που έχουν ήδη αναγνωρισθεί (Podnar et al., 2004; 2014), οι οποίοι αντιστοιχούν στα ακόλουθα τρία υποείδη: *P. m. melisellensis*, *P. m. fiumana* και ένα τρίτο μη περιεγραμμένο ταξινομικά υποείδος που αντιστοιχεί στον υποκλάδο Lastovo.

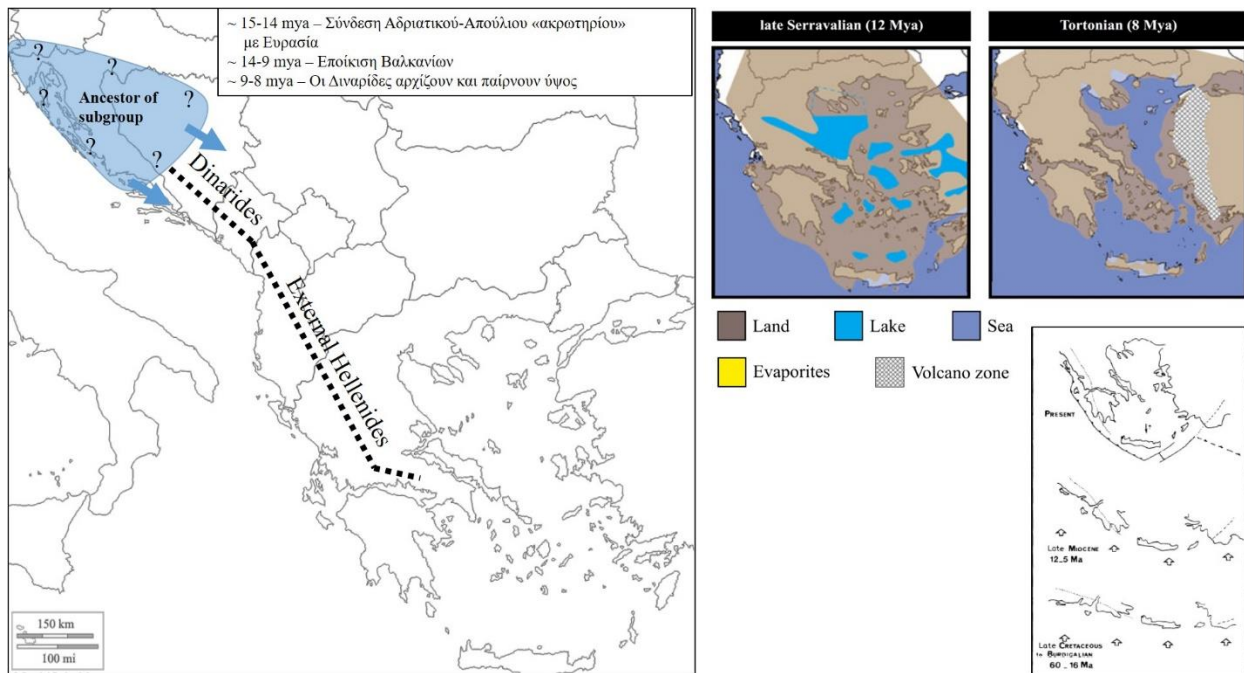
Οι σχέσεις εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» σύμφωνα με τις φυλογενετικές και φυλογενωμικές αναλύσεις συνοψίζονται στην Εικόνα 7.1.



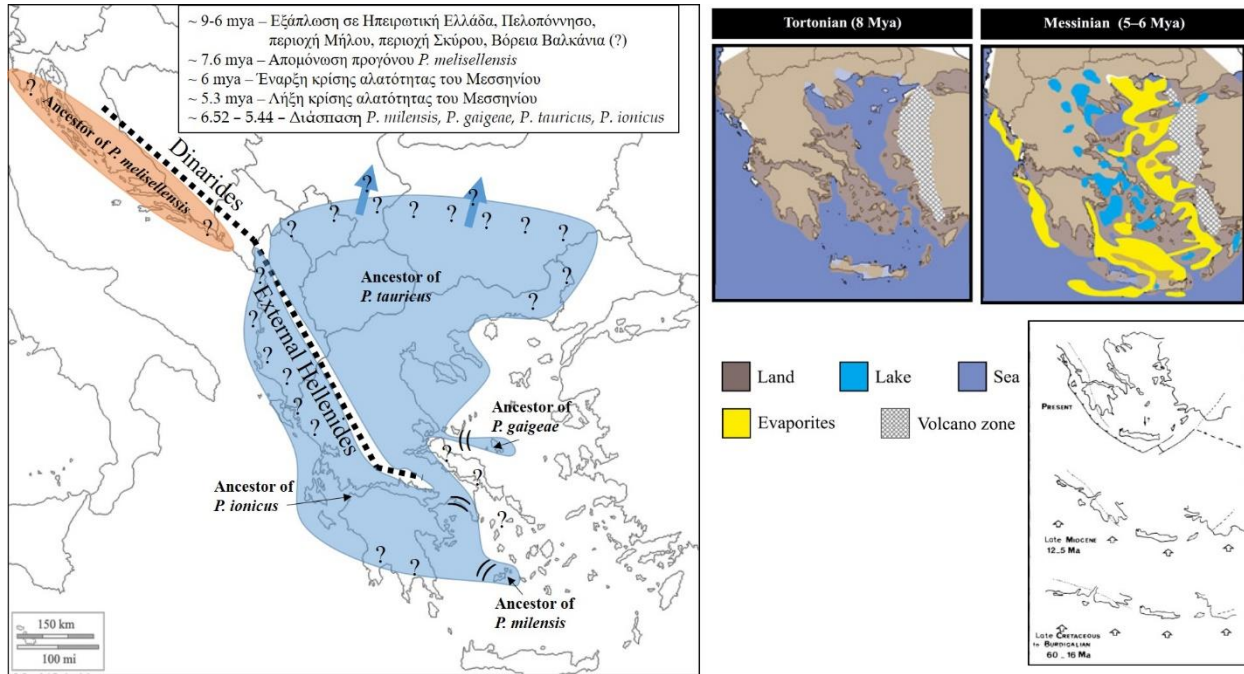
Εικόνα 7.1. Σύνοψη των σχέσεων εντός της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» σύμφωνα με τις φυλογενετικές και φυλογενωμικές αναλύσεις. Ο θύση του υποκλάδου *b* διαφέρει μεταξύ αναλύσεων.

## 6.2. Το εναλλακτικό φυλογεωγραφικό σενάριο βάσει απουσίας προγονικού ανταγωνισμού, σχηματικά

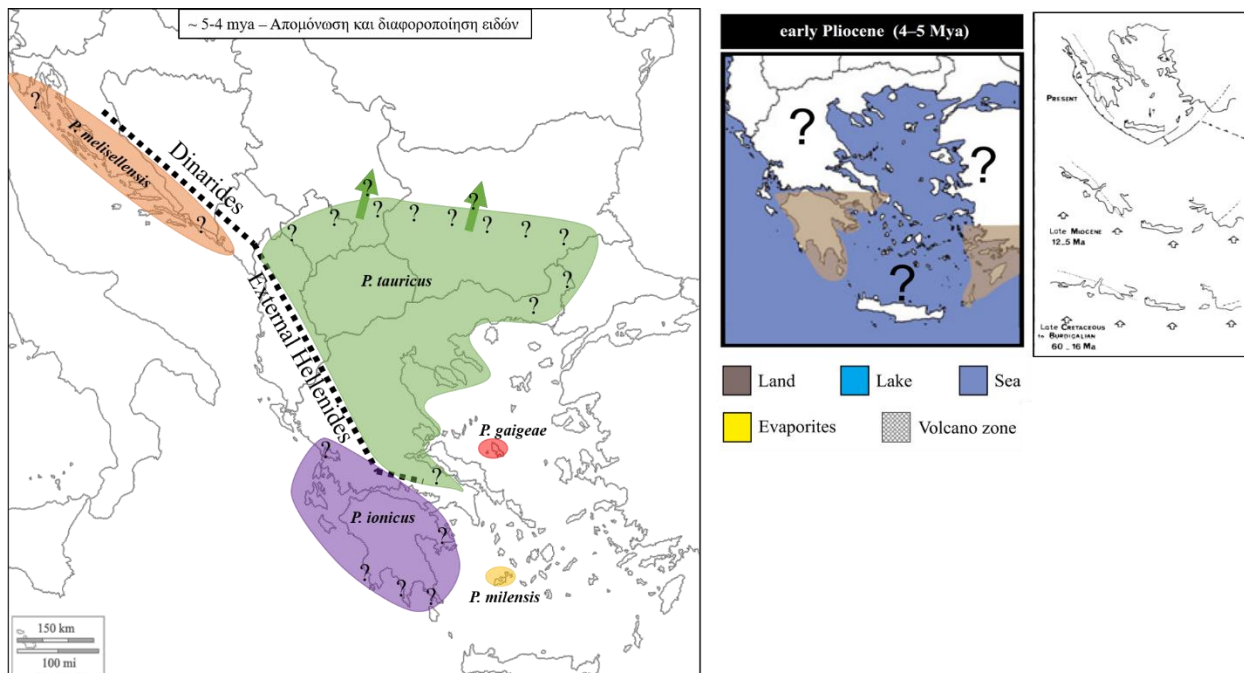
Το δημοσιευμένο φυλογεωγραφικό σενάριο βάσει της ύπαρξης προγονικού ανταγωνισμού (Roulakakis et al., 2005c; Roulakakis et al., 2005d) δόθηκε σχηματικά στο προηγούμενο κεφάλαιο και δεν τροποποιείται ιδιαίτερα με βάση τα νέα δεδομένα παρά μόνο με την ύπαρξη ενός επιπλέον απομονωμένου πληθυσμού του προγόνου της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» στην τότε περιοχή της βορειοδυτικής Ελλάδας και της νοτιοδυτικής Αλβανίας / δυτικής Στερεάς Ελλάδας / Επτανήσων. Ωστόσο, κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστεί σχηματικά και το εναλλακτικό σενάριο απουσίας προγονικού ανταγωνισμού. Στη σειρά των εικόνων 7.2 – 7.8 που ακολουθεί συνοψίζονται τα βασικά στάδια του προτεινόμενου εναλλακτικού φυλογεωγραφικού σεναρίου.



Εικόνα 7.2. Αποίκηση των Βαλκανίων στα ~14-9 εκατομμύρια χρόνια πριν από τον πρόγονο της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

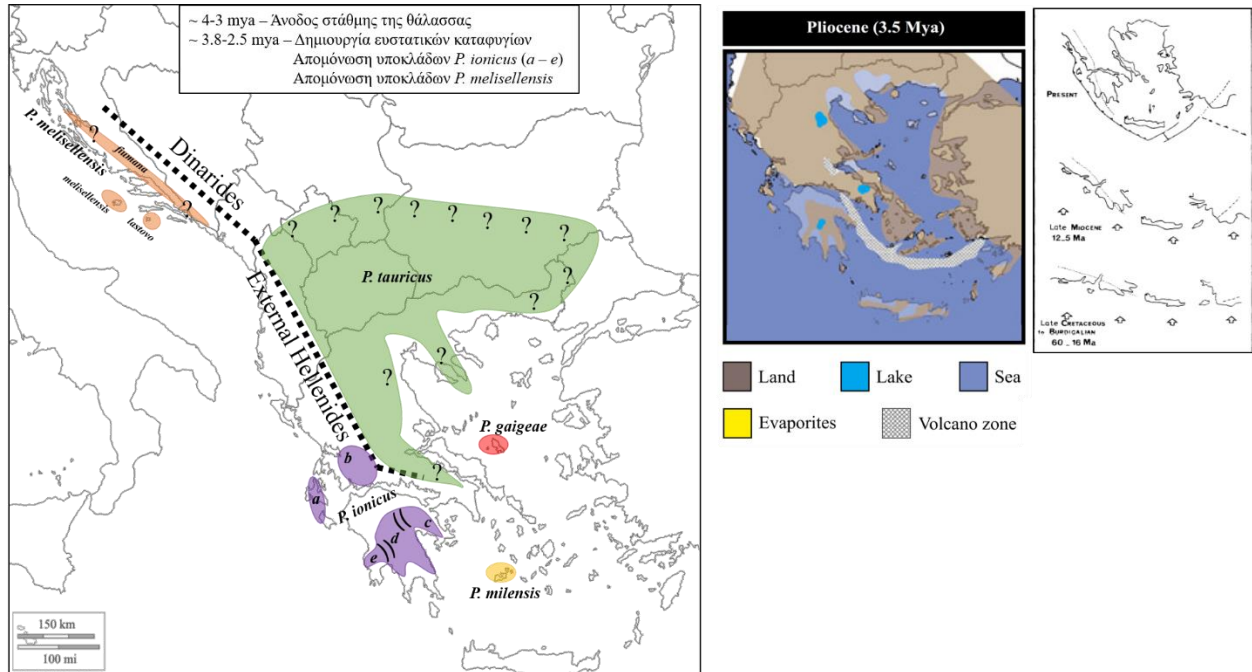


Εικόνα 7.3. Εξάπλωση σε Ηπειρωτική Ελλάδα, Πελοπόννησο, περιοχή Σκύρου και περιοχή Μήλου πριν από ~7-6 εκατομμύρια χρόνια, αφού έχει προηγηθεί η απομόνωση του προγόνου του είδους *P. melisellensis*.

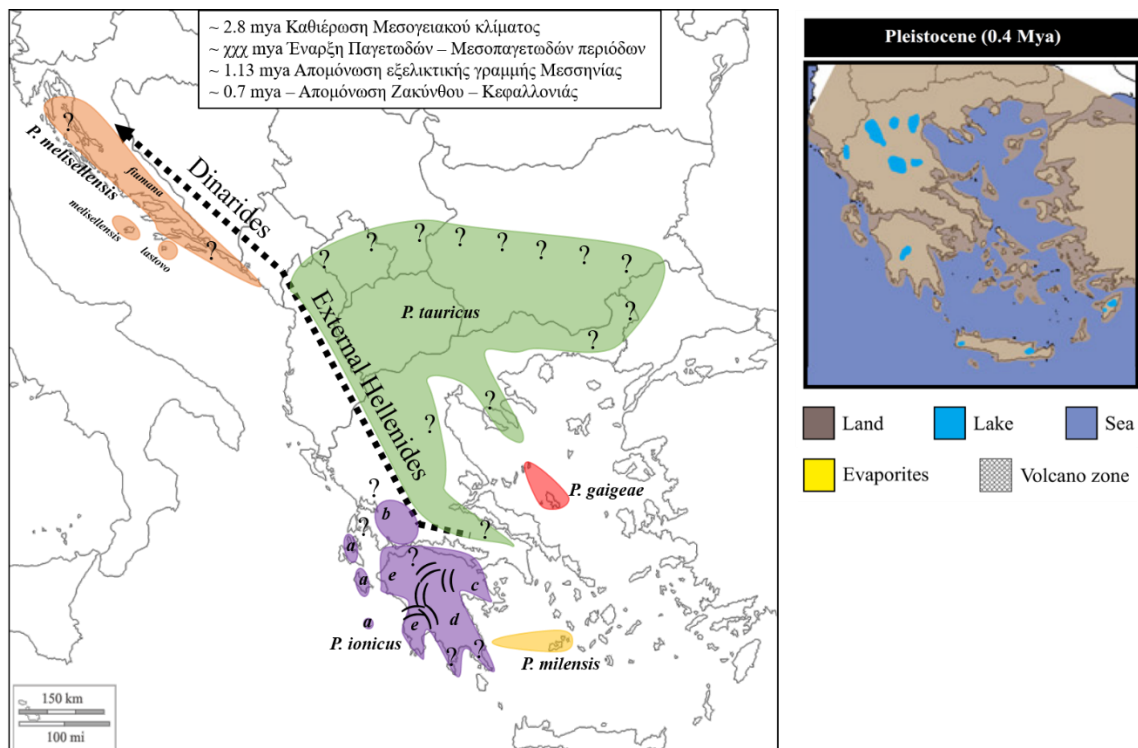


Εικόνα 7.4. Απομόνωση και διαφοροποίηση των ειδών *P. gaigeae*, *P. milensis*, *P. tauricus* και *P. ionicus* πριν από 5-4 εκατομμύρια έτη.

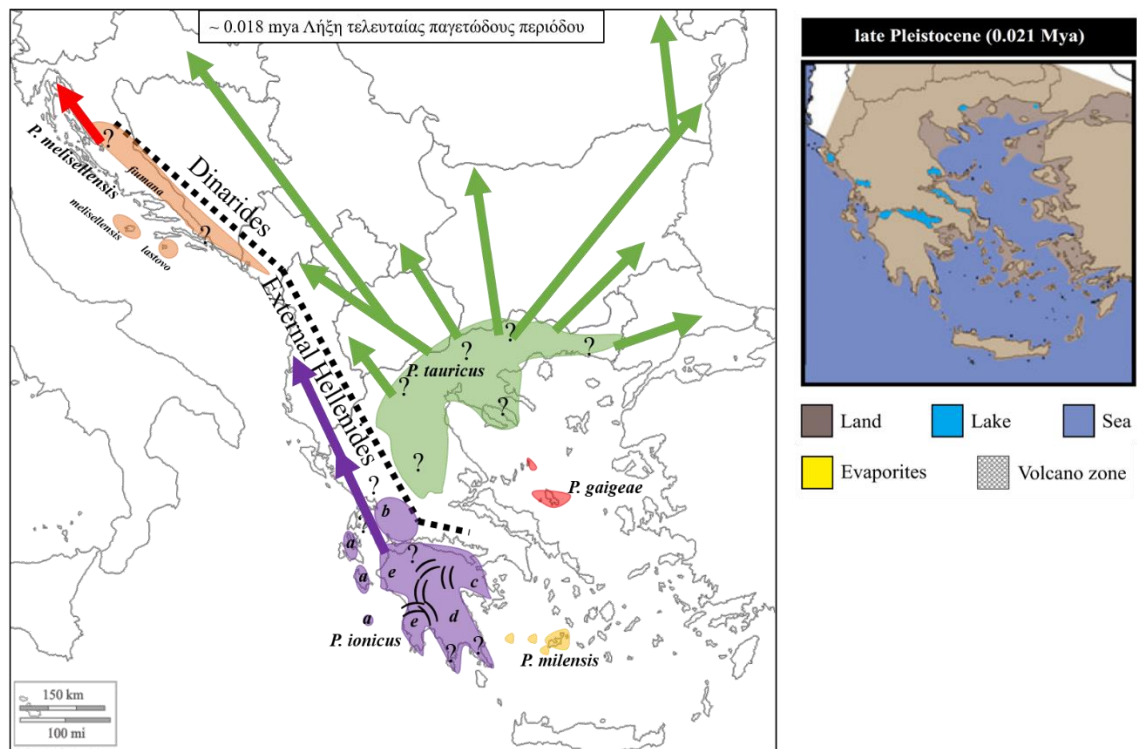




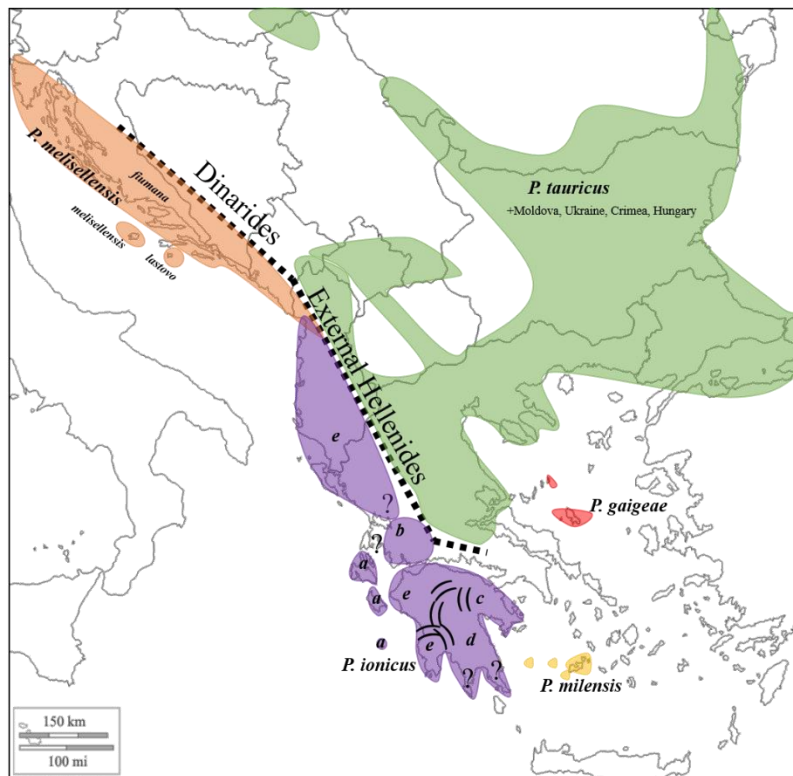
Εικόνα 7.5. Διαφοροποίηση των ειδών *P. ionicus* και *P. melisellensis* στους υποκλάδους τους πριν από 4-3 εκατομμύρια χρόνια.



Εικόνα 7.6. Εξάπλωση και διαφοροποίηση των taxa της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*» μετά το διάστημα 2.5 - 0,4 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα.



Εικόνα 7.7. Εξάπλωση προς τα βόρεια μετά το τέλος της τελευταίας παγετώδους περιόδου (~18.000 χρόνια πριν).

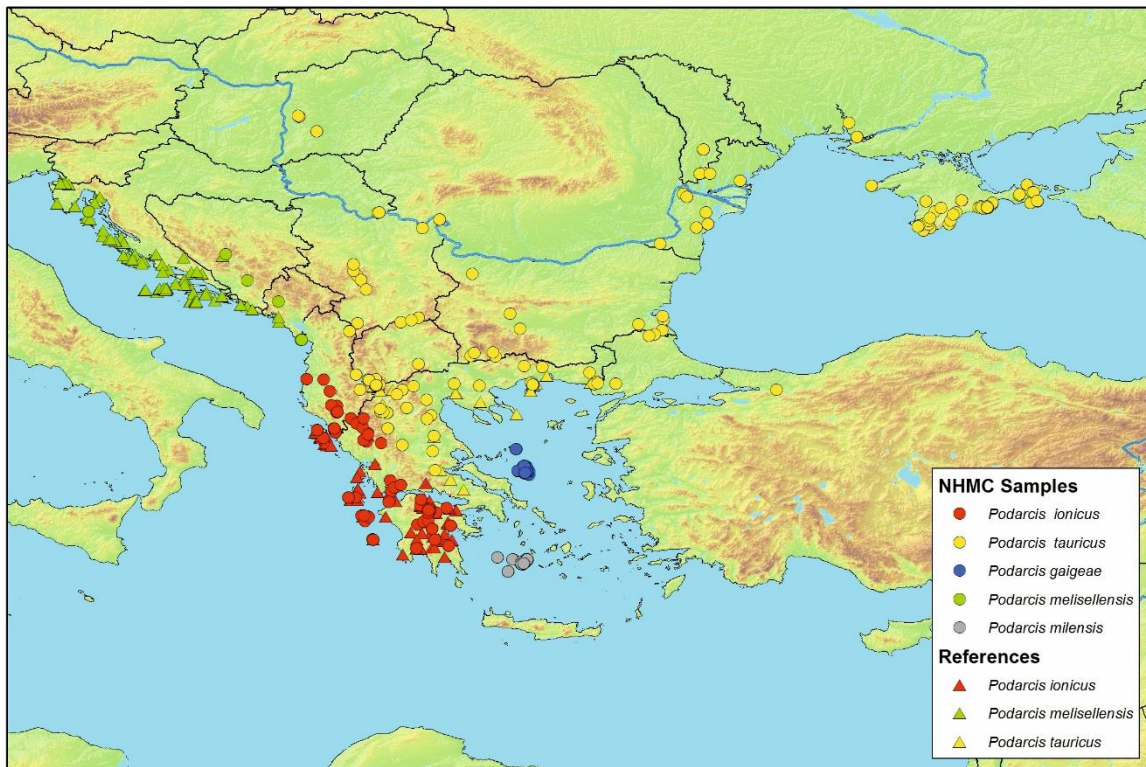


Εικόνα 7.8. Παρούσα γενική εξάπλωση των ταξα της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

### 6.3. Κατανομές των taxa της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*»

Υπό το φως των νέων ευρημάτων κρίνεται χρήσιμο να παρουσιαστεί και μια δυνητική κατανομή για κάθε ένα από τα taxa της υπό μελέτης ομάδας ειδών. Για κάποια από αυτά η ακριβή τους κατανομή είναι γνωστή και τα όρια αυτής καλώς ορισμένα (π.χ. *P. gaiigae*). Ωστόσο, για κάποια άλλα (π.χ. *P. tauricus*) η επίσημη κατανομή τους από την IUCN (βλ. Πρώτο Κεφάλαιο) είναι πολύ γενική, ενώ τα νέα δεδομένα αναμένεται να την τροποποιήσουν, αφού προτείνεται τροποποίηση της ταξινόμησης. Στην Εικόνα 7.11 φαίνεται όλη η πληροφορία που υπάρχει στις συλλογές του ΜΦΙΚ και στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία για τα δεδομένα παρουσίας του κάθε taxon της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*». Χαρακτηριστικό είναι ότι φαίνεται ξεκάθαρα η γεωγραφική απομόνωση των taxa, ενώ διακρίνονται αρκετές ασυνέχειες κατανομής, ιδιαίτερα σε σύγκριση με αυτήν της IUCN. Οι παραπάνω ασυνέχειες μπορεί, είτε να είναι αποτέλεσμα πραγματικής απουσίας του taxon είτε δειγματοληπτικό κενό. Η απόφαση για το τι από τα δύο ισχύει λαμβάνεται ανά περίπτωση και απαιτεί μεγάλο αριθμό δειγματοληπτικών προσπαθειών, κάτι που απαιτεί πολύ χρόνο και έχει υψηλό κόστος.

Έτσι, στις προτάσεις δυνητικών κατανομών που ακολουθούν (ιδιαίτερα για τους φυλογενετικούς υποκλάδους του taxon *P. t. ionicus*) γίνεται απλά μια εκτίμηση πιθανής κατανομής ανά περίπτωση, η οποία γίνεται λαμβάνοντας υπόψιν: (α) τη γενετική αναγνώριση του δείγματος και την αντιστοίχσή του στο φυλογενετικό δέντρο, (β) το γεγονός ότι η υποομάδα αυτή προτιμά περιοχές χαμηλού υψομέτρου (<800μ.) με λιβαδικά οικοσυστήματα και γενικά «ανοικτές» περιοχές, (γ) τη λειτουργία των ψηλών βουνών και των πυκνών δασών ως φράγματα στην εξάπλωσή τους, (δ) της παλαιογεωγραφίας της περιοχής, και (ε) των αποτελεσμάτων της περιβαλλοντικής οριοθέτησης των taxa (βλ. Πέμπτο Κεφάλαιο). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σε αρκετές περιπτώσεις βοηθούν στην εκτίμηση των ορίων των κατανομών, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις δεν είναι εύκολη η ασφαλής αντιστοίχιση μιας αναφοράς σε ένα συγκεκριμένο taxon, ενώ επίσης, κάποιες μοναδικές αναφορές που έγιναν πριν από δεκαετίες αμφισβητούνται.



Εικ. 7.9. Χάρτης δεδομένων παρουσίας των ειδών της υποομάδας «*P. tauricus*». Τα χρώματα αντιστοιχούν στα είδη όπως φαίνεται στον ενσωματωμένο πίνακα. Οι κύκλοι αντιστοιχούν στη θέση συλλογής των δειγμάτων του ΜΦΙΚ, ενώ τα τρίγωνα σε βιβλιογραφικά δεδομένα.

Ξεκινώντας από τα taxa για τα οποία η κατανομή τους είναι λίγο έως πολύ σαφώς ορισμένη, φαίνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δε μεταβάλλουν την επίσημη κατανομή της IUCN (βλ. Πρώτο Κεφάλαιο) για τα είδη *P. gaiageae*, *P. melisellensis* και *P. milensis*.

Οι αλλαγές στην ταξινόμική κατάσταση του *P. tauricus sensu lato* έχουν ως αποτέλεσμα από την κατανομή του είδους *P. tauricus* να αφαιρεθεί εκείνη του νεοαναχθέντος σε επίπεδο είδους *P. ionicus*. Επιπλέον, η έλλειψη βιβλιογραφικών αναφορών και τα αποτελέσματα της μοντελοποίησης χωρικών κατανομών συγκλίνουν στο ότι πιθανότατα το είδος αυτό δεν κατανέμεται στην Εύβοια και στην ανατολική Στερεά Ελλάδα. Επίσης, η παρουσία του στη Θάσο αμφισβητείται αφού, αν και υπάρχει ως σημείο-παρουσία στους χάρτες των Valakos et al. (2008), η αναφορά στην οποία

βασίζεται αυτή η καταγραφή (Chondropoulos, 1986) δε συγκαταλέγει τη Θάσο στην κατανομή.

Για το είδος *P. ionicus* ως επίσημη (γενική) κατανομή του στην IUCN μπορεί να οριστεί αυτή που είχε πριν το υποείδος *P. t. ionicus*. Ωστόσο, μιας και χαρακτηρίζεται ως σύμπλεγμα ειδών, η ακριβής κατανομή του αποτελείται από τις επιμέρους κατανομές των φυλογενετικών υποκλάδων του που αποτελούν UCS. Οι προτάσεις δυναμικών κατανομών για τους υποκλάδους *a - e* δίνονται στις Εικόνες 7.11 - 7.15. Σε κάποιες περιπτώσεις δίνεται μια γενική κατανομή (σκιαγράφιση) με μεγάλη ασάφεια όσον αφορά τα όριά της και μια πιο αυστηρή εκτίμηση (διακεκομμένη γραμμή) που βασίζεται στα πιο ασφαλή δεδομένα.

Ο υποκλάδος *a* σίγουρα κατανέμεται στα νησιά Κεφαλονιά και Στροφάδια (η εξαγωγή DNA στα δείγματα των τελευταίων δε στέφθηκε με επιτυχία, λόγω παλαιότητας του δείγματος ή/και κακής συντήρησης), ενώ στον υποκλάδο αυτόν αναμένεται να ανήκουν και οι πληθυσμοί της Ιθάκης (Εικ. 7.12). Η παρουσία αντιπροσώπου του taxon *P. t. ionicus* στη Λευκάδα (Valakos et al., 2008) δεν έχει επιβεβαιωθεί και πιθανώς πρόκειται για σφάλμα αφού η αναφορά στην οποία βασίζεται αυτή η καταγραφή (Chondropoulos, 1986) δεν συγκαταλέγει τη Λευκάδα στην κατανομή.

Ο υποκλάδος *b* κατανέμεται στη δυτική Στερεά Ελλάδα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.13, ωστόσο τα όρια της κατανομής του ιδιαίτερα προς το βορρά είναι αρκετά ασαφή. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το είδος *P. tauricus sensu lato* έχει παρατηρηθεί στα παράλια του Αμβρακικού κόλπου, στο Δέλτα του ποταμού Αράχθου (Kordges and Hemmer, 1987). Ωστόσο η εγγύτητα της περιοχής αυτής με τον υποκλάδο *e* θέτει περιορισμούς στην ασφαλή αντιστοίχιση της παρατήρησης αυτής με τον υποκλάδο *b*, με αποτέλεσμα μια πιο αυστηρή εκτίμηση της κατανομής.

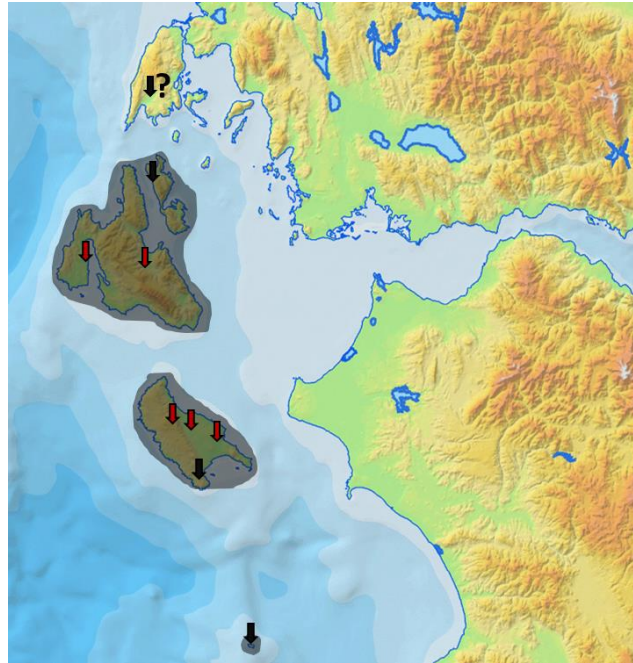
Ο υποκλάδος *c* είναι γνωστός από πολύ λίγες καταγραφές και συλλογές δειγμάτων, με τις περισσότερες να απέχουν ελάχιστα μεταξύ τους (Εικ. 7.14). Όπως και προηγουμένως, η κατανομή του είναι ασαφής, ορισμένη έως ένα μεγάλο βαθμό από τις τοπικές οροσειρές που δρουν ως φράγματα. Τα όρια της κατανομής στα νότια δεν είναι

γνωστά. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το είδος *P. tauricus sensu lato* έχει παρατηρηθεί στην περιοχή νότια του Άστρους Κυνουρίας (Buttle, 1988). Ωστόσο, η εγγύτητα της περιοχής αυτής με τον υποκλάδο *d* θέτει περιορισμούς στην ασφαλή αντιστοίχιση της παρατήρησης αυτής με τον υποκλάδο *b*, με αποτέλεσμα μια πιο αυστηρή εκτίμηση της κατανομής. Το ίδιο ισχύει και για την καταγραφή κοντά στο Κιάτο (Buttle, 1987), η οποία θα μπορούσε να ανήκει στον υποκλάδο *e*. Επιπλέον, για την ορεινή περιοχή βόρεια - βορειοδυτικά του Ναυπλίου δεν έχει δημοσιευτεί κάποια καταγραφή (Valakos et al., 2008), ενώ σύμφωνα με τη μοντελοποίηση χωρικών κατανομών, οι περιβαλλοντικές συνθήκες σε αυτήν την περιοχή δεν είναι κατάλληλες για τη φιλοξενία του είδους *P. ionicus*. Στο αντίθετο αποτέλεσμα καταλήγει η ανάλυση μόνο για τον υποκλάδο *c*, αλλά ο μικρός αριθμός των δειγμάτων δεν επαρκεί για την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος.

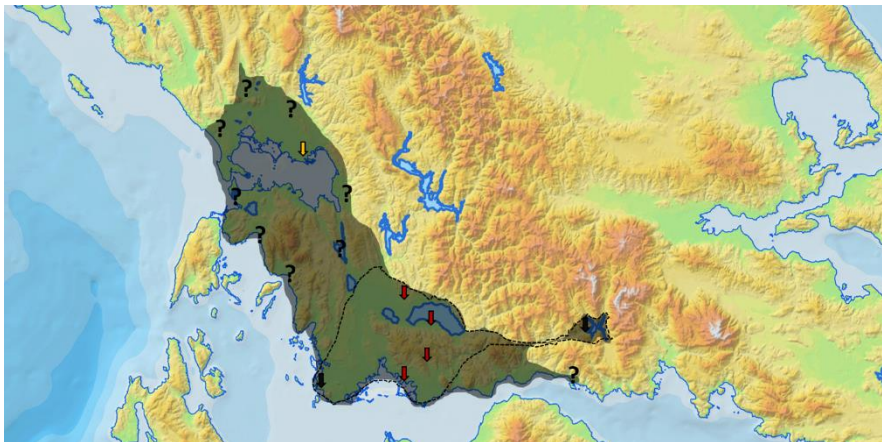
Η κατανομή του υποκλάδου *d* φαίνεται να περιορίζεται γύρω από τα όρη του Πάρνωνα και του Μαίναλου, με τις γειτονικές οροσειρές να αποτελούν φράγμα στην περαιτέρω εξάπλωσή του (Εικ. 7.15). Τα ακριβή όρια της κατανομής δεν είναι γνωστά και είναι δύσκολο να εκτιμηθούν. Όπως προαναφέρθηκε, η καταγραφή από την περιοχή νότια του Άστρους Κυνουρίας (Buttle, 1988) πιθανώς να αντιστοιχεί σε αυτόν τον υποκλάδο.

Τέλος, η κατανομή του υποκλάδου *e* είναι ιδιαίτερη μιας και αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές, η μία στη δυτική Ελλάδα και τη νότια Αλβανία και η άλλη στη δυτική - βορειοδυτική Πελοπόννησο (Εικ. 7.16). Στην περιοχή ανάμεσα σε αυτές συναντάει κανείς τον φυλογενετικό κλάδο *b*, έτσι τα νότια όρια του βόρειου κομματιού δεν είναι εύκολο να εκτιμηθούν. Πιθανώς, όπως προαναφέρθηκε, το δείγμα από τα παράλια του Αμβρακικού Κόλπου (Kordges and Hemmer, 1987) να ανήκει σε αυτόν τον υποκλάδο. Το ίδιο πιθανώς να συμβαίνει και με την καταγραφή από το Κιάτο (Buttle, 1987), η οποία μπορεί να αντιστοιχεί στον υποκλάδο *c*. Τα όρια από το βορειότερο κομμάτι της δεν είναι ακριβώς γνωστά, ωστόσο φαίνεται να φτάνουν (σύμφωνα με την IUCN) έως και την περιοχή βόρεια των Τιράνων, όπου αλληλεπικαλύπτεται η κατανομή

του υποκλάδου *e* με αυτή του είδους *P. melisellensis*. Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί και η περιοχή της δυτικής Πελοποννήσου, όπου δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα από την ευρύτερη περιοχή της τεχνητής λίμνης Πηνειού μέχρι και όλη τη δυτική Μεσσηνία. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Valakos et al., 2008) αντιπρόσωποι του ταχον *P. t. ionicus* έχουν παρατηρηθεί στη Γαστούνη, στον Καϊάφα και στην Πύλο, δημιουργώντας έτσι σχεδόν συνεχή κατανομή μέχρι και την Καλαμάτα. Πιθανώς όμως οι ορεινές περιοχές της Μεσσηνίας να μην αποτελούν μέρος της εξάπλωσης, απομονώνοντας έτσι την περιοχή της Καλαμάτας.

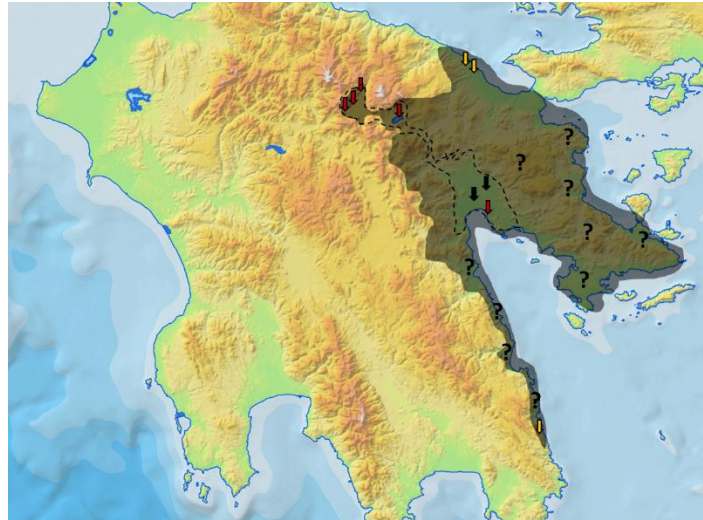


Εικ. 7.10. Δυνητική κατανομή (σκιαγράφηση) του υποκλάδου *a* του taxon *P. t. ionicus*. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν σε δείγματα για τα οποία υπάρχουν γενετικά δεδομένα, ενώ τα μαύρα αποτελούν επιλεγμένες βιβλιογραφικές αναφορές / ΜΦΙΚ δείγμα. Το ερωτηματικό υποδηλώνει έλλειψη (ασφαλούς) πληροφορίας.



Εικ. 7.11. Δυνητική κατανομή (σκιαγράφηση) του υποκλάδου *b* του taxon *P. t. ionicus*. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται η πιο αυστηρή εκτίμηση. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν σε δείγματα για τα οποία υπάρχουν γενετικά δεδομένα, ενώ τα μαύρα και το κίτρινο αποτελούν επιλεγμένες βιβλιογραφικές αναφορές (για το κίτρινο αμφισβητείται η ομαδοποίησή του σε αυτήν την ομάδα). Τα ερωτηματικά υποδηλώνουν έλλειψη πληροφορίας.

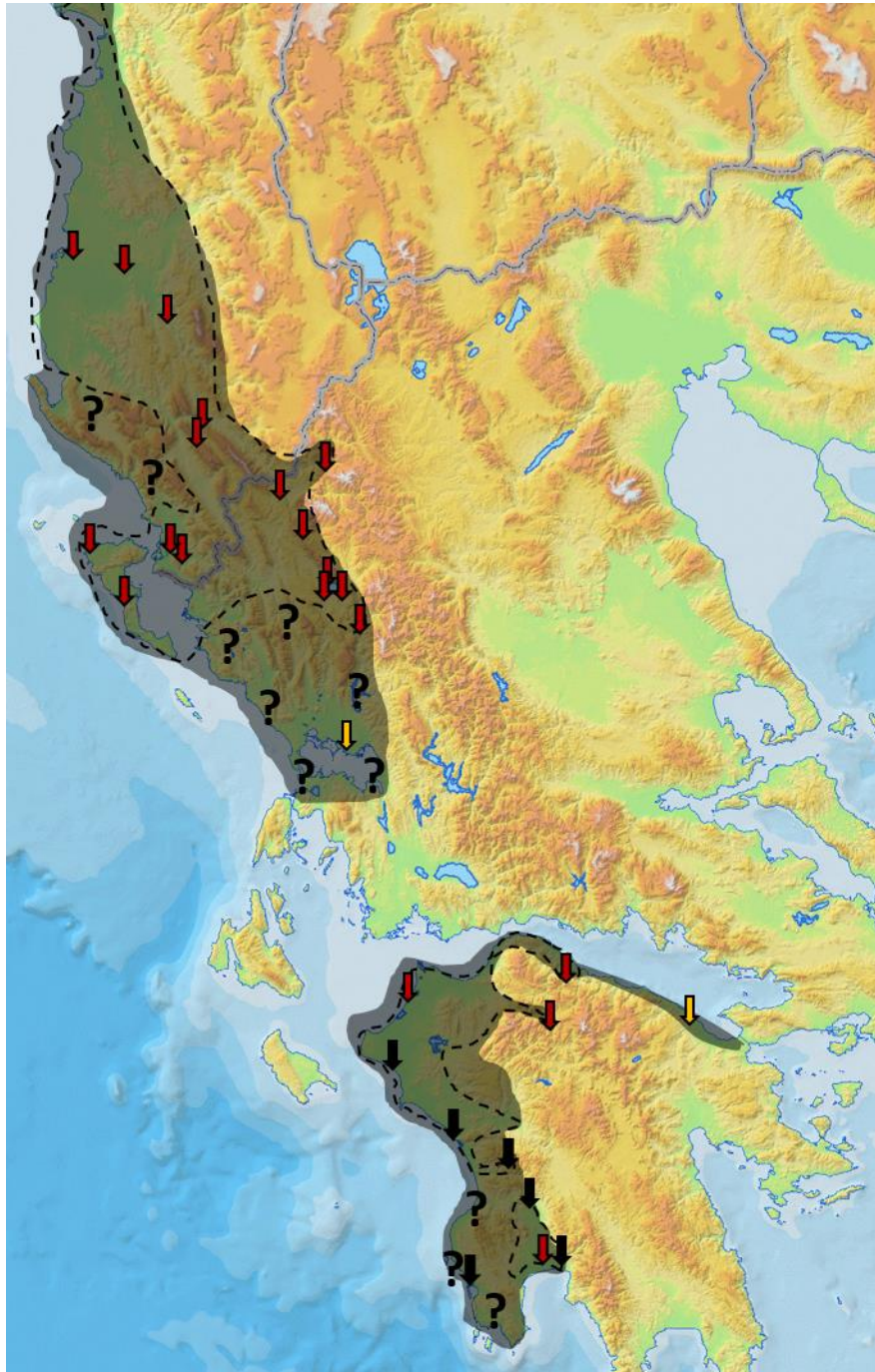




Εικ. 7.12. Δυνητική κατανομή (σκιαγράφηση) του υποκλάδου *c* του taxon *P. t. ionicus*. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται η πιο αυστηρή εκτίμηση. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν σε δείγματα για τα οποία υπάρχουν γενετικά δεδομένα, ενώ τα μαύρα και τα κίτρινα αποτελούν επιλεγμένες βιβλιογραφικές αναφορές (για τα κίτρινα αμφισβητείται η ομαδοποίησή τους σε αυτήν την ομάδα). Τα ερωτηματικά υποδηλώνουν έλλειψη πληροφορίας.



Εικ. 7.13. Δυνητική κατανομή (σκιαγράφηση) του υποκλάδου *d* του taxon *P. t. ionicus*. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται η πιο αυστηρή εκτίμηση. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν σε δείγματα για τα οποία υπάρχουν γενετικά δεδομένα, ενώ τα μαύρα και το κίτρινο αποτελούν επιλεγμένες βιβλιογραφικές αναφορές (για το κίτρινο αμφισβητείται η ομαδοποίησή του σε αυτήν την ομάδα). Τα ερωτηματικά υποδηλώνουν έλλειψη πληροφορίας.



Εικ. 7.14. Δυνητική κατανομή (σκιαγράφηση) του υποκλάδου *b* του ταχόν *P. t. ionicus*. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται η πιο αυστηρή εκτίμηση. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν σε δείγματα για τα οποία υπάρχουν γενετικά δεδομένα, ενώ τα μαύρα και το κίτρινο αποτελούν επιλεγμένες βιβλιογραφικές αναφορές (για το κίτρινο αμφισβητείται η ομαδοποίησή του σε αυτήν την ομάδα). Τα ερωτηματικά υποδηλώνουν έλλειψη πληροφορίας.

#### 6.4. Προτάσεις μελλοντικών δειγματοληψιών

Κλείνοντας τη διατριβή, θεωρείται σκόπιμο να γίνουν κάποιες μικρές προτάσεις για μελλοντικές μελέτες και δειγματοληψίες, οι οποίες θα προσθέσουν γνώση με σκοπό τη δημιουργία μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας της εξελικτικής ιστορίας της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*».

Για το είδος *P. milensis* θεωρείται αναγκαία η δειγματοληψία από τις νησίδες Βελοπούλα, Φαλκονέρα και Ανάνες ώστε να εξεταστεί φυλογενετικά η ταξινομική ισχύς των ενδημικών υποειδών *P. m. gerakuniae* και *P. m. adolfjordansi*. Δείγματα από το νησί της Πολυαίγου θα ήταν επίσης χρήσιμα για τη γενετική ταυτοποίηση του πληθυσμού του. Η προσθήκη ενός επαρκούς αριθμού δειγμάτων από τα παραπάνω νησιά σε μελέτη πληθυσμιακής γενετικής θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέα ευρήματα. Η γενετική μελέτη (π.χ. εξέταση του γονιδίου MC1R) των μελανιστικών ατόμων του νησιού Ανάνες, επίσης φαίνεται αρκετά ενδιαφέρουσα, από άποψη φυσιολογίας.

Για το είδος *P. tauricus* κρίνεται χρήσιμη η ακριβής εκτίμηση των ορίων κατανομής του στη βόρεια Αλβανία και τη νότια Ελλάδα με στοχευμένες δειγματοληψίες, και η επιβεβαίωση της παρουσίας/απουσίας του είδους στην ανατολική Στερεά Ελλάδα, την Εύβοια και τη Θάσο.

Για το είδος *P. melisellensis* κρίνεται απολύτως αναγκαίο και ενδιαφέρον η απόκτηση δειγμάτων από την περιοχή βόρεια των Τιράνων όπου η κατανομή του έχει αλληλεπικάλυψη με αυτή του φυλογενετικού υποκλάδου *e* του είδους *P. ionicus*, ώστε να εξεταστεί πιθανός υβριδισμός.

Για το είδος *P. ionicus* γενικά θα πρέπει να γίνει ακριβής εκτίμηση των ορίων κατανομής του κάθε φυλογενετικού υποκλάδου του. Πιο συγκεκριμένα, για τον υποκλάδο *a* απαιτείται η επιβεβαίωση της παρουσίας/απουσίας του από τη Λευκάδα. Δείγματα με σκοπό φυλογενετικές μελέτες θα ήταν χρήσιμο να υπάρχουν και από τα νησιά Ιθάκη και Στροφάδια. Για το υποκλάδο *b* είναι αναγκαία η εκτίμηση των βόρειων ορίων της κατανομής του όπου διαχωρίζεται με τον υποκλάδο *e*, ενώ χρήσιμα για ανάκτηση δεδομένων αλληλουχιών είναι δείγματα από τη λίμνη του Μόρνου. Για τους

υποκλάδους *c* και *d* θα πρέπει επίσης να γίνει μια σειρά δειγματοληψιών στην ανατολική και κεντρική Πελοπόννησο ώστε να γίνει εκτίμηση των ορίων κατανομής τους, ειδικά στις κοιλάδες των βουνών και στις πεδιάδες ανάμεσα σε αυτά, όπου πιθανώς κατανέμονται. Τέλος, για τον υποκλάδο *e*, ο οποίος είναι και ο πιο ιδιαίτερος, προτείνεται να γίνει εκτίμηση των ορίων (α) του βόρειου κομματιού της κατανομής του με συλλογή δειγμάτων από την περιοχή βόρεια των Τιράνων από τη μία (αλληλεπικάλυψη κατανομής με *P. melisellensis*) και από την περιοχή του Αμβρακικού από την άλλη (κοντά στον υποκλάδο *b*), όπως προαναφέρθηκε, (β) της εξελικτικής γραμμής της Καλαμάτας με επιπλέον δειγματοληψία στην Πύλο για την επιβεβαίωση παρουσίας/απουσίας της, (γ) της εξελικτικής γραμμής από την Αχαΐα -Ηλεία με δείγματα από τη Γαστούνη, τον Καϊάφα και την περιοχή γύρω από το Παναχαϊκό Όρος να είναι χρήσιμα για φυλογενετικές μελέτες.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

- Abellán, P., Svenning, J., 2014.** Refugia within refugia – patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biol. J. Linnean Soc.* 113, 13-28.
- Aberer, A.J., Kobert, K., Stamatakis, A., 2014.** ExaBayes: Massively Parallel Bayesian Tree Inference for the Whole-Genome Era. *Mol. Biol. Evol.* 31, 2553-2556.
- Agapow, P.M., Bininda-Emonds, O.R., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., Purvis, A., 2004.** The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly review of biology* 79, 161-179.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H., 2008.** Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27, 617-631.
- Ahmadzadeh, F., Flecks, M., Carretero, M.A., Mozaffari, O., Böhme, W., Harris, D.J., Freitas, S., Rödder, D., 2013a.** Cryptic Speciation Patterns in Iranian Rock Lizards Uncovered by Integrative Taxonomy. *PLoS ONE* 8, e80563.
- Ahmadzadeh, F., Flecks, M., Rödder, D., Böhme, W., Ilgaz, Ç., Harris, D.J., Engler, J.O., Üzümlü, N., Carretero, M.A., 2013b.** Multiple dispersal out of Anatolia: biogeography and evolution of oriental green lizards. *Biol. J. Linnean Soc.* 110, 398-408.
- Akın, Ç., Can Bilgin, C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Uzzell, T., Bilgin, M., Hotz, H., Guex, G.D., Plötner, J., 2010.** Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *J. Biogeography* 37, 2111-2124.
- Allegrucci, G., Rampini, M., Gratton, P., Todisco, V., Sbordoni, V., 2009.** Testing phylogenetic hypotheses for reconstructing the evolutionary history of *Dolichopoda* cave crickets in the eastern Mediterranean. *J. Biogeography* 36, 1785-1797.
- Althoff, D.M., Gitzendanner, M.A., Segraves, K.A., 2007.** The Utility of Amplified Fragment Length Polymorphisms in Phylogenetics: A Comparison of Homology within and between Genomes. *Syst. Biol.* 56, 477-484.

- Amos, W., Hoffman, J.I., Frodsham, A., Zhang, L., Best, S., Hill, A.V.S., 2007.** Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Mol. Ecol. Notes* 7, 10-14.
- Anastasakis, G.C., Dermitzakis, D.M., 1990.** Post-Middle-Miocene paleogeographic evolution of the region. Its possible influence on the distribution of the Quaternary mammals of the Kyklades Islands. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie-Abhandlungen* 1, 1-16.
- Antoniou, A., Magoulas, A., Platis, P., Kotoulas, G., 2013.** Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. *Genetica* 141, 23-40.
- Araújo, M.B., Guisan, A., 2006.** Five (or so) challenges for species distribution modelling. *J. Biogeography* 33, 1677-1688.
- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Sadoon, M.A., Shobrak, M., 2010.** A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2079-2096.
- Arnold, E.N., 1973.** Relationships of the Palaearctic lizards assigned to the genera *Lacerta*, *Algyroides* and *Psammodromus* (Reptilia: Lacertidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 25, 291-366.
- Arnold, E.N., 1987.** Resource partition among lacertid lizards in southern Europe. *J. Zool.* 1, 739-782.
- Arnold, E.N., 1989.** Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 55, 209-257.
- Arnold, E.N., 2000.** The gender of *Podarcis* and the virtues of stability, a reply to W. Böhme. *Bonner Zool. Beitrage* 49, 71-74.
- Arnold, E.N., 2004.** Overview of morphological evolution and radiation in the Lacertidae. In: Perez-Mellado, V., Riera, N., Perera, A. (Eds.), *The biology of lacertid lizards. Evolutionary and ecological perspectives*. Institut Menorqui d'Estudis, Recerca, Menorca, pp. 11-36.

- Arnold, E.N., Arribas, O., Carranza, S., 2007.** Systematics of the Palaearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera. *Zootaxa* 1430, 3-86.
- Arnold, E.N., Burton, J.A., Ovenden, D., 1978.** Field guide to the reptiles and amphibians of Britain and Europe. Collins, London.
- Arnold, E.N., Ovenden, D., 2002.** A field guide to the reptiles and amphibians of Britain and Europe. HarperCollins Publishers, London.
- Arntzen, J.W., Sá-Sousa, P., 2007.** Morphological and genetical differentiation of lizards (*Podarcis bocagei* and *P. hispanica*) in the Ria de Arosa Archipelago (Galicia, Spain) resulting from vicariance and occasional dispersal. In: Renema, W. (Ed.), *Biogeography, Time and Place: Distributions, Barriers and Islands*. Springer Verlag, pp. 365–401.
- Avise, J.C., 2000.** *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987.** Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Ayoutanti, A., Krimbas, C., Mylonas, M., Papathanasopoulou, A., Sourdis, J., 1993a.** Inbreeding and population structure of taxa of the genus *Albinaria* in the Aegean region. *Biol. Gallo-Hellenica* 20, 25-29.
- Ayoutanti, A., Krimbas, C., Sourdis, J., Mylonas, M., 1993b.** Geographic structure of the genus *Albinaria* in the Aegean region as revealed by electrophoretic genetic data. *Biol. Gallo-Hellenica* 20, 19-23.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailovic, J., Cogalniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Garcia-París, M., Arntzen, J.W., 2005.** Phylogeography of two European newt species – discordance between mtDNA and morphology. *Mol Ecol* 14, 2475-2491.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., Johnson, E.A., 2008.** Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* 3, e3376.

- Barome, P.O., Lymberakis, P., Monnerot, M., Gatung, J.C., 2001.** Cytochrome b Sequences reveal *Acomys minous* (Rodentia: Muridae) paraphyly and answer the question about the ancestral karyotype of *Acomys dimidiatus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 37-46.
- Bauer, A.M., Cogger, H.G., Zweifel, R.G., 1998.** Encyclopedia of Reptiles and Amphibians. Academic Press, San Diego.
- Beerli, P., Hotz, H., Uzzell, T., 1996.** Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for aegean water frogs. *Evolution* 50, 1676-1687.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2001.** GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000: Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bellati, A., Pellitteri-Rosa, D., Sacchi, R., Nistri, A., Galimberti, A., Casiraghi, M., Fasola, M., Galeotti, P., 2011.** Molecular survey of morphological subspecies reveals new mitochondrial lineages in *Podarcis muralis* (Squamata: Lacertidae) from the Tuscan Archipelago (Italy). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 49, 240-250.
- Bittkau, C., Comes, H.P., 2005.** Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. *Mol Ecol* 14, 4065-4083.
- Bittkau, C., Comes, H.P., 2009.** Molecular inference of a Late Pleistocene diversification shift in *Nigella* s. lat. (Ranunculaceae) resulting from increased speciation in the Aegean archipelago. *J. Biogeography* 36, 1346-1360.
- Blois, J.L., 2012.** update: Recent advances in using species distributional models to understand past distributions. *Front. Biogeogr.* 3, 123-124.
- Bloor, P., Rodríguez, V., Terrasa, B., Brown, R.P., Pérez-Mellado, V., Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M.M., 2011.** Polymorphic microsatellite loci for the Balearic Island Lizard *Podarcis lilfordi* (Squamata: Lacertidae). *Conservation Genet. Resour.* 3, 323-325.
- Böhme, W., 1997.** A note on the gender of *Podarcis*. *Bonner Zool. Beitrage* 47, 187-188.



- Böhme, W., 2005.** Do Endings of Adjective Flectible Species Names Affect Stability? A Final Note on the Gender of *Podarcis* Wagler, 1830 (Reptilia, Lacertidae). *Bonn Zool. Bull.* 53, 291-293.
- Bouckaert, R.R., 2010.** DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 26, 1372-1373.
- Bouckaert, R.R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T.J., Wu, C., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J., 2014.** BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003537.
- Boudjemadi, K., Martin, O., Simon, J.C., Estoup, A., 1999.** Development and cross-species comparison of microsatellite markers in two lizard species, *Lacerta vivipara* and *Podarcis muralis*. *Mol Ecol* 8, 518-520.
- Brown, R.P., Terrasa, B., Perez-Mellado, V., Castro, J.A., Hoskisson, P.A., Picornell, A., Ramon, M.M., 2008.** Bayesian estimation of post-Messinian divergence times in Balearic Island lizards. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 350-358.
- Brueckner, M., Duering, A., 2001.** PCR-RFLP a fast and inexpensive biochemical method for detecting species boundaries in the *Lacerta viridis/bilineata* species complex. *Mertensiella* 31, 40-44.
- Buades, J.M., Rodríguez, V., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Brown, R.P., Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M.M., 2013.** Variability of the mc1r gene in melanic and non-melanic *Podarcis lilfordi* and *Podarcis pityusensis* from the Balearic archipelago. *PloS One* 8, e53088.
- Burbrink, F.T., Yao, H., Ingrasci, M., Bryson Jr, R.W., Guiher, T.J., Ruane, S., 2011.** Speciation at the Mogollon Rim in the Arizona Mountain Kingsnake (*Lampropeltis pyromelana*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 60, 445-454.
- Buttle, D., 1987.** Observations on some of the herpetofauna of the Peloponnese. *Br. herpet. Soc. Bull.* 20, 8-14.
- Buttle, D., 1988.** Further notes on reptiles and amphibians of the Peloponnese. *Br. herpet. Soc. Bull.* 26, 14-20.

- Calvo, M., Alda, F., Oliverio, M., Templado, J., Machordom, A., 2015.** Surviving the Messinian Salinity Crisis? Divergence patterns in the genus *Dendropoma* (Gastropoda: Vermetidae) in the Mediterranean Sea. *Mol. Phylogenet. Evol.* 91, 17-26.
- Camargo, A., Sinervo, B., Sites, J.W., 2010.** Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Mol Ecol* 19, 3250-3270.
- Camargo, A., Sites, J.J., 2013.** Species Delimitation: A Decade After the Renaissance. In: Pavlinov, I.Y. (Ed.), *The Species Problem - Ongoing Issues*. InTech, p. 290.
- Card, D.C., Schield, D.R., Adams, R.H., Corbin, A.B., Perry, B.W., Andrew, A.L., Pasquesi, G.I.M., Smith, E.N., Jezkova, T., Boback, S.M., Booth, W., Castoe, T.A., 2016.** Phylogeographic and population genetic analyses reveal multiple species of *Boa* and independent origins of insular dwarfism. *Mol. Phylogenet. Evol.* 102, 104-116.
- Carranza, S., Arnold, E.N., 2006.** Systematics, biogeography, and evolution of *Hemidactylus* geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 531-545.
- Carranza, S., Arnold, E.N., Amat, F., 2004.** DNA phylogeny of *Lacerta (Iberolacerta)* and other lacertine lizards (Reptilia: Lacertidae): did competition cause long-term mountain restriction? *Syst. Biodivers.* 2, 57-77.
- Carranza, S., Arnold, E.N., Pleguezuelos, J.M., 2006a.** Phylogeny, biogeography, and evolution of two Mediterranean snakes, *Malpolon monspessulanus* and *Hemorrhhis hippocrepis* (Squamata, Colubridae), using mtDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 532-546.
- Carranza, S., Harris, D.J., Arnold, E.N., Batista, V., Gonzalez de la Vega, J.P., 2006b.** Phylogeography of the lacertid lizard, *Psammmodromus algirus*, in Iberia and across the Strait of Gibraltar. *J. Biogeography* 33, 1279-1288.
- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A., Cresko, W.A., 2013.** Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol* 22, 3124-3140.
- Cellinese, N., Smith, S.A., Edwards, E.J., Kim, S., Haberle, R.C., Avramakis, M., Donoghue, M.J., 2009.** Historical biogeography of the endemic Campanulaceae of Crete. *J. Biogeography* 36, 1253-1269.

- Čerňanský, A., 2010. Earliest world record of green lizards (Lacertilia, Lacertidae) from the Lower Miocene of Central Europe. *Biologia* 65, 737-741.
- Chattopadhyay, B., Garg, K.M., Kumar, A.K.V., Doss, D.P.S., Rheindt, F.E., Kandula, S., Ramakrishnan, U., 2016. Genome-wide data reveal cryptic diversity and genetic introgression in an Oriental cynopterine fruit bat radiation. *BMC Evol. Biol.* 16, 1-15.
- Chifman, J., Kubatko, L.S., 2014. Quartet Inference from SNP Data Under the Coalescent Model. *Bioinformatics* 30, 3317-3324.
- Chondropoulos, B., Maragou, P., Valakos, E.D., 1993. The food consumption of *Podarcis taurica ionica* (Lehrs, 1902) in the Ionian Islands. In: Valakos, E.D., Perez Mellado, V., Boehme, W., Maragou, P. (Eds.), *Lacertids of the Mediterranean Basin*, pp. 173-182.
- Chondropoulos, B.P., 1986. A checklist of the Greek reptiles. I. The lizards. . *Amphibia - Reptilia* 7, 217-235.
- Chondropoulos, B.P., Lykakis, J.J., 1983. Ecology of the Balkan Wall Lizard, *Podarcis taurica ionica* (Sauria: Lacertidae) from Greece. *Copeia* 1983, 991-1001.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol. Notes* 9, 1657-1659.
- Comes, H.P., Tribsch, A., Bittkau, C., 2008. Plant speciation in continental island floras as exemplified by *Nigella* in the Aegean Archipelago. *Phil. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 363, 3083-3096.
- Cox, S.C., Carranza, S., Brown, R.P., 2010. Divergence times and colonization of the Canary Islands by *Gallotia* lizards. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 747-757.
- Creutzburg, N., 1963. Paleogeographic evolution of Crete from Miocene till our days. *Cretan Annals* 15/16, 336-342.
- Daams, R., Van Der Weerd, A.V., 1980. Early Pliocene small mammals from the Aegean island of Karpathos (Greece) and their paleogeographic significance. *Geol. Mijnbouw* 59, 327-331.
- DaCosta, J.M., Sorenson, M.D., 2016. ddRAD-seq phylogenetics based on nucleotide, indel, and presence-absence polymorphisms: Analyses of two avian genera with contrasting histories. *Mol. Phylogenet. Evol.* 94, Part A, 122-135.

- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Meth.* 9, 772-772.
- Davey, J.W., Blaxter, M.L., 2010.** RADSeq: next-generation population genetics. *Brief. Funct. Genom.* 9, 416-423.
- De Giuli, C., Masini, F., Valleri, G., 1987.** Paleogeographic evolution of the Adriatic area since Oligocene to Pleistocene. *Riv. It. Paleont. Strat.* 93, 109-126.
- De Queiroz, K., 2007.** Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879-886.
- Decima, A., Wezel, F., 1973.** Late Miocene evaporites of the Central Sicilian Basin. *Init. Rep. DSDP Leg 13,,* 1234-1240.
- Dermitzakis, D.M., 1989.** The colonisation of Aegean islands in relation with the paleogeographic evolution (in greek). *Biol. Gallo-Hellenica* 14, 99-121.
- Dermitzakis, D.M., 1990.** Paleogeography, Geodynamic Processes and event Stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area. *Atti Convegni Lincei* 85, 263-288.
- Dermitzakis, D.M., Papanikolaou, D.J., 1981.** Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene. *Annal. Geol. Pays Hellenic* 30, 245-289.
- Douris, V., Giokas, S., Thomaz, D., Lecanidou, R., Rodakis, G.C., 2007.** Inference of evolutionary patterns of the land snail *Albinaria* in the Aegean archipelago: Is vicariance enough? *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 1224-1236.
- Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D., Rieseberg, L.H., 1996.** Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites. In: Moritz, C., Hillis, D.M., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A., pp. 249-282.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., 2005.** Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1185-1192.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012.** Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969-1973.

- Džukić, G., Kalezić, M.L., 2004. The Biodiversity of Amphibians and Reptiles in the Balkan Peninsula. In: Griffiths, H.I. (Ed.), *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 167-792.
- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Res.* 4, 359-361.
- Eaton, D.A.R., 2014. PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 30, 1844-1848.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.
- Edh, K., WideN, B., Ceplitis, A.L.F., 2007. Nuclear and chloroplast microsatellites reveal extreme population differentiation and limited gene flow in the Aegean endemic *Brassica cretica* (Brassicaceae). *Mol Ecol* 16, 4972-4983.
- Elith, J., Graham, H.C., Anderson, P.R., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, J.R., Huettmann, F., Leathwick, R.J., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, G.L., Loiselle, A.B., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, M.M.J., Townsend Peterson, A., Phillips, J.S., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Schapire, E.R., Soberón, J., Williams, S., Wisz, S.M., Zimmermann, E.N., 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29, 129-151.
- Emerson, K.J., Merz, C.R., Catchen, J.M., Hohenlohe, P.A., Cresko, W.A., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2010. Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 107, 16196-16200.
- Engleder, A., Haring, E., Kirchhof, S., Mayer, W., 2013. Multiple nuclear and mitochondrial DNA sequences provide new insights into the phylogeny of South African Lacertids (Lacertidae, Eremiadinae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 51, 132-143.
- Estes, R., 1983. *Handbuch der Paläoherpetologie, Part 10: Sauria terrestria, Amphisbaenia*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Estes, R.K., de Queiroz, K., Gauthier, J., 1988.** Phylogenetic relationships within Squamata. In: Pregill, R.E.G. (Ed.), *Phylogenetic Relationships of the Lizard Families*. Stanford University Press, Stanford, pp. 119-281.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* 10, 564-567.
- Faircloth, B.C., McCormack, J.E., Crawford, N.G., Harvey, M.G., Brumfield, R.T., Glenn, T.C., 2012.** Ultraconserved Elements Anchor Thousands of Genetic Markers Spanning Multiple Evolutionary Timescales. *Syst. Biol.* 61, 717-726.
- Falniowski, A., Szarowska, M., 2011.** Radiation and phylogeography in a spring snail *Bythinella* (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea) in continental Greece. *Ann. Zool. Fennici* 48, 67-90.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- Fehér, Z., Parmakelis, A., Koutalianou, M., Mourikis, T., Erőss, Z.P., Krízsik, V., 2014.** A contribution to the phylogeny of Albanian *Agathylla* (Gastropoda, Clausiliidae): insights using morphological data and three mitochondrial markers. *J. Molluscan Studies* 80, 24-34.
- Felsenstein, J., 1985.** Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Ferchaud, A., Ursenbacher, S., Cheylan, M., Luiselli, L., Jelić, D., Halpern, B., Major, Á., Kotenko, T., Keyan, N., Behrooz, R., Crnobrnja-Isailović, J., Tomović, L., Ghira, I., Ioannidis, Y., Arnal, V., Montgelard, C., 2012.** Phylogeography of the *Vipera ursinii* complex (Viperidae): mitochondrial markers reveal an east-west disjunction in the Palearctic region. *J. Biogeogr.* 39, 1836-1847.

- Fernandez-Silva, I., Whitney, J.B., Wainwright, B., Andrews, K.R., Ylitalo-Ward, H., Bowen, B.W., Toonen, R.J., Goetze, E., Karl, S.A., 2013.** Microsatellites for Next-Generation Ecologists: A Post-Sequencing Bioinformatics Pipeline. *PLoS ONE* 8, e55990.
- Fu, J.Z., 2000.** Toward the phylogeny of the family Lacertidae - Why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biol. J. Linnean Soc.* 71, 203-217.
- Fu, Y., 1997.** Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Fujisawa, T., Barraclough, T.G., 2013.** Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Syst. Biol.* 62, 707-724.
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., 2010.** A coalescent perspective on delimiting and naming species: a reply to Bauer et al. *Proc. R. Soc. Lond. B*, Published Online.
- Fulgione, D., Guglielmi, S., Odierna, G., Rippa, D., Caliendo, M.F., Rastogi, R.K., 2008.** Morphological differentiation and genetic structure in island lizard populations. *Zool. Sci.* 25, 465-474.
- Fulgione, D., Milone, M., Rippa, D., Capriglione, T., Guarino, F.M., Odierna, G., 2004.** Genetic analysis in a mainland melanic lizard (*Podarcis sicula*) population from Cilento and Vallo di Diano national park (Campania, Italy). *Italian J. Zool.* 71, 25-28.
- Gassert, F., Schulte, U., Husemann, M., Ulrich, W., Rödder, D., Hochkirch, A., Engel, E., Meyer, J., Habel, J.C., 2013.** From southern refugia to the northern range margin: genetic population structure of the common wall lizard, *Podarcis muralis*. *J. Biogeogr.* 40, 1475-1489.
- Gkontas, I., Papadaki, S., Trichas, A., Poulakakis, N., 2016.** First assessment on the molecular phylogeny and phylogeography of the species *Gnaptor boryi* distributed in Greece (Coleoptera: Tenebrionidae). *Mitoch. DNA Part A*, 1-8.
- Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J.J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S.A., Russ, C., Gabriel, S., Jaffe, D.B., Lander, E.S., Nusbaum, C., 2009.** Solution Hybrid Selection with Ultra-long Oligonucleotides for Massively Parallel Targeted Sequencing. *Nature biotech.* 27, 182-189.

- Godinho, R., Crespo, E., Ferrand, N., Harris, D.J., 2005.** Phylogeny and evolution of the green lizards, *Lacerta* spp. (Squamata: Lacertidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Amphibia-Reptilia* 26, 271-285.
- Gomez, A., Lunt, D.H., 2007.** Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss, S., Ferrand, N. (Eds.), *Phylogeography in southern European refugia: evolutionary perspectives on the origins and conservation of European biodiversity*. Springer, Berlin, pp. 155-188.
- Graur, D., Li, W.H., 2000.** *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Grove, A.T., Rackham, O., 2001.** *The nature of Mediterranean Europe: an ecological history*. Yale University Press, New Haven, USA.
- Guicking, D., Joger, U., Wink, M., 2008.** Molecular phylogeography of the viperine snake *Natrix maura* (Serpentes: Colubridae): Evidence for strong intraspecific differentiation. *Org. Divers. Evol.* 8, 130-145.
- Guicking, D., Joger, U., Wink, M., 2009.** Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR-PCR fingerprinting. *Org. Divers. Evol.* 9, 201-214.
- Guillot, G., Leblois, R., Coulon, A., Frantz, A.C., 2009.** Statistical methods in spatial genetics. *Mol Ecol* 18, 4734-4756.
- Guillou, H., Carracedo, J.C., Torrado, F.P., Badiola, E.R., 1996.** K-Ar ages and magnetic stratigraphy of a hotspot-induced, fast grown oceanic island: El Hierro, Canary Islands. *J. Volcanol. Geoth. Res.* 73, 141-155.
- Gvoždík, V., Jandzik, D., Lymberakis, P., Jablonski, D., Moravec, J., 2010.** Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 460-472.
- Hale, M.L., Burg, T.M., Steeves, T.E., 2012.** Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLoS ONE* 7, e45170.



- Hao, X., Jiang, R., Chen, T., 2011.** Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 27, 611-615.
- Harpending, H.C., 1994.** Signature of Ancient Population Growth in a Low-Resolution Mitochondrial DNA Mismatch Distribution. *Hum. Biol.* 66, 591-600.
- Harris, D.J., 1999.** Molecular systematics and evolution of lacertid lizards. *Natura Croatica* 8, 161-180.
- Harris, D.J., Arnold, E.N., Thomas, R.H., 1998.** Relationships of lacertid lizards (Reptilia : Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 1939-1948.
- Harris, D.J., Batista, V., Lymberakis, P., Carretero, M.A., 2004.** Complex estimates of evolutionary relationships in *Tarentola mauritanica* (Reptilia: Gekkonidae) derived from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30, 855-859.
- Harris, D.J., Carranza, S., Arnold, E.N., Pinho, C., Ferrand, N., 2002.** Complex biogeographical distribution of genetic variation within *Podarcis* wall lizards across the Strait of Gibraltar. *J. Biogeography* 29, 1257-1262.
- Harris, D.J., Pinho, C., Carretero, M.A., 2005.** Determination of genetic diversity within the insular lizard *Podarcis tiliguerta* using mtDNA sequence data, with a reassessment of the phylogeny of *Podarcis*. *Amphibia-Reptilia* 26, 401-407.
- Harris, D.J., Sá-Sousa, P., 2002.** Molecular phylogenetics of Iberian wall lizards (*Podarcis*): is *Podarcis hispanica* a species complex? *Mol. Phylogenet. Evol.* 23, 75-81.
- Harris, J.D., Arnold, N.E., 1999.** Relationships of wall lizards, *Podarcis* (Reptilia: Lacertidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Copeia*, 749-754.
- Hausdorf, B., 2011.** Progress toward a general species concept. *Evolution* 65, 923-931.
- Heathcote, R.J.P., Dawson, D.A., Uller, T., 2015.** Characterisation of nine European wall lizard (*Podarcis muralis*) microsatellite loci of utility across sub-species. *Conservation Genet. Resour.* 7, 85-87.
- Hernandez, P.A., Graham, C.H., Master, L.L., Albert, D.L., 2006.** The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* 29, 773-785.

- Herrera, S., Shank, T.M., 2016.** RAD Sequencing Enables Unprecedented Phylogenetic Resolution and Objective Species Delimitation in Recalcitrant Divergent Taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 100, 70-79.
- Hewitt, G., 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Hewitt, G.M., 2011.** Mediterranean Peninsulas: The Evolution of Hotspots. *Biodiversity Hotspots*. Springer Publishers, Berlin Heidelberg.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., 2005.** Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965-1978.
- Hofman, S., Pabijan, M., Osikowski, A., Litvinchuk, S.N., Szymura, J.M., 2015.** Phylogenetic relationships among four new complete mitogenome sequences of *Pelophylax* (Amphibia: Anura) from the Balkans and Cyprus. *Mitoch. DNA*, 1-4.
- Hofman, S., Spolsky, C., Uzzell, T., Cogălniceanu, D.A.N., Babik, W., Szymura, J.M., 2007.** Phylogeography of the fire-bellied toads *Bombina*: independent Pleistocene histories inferred from mitochondrial genomes. *Mol Ecol* 16, 2301-2316.
- Hoshino, A.A., Bravo, J.P., Nobile, P.M., Morelli, K.A., 2012.** Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In: Caliskan, M. (Ed.), *Genetic Diversity in Microorganisms*. InTech.
- Hsü, K.J., 1972.** Origin of saline giants: A critical review after the discovery of the Mediterranean Evaporite. *Earth-Science Rev.* 8, 371-396.
- Huey, R.B., Pianka, E.R., Schoener, T.W., 1983.** *Lizard ecology: Studies of a Model Organism*. Harvard University Press, Cambridge MA, USA.
- Hurston, H., Voith, L., Bonanno, J., Foufopoulos, J., Pafilis, P., Valakos, E., Anthony, N., 2009.** Effects of fragmentation on genetic diversity in island populations of the Aegean wall lizard *Podarcis erhardii* (Lacertidae, Reptilia). *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 395-405.
- Huyghe, K., Breugelmans, K., All, M., Tadić, Z., Damme, V.R., Vanhooydonck, B., Ckeljau, T., 2009.** Characterization of polymorphic microsatellite markers in the Dalmatian wall lizard *Podarcis melisellensis* (Squamata: Lacertidae). *Mol. Ecol. Res.* 9, 299-301.

- Huyghe, K., Small, M., Vanhooydonck, B., Herrel, A., Tadić, Z., Damme, V.R., Backeljau, T., 2010. Genetic divergence among sympatric colour morphs of the Dalmatian wall lizard (*Podarcis melisellensis*). *Genetica* 138, 387-393.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Summaries, Frequently Asked Questions, and Cross-Chapter Boxes. A Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Isaac, N.J.B., Mallet, J., Mace, G.M., Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 19, 464-469.
- Jablonski, D., Jandzik, D., Mikulíček, P., Džukić, G., Ljubisavljević, K., Tzankov, N., Jelić, D., Thanou, E., Moravec, J., Gvoždík, V., 2016. Contrasting evolutionary histories of the legless lizards slow worms (*Anguis*) shaped by the topography of the Balkan Peninsula. *BMC Evol. Biol.* 16, 1-18.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11, 424-429.
- Jesse, R., Schubart, C.D., Klaus, S., 2010. Identification of a cryptic lineage within *Potamon fluviatile* (Herbst) (Crustacea : Brachyura : Potamidae). *Invertebr. Syst.* 24, 348-356.
- Jezkova, T., Riddle, B.R., Card, D.C., Schield, D.R., Eckstut, M.E., Castoe, T.A., 2015. Genetic consequences of postglacial range expansion in two codistributed rodents (genus *Dipodomys*) depend on ecology and genetic locus. *Mol Ecol* 24, 83-97.
- Joger, U., Fritz, U., Guicking, D., Kalyabina-Hauf, S., Nagy, Z.T., Wink, M., 2007. Phylogeography of western Palaeartic reptiles – Spatial and temporal speciation patterns. *Zool. Anz.* 246, 293-313.

- Jolivet, L., Augier, R., Robin, C., Suc, J., Rouchy, J., 2006.** Lithospheric-scale geodynamic context of the Messinian salinity crisis. *Sediment. Geol.* 188-189, 9-33.
- Joly, S., Stevens, M.I., van Vuuren, B.J., 2007.** Haplotype Networks Can Be Misleading in the Presence of Missing Data. *Syst. Biol.* 56, 857-862.
- Jombart, T., Ahmed, I., 2011.** adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*.
- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010.** Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11, 1-15.
- Jones, G., Aydin, Z., Oxelman, B., 2015.** DISSECT: an assignment-free Bayesian discovery method for species delimitation under the multispecies coalescent. *Bioinformatics* 31, 991-998.
- Jones, G.R., 2015.** Species delimitation and phylogeny estimation under the multispecies coalescent. *bioRxiv*.
- Kaliontzopoulou, A., Brito, J.C., Carretero, M.A., Larbes, S., Harris, D.J., 2008.** Modelling the partially unknown distribution of wall lizards (*Podarcis*) in North Africa: ecological affinities, potential areas of occurrence, and methodological constraints. *Canadian J. Zool.* 86, 992-1001.
- Kaliontzopoulou, A., Pinho, C., Harris, J.D., Carretero, M.A., 2011.** When cryptic diversity blurs the picture: a cautionary tale from Iberian and North African *Podarcis* wall lizards. *Biol. J. Linnean Soc.* 103, 779-800.
- Kamilari, M., Klossa-Kilia, E., Kiliass, G., Sfenthourakis, S., 2014.** Old Aegean palaeoevents driving the diversification of an endemic isopod species (Oniscidea, Trachelipodidae). *Zoologica Scripta* 43, 379-392.
- Kapli, P., Botoni, D., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Avcı, A., Rastegar-Pouyani, N., Fathinia, B., Lymberakis, P., Ahmadzadeh, F., Poulakakis, N., 2013.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the Anatolian lizard *Apathya* (Squamata, Lacertidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 992-1001.

- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., Flouri, T., 2016.** Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. bioRxiv.
- Kapli, P., Poulakakis, N., Lymberakis, P., Mylonas, M., 2011.** A re-analysis of the molecular phylogeny of Lacertidae with currently available data. Basic Appl. Herp. 25, 97-104.
- Karaiskou, N., Tsakogiannis, A., Gkagkavouzis, K., Papika, S., Latsoudis, P., Kavakiotis, I., Pantis, J., Abatzopoulos, T.J., Triantaphyllidis, C., Triantafyllidis, A., 2014.** Greece: A Balkan Subrefuge for a Remnant Red Deer (*Cervus Elaphus*) Population. J. Hered. 105, 334-344.
- Kasapidis, P., Magoulas, A., Mylonas, M., Zouros, E., 2005a.** The phylogeography of the gecko *Cyrtopodion kotschy* (Reptilia: Gekkonidae) in the Aegean archipelago. Mol. Phylogenet. Evol. 35, 612-623.
- Kasapidis, P., Suchentrunk, F., Magoulas, A., Kotoulas, G., 2005b.** 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. Mol. Phylogenet. Evol. 34, 55-66.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013.** MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772-780.
- Kenneth, J.H., Montadert, L., Bernoulli, D., Cita, M.B., Erickson, A., Garrison, R.E., Kidd, R.B., Melieres, F., Muller, C., Wright, R.A., 1977.** History of the Mediterranean salinity crisis. Nature 267, 399-403.
- Kindler, C., Böhme, W., Corti, C., Gvoždík, V., Jablonski, D., Jandzik, D., Metallinou, M., Široký, P., Fritz, U., 2013.** Mitochondrial phylogeography, contact zones and taxonomy of grass snakes (*Natrix natrix*, *N. megalcephala*). Zoologica Scripta 42, 458-472.
- Kissel, C., Laj, C., 1988.** The Tertiary Geodynamical Evolution of the Aegean Arc - a Paleomagnetic Reconstruction. Tectonophysics 146, 183-201.

- Klossa-Kilia, E., Kiliias, G., Tryfonopoulos, G., Koukou, K., Spyros, S., Parmakelis, A., 2006.** Molecular phylogeny of the Greek populations of the genus *Ligidium* (Isopoda, Oniscidea) using three mtDNA gene segments. *Zool. Scr.* 35, 459-472.
- Knapp, M., Hofreiter, M., 2010.** Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives. *Genes* 1, 227-243.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989.** Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6196-6200.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., Mayrose, I., 2015.** Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Res.* 15, 1179-1191.
- Korábek, O., Juříčková, L., Petrušek, A., 2014.** Resurrecting *Helix straminea*, a forgotten escargot with trans-Adriatic distribution: first insights into the genetic variation within the genus *Helix* (Gastropoda: Pulmonata). *Zool. J. Linnean Soc.* 171, 72-91.
- Kordges, T., Hemmer, G., 1987.** Studies on Reptiles in Greek Delta areas, *Congres international sur la zoogeographie et l' ecologie de la Grece et des regions avoisinantes.* *Biologia Gallo-Hellenica* 13, 83-88.
- Kornilios, P., Poulakakis, N., Mylonas, M., Vardinoyannis, K., 2009.** The phylogeny and biogeography of the genus *Zonites* Montfort, 1810 (Gastropoda: Pulmonata): preliminary evidence from mitochondrial data. *J. Mollusc. Stud.* 75, 109-117.
- Kornilios, P., Thanou, E., Kapli, P., Parmakelis, A., Chatzaki, M., 2016.** Peeking through the trapdoor: historical biogeography of the Aegean endemic spider *Cyrtocarenum* Ausserer, 1871 with an estimation of mtDNA substitution rates for Mygalomorphae. *Mol. Phylogenet. Evol.*
- Kotsakiozi, P., Parmakelis, A., Giokas, S., Papanikolaou, I., Valakos, E.D., 2012.** Mitochondrial phylogeny and biogeographic history of the Greek endemic land-snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 62, 681-692.

- Kozlov, A.M., Aberer, A.J., Stamatakis, A., 2015.** ExaML Version 3: A Tool for Phylogenomic Analyses on Supercomputers. *Bioinformatics*.
- Krijgsman, W., Hilgen, F.J., Raffi, I., Sierro, F.J., Wilson, D.S., 1999.** Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400, 652-655.
- Krijgsman, W., Stoica, M., Vasiliev, I., Popov, V.V., 2010.** Rise and fall of the Paratethys Sea during the Messinian Salinity Crisis. *Earth Planet. Sci. Letters* 290, 183-191.
- Kuhlemann, J., 2007.** Paleogeographic and paleotopographic evolution of the Swiss and Eastern Alps since the Oligocene. *Glob. Planet. Change* 58, 224-236.
- Kyriazi, P., Poulakakis, N., Parmakelis, A., Crochet, P.A., Moravec, J., Rastegar-Pouyani, N., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M., Lymberakis, P., 2008.** Mitochondrial DNA reveals the genealogical history of the snake-eyed lizards (*Ophisops elegans* and *O. occidentalis*) (Sauria: Lacertidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 795-805.
- Lambeck, K., 1996.** Sea-level change and shore-line evolution in Aegean Greece since upper palaeolithic time. *Antiquity* 70, 588-611.
- Lanza, B., Boscherini, S., 2000.** The gender of the genera *Podarcis* Wagler 1830 (Lacertidae), *Pelamis* Daudin 1803 (Hydrophiidae) and *Uropeltis* Cuvier 1829 (Uropeltidae). *Trop. Zool.* 13, 327-329.
- Leaché, A.D., Chavez, A.S., Jones, L.N., Grummer, J.A., Gottscho, A.D., Linkem, C.W., 2015.** Phylogenomics of Phrynosomatid Lizards: Conflicting Signals from Sequence Capture versus Restriction Site Associated DNA Sequencing. *Genome Biol. Evol.* 7, 706-719.
- Leaché, A.D., Fujita, M.K., 2010.** Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 277, 3071-3077.
- Leaché, A.D., Fujita, M.K., Minin, V.N., Bouckaert, R.R., 2014.** Species Delimitation using Genome-Wide SNP Data. *Syst. Biol.* 63, 534-542.
- Levinson, G., Gutman, G.A., 1987.** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4, 203-221.
- Librado, P., Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.

- Lopatin, I.K., Matvejev, S.D., Pešić, S., 1995.** Kratka zoogeografija sa osnovama biogeografije i ekologije bioma Balkanskog poluostrva. Ljubljana.
- Losos, J.B., 2009.** Lizards in an evolutionary tree: ecology and adaptive radiation of *Anoles*. University of California Press, Berkeley, CA, USA.
- Lymberakis, P., Poulakakis, N., 2010.** Three Continents Claiming an Archipelago: The Evolution of Aegean's Herpetofaunal Diversity. *Diversity* 2, 233-255.
- Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthalou, G., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M., 2007.** Mitochondrial phylogeography of *Rana (Pelophylax)* populations in the Eastern Mediterranean region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 115-125.
- Mačát, Z., Starcová, M., Červenka, J., Jablonski, D., 2014.** A molecular assessment and first record of *Tarentola mauritanica* (Squamata: Phyllodactylidae) on Corfu, Greece. *Salamandra* 50, 172-176.
- Mamanova, L., Coffey, A.J., Scott, C.E., Kozarewa, I., Turner, E.H., Kumar, A., Howard, E., Shendure, J., Turner, D.J., 2010.** Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat. Meth.* 7, 111-118.
- Mantziou, G., Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Mylonas, M., 2004.** The inter- and intraspecific status of Aegean *Mauremys rivulata* (Chelonia: Bataguridae) as inferred by mitochondrial DNA sequences. *Herpetol. J.* 14, 35-45.
- Marzahn, E., Mayer, W., Joger, U., Ilgaz, Ç., Jablonski, D., Kindler, C., Kumlutaş, Y., Nistri, A., Schneeweiss, N., Vamberger, M., Žagar, A., Fritz, U., 2016.** Phylogeography of the *Lacerta viridis* complex: mitochondrial and nuclear markers provide taxonomic insights. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 54, 85-105.
- Mayden, R.L., 1997.** A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. . In: Claridge, M.F., Dawah, H.A., Wilson, M.R. (Eds.), *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp. 381-424.
- Mayer, W., Benyr, G., 1995.** Albumin-Evolution und Phylogenese in der Familie Lacertidae. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 95, 621-648.



- Mayer, W., Beyerlein, P., 2001.** Genetic differentiation of the *Lacerta viridis/bilineata* complex and of *Lacerta trilineata* in Greece: mitochondrial DNA sequences. *Mertensiella* 13, 52-59.
- Mayer, W., Pavlicev, M., 2007.** The phylogeny of the family Lacertidae (Reptilia) based on nuclear DNA sequences: Convergent adaptations to arid habitats within the subfamily Eremiainae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 1155-1163.
- McCormack, J.E., Hird, S.M., Zellmer, A.J., Carstens, B.C., Brumfield, R.T., 2013.** Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 526-538.
- McGuire, J.A., Linkem, C.W., Koo, M.S., Hutchison, D.W., Lappin, A.K., Orange, D.I., Lemos-Espinal, J., Riddle, B.R., Jaeger, J.R., 2007.** Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards. *Evolution* 61, 2879-2897.
- Mendes, J., Harris, D.J., Carranza, S., Salvi, D., 2016.** Evaluating the phylogenetic signal limit from mitogenomes, slow evolving nuclear genes, and the concatenation approach. New insights into the Lacertini radiation using fast evolving nuclear genes and species trees. *Mol. Phylogenet. Evol.* 100, 254-267.
- Meulenkamp, J.E., 1985.** Aspects of the Late Cenozoic Evolution of the Aegean Region. In: Stanley, D.J., Wezel, F.C. (Eds.), *Geological evolution of the Mediterranean Basin*. Springer, New York, pp. 307-321.
- Michaelides, S., Cornish, N., Griffiths, R., Groombridge, J., Zajac, N., Walters, G.J., Aubret, F., While, G.M., Uller, T., 2015.** Phylogeography and conservation genetics of the common wall lizard, *Podarcis muralis*, on islands at its northern range. *PloS One* 10.
- Michaux, J.R., Libois, R., Paradis, E., Filippucci, M.G., 2004.** Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 788-798.
- Miller, M.R., Dunham, J.P., Amores, A., Cresko, W.A., Johnson, E.A., 2007.** Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res.* 17, 240-248.

- Moritz, C., Hillis, D.M., 1996.** Molecular Systematics: Context and Controversies. In: Moritz, C., Hillis, D.M., Mable, B.K. (Eds.), Molecular Systematics. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A., pp. 1-12.
- Musilová, R., Zavadil, V., Marková, S., Kotlík, P., 2010.** Relics of the Europe's warm past: Phylogeography of the Aesculapian snake. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 1245-1252.
- Nei, M., 1987.** Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- Nelson, G.J., 1970.** Outline of a Theory of Comparative Biology. *Syst. Biol.* 19, 373-384.
- Nembrini, M., Oppliger, A., 2003.** Characterization of microsatellite loci in the wall lizard *Podarcis muralis* (Sauria: Lacertidae). *Mol. Ecol. Notes* 3.
- Neubauer, T.A., Harzhauser, M., Kroh, A., Georgopoulou, E., Mandic, O., 2015.** A gastropod-based biogeographic scheme for the European Neogene freshwater systems. *Earth-Science Reviews* 143, 98-116.
- Nunes, V.L., Miraldo, A., Beaumont, M.A., Butlin, R.K., Paulo, O.S., 2011.** Association of Mc1r variants with ecologically relevant phenotypes in the European ocellated lizard, *Lacerta lepida*. *J. Evol. Biol.* 24, 2289-2298.
- O'Meara, B.C., 2010.** New Heuristic Methods for Joint Species Delimitation and Species Tree Inference. *Syst. Biol.* 59, 59-73.
- Odierna, G., Kupriyanova, L., Capriglione, T., Olmo, E., 1992.** Further data on the sex chromosomes of Lacertidae and a hypothesis on their evolutionary trend. *Amphibia-Reptilia* 14, 1-11.
- Oliverio, M., Bologna, M.A., Mariottini, P., 2000.** Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* Wagler, 1830 and *Teira* Gray, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *J. Biogeography* 27, 1403-1420.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M., 2010.** The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* 7, 1-14.
- Palumbi, S.R., 1996.** Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), Molecular Systematics. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 205-248.

- Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Keskin, B., Vogler, A.P., 2009.** Comparative phylogeography of tenebrionid beetles in the Aegean archipelago: the effect of dispersal ability and habitat preference. *Mol Ecol* 18, 2503-2517.
- Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Vogler, A.P., 2010.** Revisiting the Insect Mitochondrial Molecular Clock: The Mid-Aegean Trench Calibration. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1659-1672.
- Papadopoulou, A., Bergsten, J., Fujisawa, T., Monaghan, M.T., Barraclough, T.G., Vogler, A.P., 2008.** Speciation and DNA barcodes: testing the effects of dispersal on the formation of discrete sequence clusters. *Phil. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 363, 2987-2996.
- Parmakelis, A., Klossa-Kilia, E., Kiliass, G., Triantis, K.A., Sfenthourakis, S., 2008.** Increased molecular divergence of two endemic *Trachelipus* (Isopoda, Oniscidea) species from Greece reveals patterns not congruent with current taxonomy. *Biol. J. Linnean Soc.* 95, 361-370.
- Parmakelis, A., Kotsakiozi, P., Stathi, I., Poulikarakou, S., Fet, V., 2013.** Hidden diversity of *Euscorpius* (Scorpiones: Euscorpiidae) in Greece revealed by multilocus species-delimitation approaches. *Biol. J. Linnean Soc.* 110, 728-748.
- Parmakelis, A., Stathi, I., Chatzaki, M., Simaiakis, S., Spanos, L., Louis, C., Mylonas, M., 2006a.** Evolution of *Mesobuthus gibbosus* (Brulle, 1832) (Scorpiones: Buthidae) in the northeastern Mediterranean region. *Mol Ecol* 15, 2883-2894.
- Parmakelis, A., Stathi, I., Spanos, L., Louis, C., Mylonas, M., 2006b.** Phylogeography of *Iurus dufourei* (Brulle, 1832) (Scorpiones, Iuridae). *J. Biogeography* 33, 251-260.
- Paulo, O.S., Pinheiro, J., Miraldo, A., Bruford, M.W., Jordan, W.C., Nichols, R.A., 2008.** The role of vicariance vs. dispersal in shaping genetic patterns in ocellated lizard species in the western Mediterranean. *Mol Ecol* 17, 1535-1551.
- Pavlicev, M., Mayer, W., 2009.** Fast radiation of the subfamily Lacertinae (Reptilia: Lacertidae): History or methodical artefact? *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 727-734.
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M., Townsend, P.A., 2007.** Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *J. Biogeogr.* 34, 102-117.

- Pelletier, T.A., Crisafulli, C., Wagner, S.J., Zellmer, A.J., Carstens, B.C., 2015.** Historical Species Distribution Models Predict Species Limits in Western *Plethodon* Salamanders. *Syst. Biol.* 64, 909-925.
- Pereira, C., Couto, A., Luís, C., Costa, D., Mourão, S., Pinho, C., 2013.** Twenty-one new sequence markers for population genetics, species delimitation and phylogenetics in wall lizards (*Podarcis* spp.). *BMC Res. Notes* 6, 299.
- Perissoratis, C., Conispoliatis, N., 2003.** The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). *Mar. Geol.* 196, 145-156.
- Peterson, A.T., 2011.** Ecological niche conservatism: a time-structured review of evidence. *J. Biogeography* 38, 817-827.
- Peterson, B.K., Weber, J.N., Kay, E.H., Fisher, H.S., Hoekstra, H.E., 2012.** Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for *De Novo* SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE* 7, e37135.
- Phillips, J.S., Dudik, M., Schapire, E.R., 2004.** A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proc. 21st ICML. ACM, Banff, Alberta, Canada*, p. 83.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E., 2006.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model* 190, 231-259.
- Phillips, S.J., Dudík, M., 2008.** Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31, 161-175.
- Pianka, E.R., Vitt, L.J., 2003.** *Lizards: windows to the evolution of diversity.* University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, USA.
- Pinho, C., Ferrand, N., Harris, D.J., 2006.** Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 266-273.
- Pinho, C., Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Harris, D.J., Ferrand, N., 2009.** Genetic admixture between the Iberian endemic lizards *Podarcis bocagei* and *Podarcis carbonelli* : evidence for limited natural hybridization and a bimodal hybrid zone. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 47, 368-377.

- Pinho, C., Rocha, S., Carvalho, B.M., Lopes, S., Mourão, S., Vallinoto, M., Brunes, T.O., Haddad, C.F.B., Gonçalves, H., Sequeira, F., Ferrand, N., 2010.** New primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. *Conservation Genet. Resour.* 2, 181-185.
- Pinho, C., Sequeira, F., Godinho, R., Harris, D.J., Ferrand, N., 2004.** Isolation and characterization of nine microsatellite loci in *Podarcis bocagei* (Squamata: Lacertidae). *Mol. Ecol. Notes* 4, 268-288.
- Podnar, M., Madaric, B.B., Mayer, W., 2014.** Non concordant phylogeographical patterns of three widely codistributed endemic Western Balkans lacertid lizards (Reptilia, Lacertidae) shaped by specific habitat requirements and different responses to Pleistocene climatic oscillations. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 52, 119-129.
- Podnar, M., Mayer, W., Tvrtkovic, N., 2005.** Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Mol Ecol* 14, 575-588.
- Podnar, M., Mayer, W., Tvrtković, N., 2004.** Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, (Lacertidae). *Org. Divers. Evol.* 4, 307-317.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D., Vogler, A.P., 2006.** Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Syst. Biol.* 55, 595-609.
- Popov, S.V., Rögl, F., Rozanov, A.Y., Steininger, F.F., Shcherba, I.G., Kovac, M., 2004.** Lithological-Paleogeographic maps of Paratethys. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Porfirio, L.L., Harris, R.M.B., Lefroy, E.C., Hugh, S., Gould, S.F., Lee, G., Bindoff, N.L., Mackey, B., 2014.** Improving the Use of Species Distribution Models in Conservation Planning and Management under Climate Change. *PLoS ONE* 9, e113749.
- Poulakakis, N., Goulielmos, G., Antoniou, A., Zouros, E., Mylonas, M., 2005a.** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the wall lizard *Podarcis erhardii* (Squamata: Lacertidae). *Mol. Ecol. Notes* 5, 549-551.

- Poulakakis, N., Kapli, P., LyMBERAKIS, P., Trichas, A., Vardinoyannis, K., Sfenthourakis, S., Mylonas, M., 2014.** A review of phylogeographic analyses of animal taxa from the Aegean and surrounding regions. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 53, 18-32.
- Poulakakis, N., LyMBERAKIS, P., Antoniou, A., Chalkia, D., Zouros, E., Mylonas, M., Valakos, E., 2003.** Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizard *Podarcis erhardii* (Squamata : Lacertidae). *Mol. Phyl. Evol.* 28, 38-46.
- Poulakakis, N., LyMBERAKIS, P., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M., 2005b.** Phylogenetic relationships and evolutionary history of snake-eyed skink *Ablepharus kitaibelii* (Sauria: Scincidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 245-256.
- Poulakakis, N., LyMBERAKIS, P., Valakos, E., Pafilis, P., Zouros, E., Mylonas, M., 2005c.** Phylogeography of Balkan wall lizard (*Podarcis taurica*) and its relatives inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Ecol* 14, 2433-2443.
- Poulakakis, N., LyMBERAKIS, P., Valakos, E., Zouros, E., Mylonas, M., 2005d.** Phylogenetic relationships and biogeography of *Podarcis* species from the Balkan Peninsula, by bayesian and maximum likelihood analyses of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 845-857.
- Poulakakis, N., Pakaki, V., Mylonas, M., LyMBERAKIS, P., 2008.** Molecular phylogeny of the Greek legless skink *Ophiomorus punctatissimus* (Squamata: Scincidae): The impact of the Mid-Aegean trench in its phylogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 396-402.
- Poulakakis, N., Sfenthourakis, S., 2008.** Molecular phylogeny and phylogeography of the Greek populations of the genus *Orthometopon* (Isopoda, Oniscidea) based on mitochondrial DNA sequences. *Zool. J. Linnean Soc.* 152, 707-715.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., McNicol, J.W., Machray, G.C., Doyle, J.J., Tingey, S.V., Rafalski, J.A., 1995.** Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Curr. Biol.* 5, 1023-1029.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Pritchard, J.K., Wen, X., Falush, D., 2004.** Documentation for structure software: Version 2.3. University of Chicago Press, Chicago.

- Psonis, N., Vardinoyannis, K., Mylonas, M., Poulakakis, N., 2015a.** Evaluation of the taxonomy of *Helix cincta* (Muller, 1774) and *Helix nucula* (Mousson, 1854); insights using mitochondrial DNA sequence data. *J. Nat. History* 49, 383-392.
- Psonis, N., Vardinoyannis, K., Mylonas, M., Poulakakis, N., 2015b.** Unraveling the evolutionary history of the *Chilostoma* Fitzinger, 1833 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) lineages in Greece. *Mol. Phylogenet. Evol.* 91, 210-225.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., 2012.** ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol*, 1864-1877.
- Pyron, R.A., Burbrink, F.T., Wiens, J.J., 2013.** A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol. Biol.* 13, 1471-2148.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2014.** Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F., Navarro, A., 2008.** Statistical Power Analysis of Neutrality Tests Under Demographic Expansions, Contractions and Bottlenecks With Recombination. *Genetics* 179, 555-567.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002.** Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2092-2100.
- Rannala, B., Yang, Z., 2013.** Improved Reversible Jump Algorithms for Bayesian Species Delimitation. *Genetics* 194, 245-253.
- Rato, C., Harris, D.J., Carranza, S., Machado, L., Perera, A., 2016.** The taxonomy of the *Tarentola mauritanica* species complex (Gekkota: Phyllodactylidae): Bayesian species delimitation supports six candidate species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 94, Part A, 271-278.
- Rato, C., Harris, D.J., Perera, A., Carvalho, S.B., Carretero, M.A., Rödder, D., 2015.** A Combination of Divergence and Conservatism in the Niche Evolution of the Moorish Gecko, *Tarentola mauritanica* (Gekkota: Phyllodactylidae). *PLoS ONE* 10, e0127980.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995.** Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.

- Reed, J.M., Krystufek, B., Eastwood, W.J., 2004.** The physical geography of the Balkans and nomenclature of place names. In: Griffiths, H.I. (Ed.), *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 9-23.
- Richard, M., Stevens, A.M., Le Henanff, M., Coulon, A., Lourdais, O., Clobert, J., 2012.** Fourteen new polymorphic microsatellite loci for the wall lizard *Podarcis muralis* (Sauria: Lacertidae). In : Abreu et al. (2012). Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2011-30 November 2011. *Mol. Ecol. Res.* 12, 374-376.
- Richardson, P., 2010.** Special Issue: Next Generation DNA Sequencing. *Genes* 1, 385-387.
- Rittmeyer, E.N., Austin, C.C., 2015.** Combined next-generation sequencing and morphology reveal fine-scale speciation in Crocodile Skinks (Squamata: Scincidae: *Tribolonotus*). *Mol Ecol* 24, 466-483.
- Robertson, A.H.F., Dixon, J.E., 1984.** Introduction: aspects of the geological evolution of the Eastern Mediterranean. *Geol. Soc. London Spec. Publ.* 17, 1-74.
- Rodríguez, V., Brown, R.P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M.M., 2013a.** Multilocus genetic diversity and historical biogeography of the endemic wall lizard from Ibiza and Formentera, *Podarcis pityusensis* (Squamata: Lacertidae). *Mol Ecol* 22, 4829-4841.
- Rodríguez, V., Brown, R.P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Picornell, A., Castro, J.A., Ramon, C., 2013b.** Genetic diversity and historical biogeography of the Maltese wall lizard, *Podarcis filfolensis* (Squamata: Lacertidae). *Conserv. Genet.* 15, 295-304.
- Rogers, A.R., 1995.** Genetic Evidence for a Pleistocene Population Explosion. *Evolution* 49, 608-615.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992.** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.
- Rögl, F., 1998.** Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 99A, 279-310.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012.** MrBayes 3.2: Efficient Bayesian



Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Syst. Biol.* 61, 539-542.

**Rosenberg, N.A., 2004.** *distruct*: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes* 4, 137-138.

**Runemark, A., Gabirot, M., Bensch, S., Svensson, E.I., MÍN, J., Pafilis, P., Valakos, E.D., Hansson, B., 2008.** Cross-species testing of 27 pre-existing microsatellites in *Podarcis gaigeae* and *Podarcis hispanica* (Squamata: Lacertidae). *Mol. Ecol. Res.* 8, 1367-1370.

**Runemark, A., Hansson, B., Pafilis, P., Valakos, E.D., Svensson, E.I., 2010.** Island biology and morphological divergence of the Skyros wall lizard *Podarcis gaigeae*: a combined role for local selection and genetic drift on color morph frequency divergence? *BMC Evol. Biol.* 10, 1-15.

**Runemark, A., Hey, J., Hansson, B., Svensson, E.I., 2012.** Vicariance divergence and gene flow among islet populations of an endemic lizard. *Mol Ecol* 21, 117-129.

**Sagonas, K., Poulakakis, N., Lymberakis, P., Parmakelis, A., Pafilis, P., Valakos, E.D., 2014.** Molecular systematics and historical biogeography of the green lizards (*Lacerta*) in Greece: Insights from mitochondrial and nuclear DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 76C, 144-154.

**Saitou, N., Nei, M., 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

**Salvi, D., Harris, D.J., Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Pinho, C., 2013.** Persistence across Pleistocene ice ages in Mediterranean and extra-Mediterranean refugia: phylogeographic insights from the common wall lizard. *BMC Evol. Biol.* 13, 147.

**Salvi, D., Schembri, P.J., Sciberras, A., Harris, J.D., 2014.** Evolutionary history of the Maltese wall lizard *Podarcis filfolensis*: insights on the 'Expansion-Contraction' model of Pleistocene biogeography. *Mol Ecol*, 1167-1187.

**Savić, I., 2008.** Diversification of the Balkan fauna: its origine, historical development and present status. *Adv. Arachn. Dev. Biol.* 12, 57-78.

**Schilthuizen, M., Gittenberger, E., Gultyaev, A.P., 1995.** Phylogenetic Relationships Inferred from the Sequence and Secondary Structure of ITS1 rRNA in *Albinaria* and

Putative *Isabellaria* Species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). Mol. Phylogenet. Evol. 4, 457-462.

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

**Schulte, U., Veith, M., Hochkirch, A., 2012.** Rapid genetic assimilation of native wall lizard populations (*Podarcis muralis*) through extensive hybridization with introduced lineages. Mol Ecol 21, 4313-4326.

**Schulte, U., Veith, M., Mingo, V., Modica, C., Hochkirch, A., 2013.** Strong genetic differentiation due to multiple founder events during a recent range expansion of an introduced wall lizard population. Biol. Invasions 15, 2639-2649.

**Schwarz, G., 1978.** Estimating the dimension of a model. Ann. Stat. 6, 461-464.

**Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N.J., Hewitt, G.M., 2001.** DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. Mol Ecol 10, 2187-2198.

**She, J.X., Autem, M., Kotulas, G., Pasteur, N., Bonhomme, F., 1987.** Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts, Soleidae). Biol. J. Linnean Soc. 32, 357-371.

**Sillero, N., Campos, J., Bonardi, A., Corti, C., Creemers, R., Crochet, P., Crnobrnja-Isailović, J., Denoël, M., Ficetola, G.F., Gonçalves, J., Kuzmin, S., Lymberakis, P., de Pous, P., Rodríguez, A., Sindaco, R., Speybroeck, J., Toxopeus, B., Vieites, D.R., Vences, M., 2014.** Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. Amphibia-Reptilia 35, 1-31.

**Simaiakis, S., Dimopoulou, A., Mitrakos, A., Mylonas, M., Parmakelis, A., 2012.** The evolutionary history of the Mediterranean centipede *Scolopendra cingulata* (Latreille, 1829) (Chilopoda: Scolopendridae) across the Aegean archipelago. Biol. J. Linnean Soc. 105.

**Sindaco, R., Jeremcenko, V.K., 2008.** The reptiles of the Western Palearctic. Edizioni Belvedere, Latina (Italy).

**Sindaco, R., Venchi, A., C., G., 2013.** The Reptiles of the Western Palearctic, Volume 2 Annotated Checklist and Distributional Atlas of the Snakes of Europe, North Africa, Middle East and Central Asia, with an Update to Volume 1. Edizioni Belvedere.

**Skourtanioti, E., Kapli, P., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Avcı, A., Ahmadzadeh, F., Crnobrnja-Isailović, J., Gherghel, I., Lymberakis, P., Poulakakis, N., 2016.** A reinvestigation of phylogeny and divergence times of the *Ablepharus kitaibelii* species complex (Sauria, Scincidae) based on mtDNA and nuDNA genes. Mol. Phylogenet. Evol. 103, 199-214.

**Sluys, R., Solà, E., Gritzalis, K., Vila-Farré, M., Mateos, E., Riutort, M., 2013.** Integrative delineation of species of Mediterranean freshwater planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Dugesiidae). Zool. J. Linnean Soc. 169, 523-547.

**Solà, E., Sluys, R., Gritzalis, K., Riutort, M., 2013.** Fluvial basin history in the northeastern Mediterranean region underlies dispersal and speciation patterns in the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesiidae). Mol. Phylogenet. Evol. 66, 877-888.

**Soranzo, N., Provan, J., Powell, W., 1999.** An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. Genome 42, 158-161.

**Sotiropoulos, K., Eleftherakos, K., Džukić, G., Kalezić, M.L., Legakis, A., Polymeni, R.M., 2007.** Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 45, 211-226.

**Stamatakis, A., 2014.** RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. Bioinformatics 30, 1312-1313.

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

- Svenning, J., Fløjgaard, C., Marske, K.A., Nógues-Bravo, D., Normand, S., 2011.** Applications of species distribution modeling to paleobiology. *Quat. Sci. Rev.* 30, 2930-2947.
- Swofford, D.L., 2002.** PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M., 1996.** Phylogenetic inference. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 407-514.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F., 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol Ecol* 7, 453-464.
- Tajima, F., 1989.** Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tamura, K., Nei, M., 1993.** Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial-DNA in Humans and Chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Brown, R.P., Picornell, A., Castro, J.A., Ramon, M.M., 2009.** Foundations for conservation of intraspecific genetic diversity revealed by analysis of phylogeographical structure in the endangered endemic lizard *Podarcis lilfordi*. *Divers. Distrib.* 15, 207-221.
- Terrasa, B., Picornell, A., Castro, J.A., Ramon, M.M., 2004.** Genetic variation within endemic *Podarcis* lizards from the Balearic Islands inferred from partial Cytochrome b sequences. *Amphibia-Reptilia* 25, 407-414.
- Thanou, E., Fraguedakis-Tsolis, S., Chondropoulos, B., 2005.** mtDNA variation and evaluation of phylogenetic relationships among karyotypically polymorphic populations of *Microtus (Terricola) thomasi* (Arvicolidae, Rodentia) from Greece. *Biol. J. Linnean Soc.* 84, 55-68.

- Thanou, E., Giokas, S., Kornilios, P., 2014.** Phylogeography and genetic structure of the slow worms *Anguis cephallonica* and *Anguis graeca* (Squamata: Anguinae) from the southern Balkan Peninsula. *Amphibia-Reptilia* 35, 263-269.
- Thanou, E., Tryfonopoulos, G., Chondropoulos, B., Fragedakis-Tsolis, S., 2012.** Comparative phylogeography of the five Greek vole species infers the existence of multiple South Balkan subrefugia. *Italian J. Zool.* 79.
- Tiedemann, F., Henle, K., 1986.** *Podarcis melisellensis* (Braun, 1877)- Adriatische Mauereidesche, Karstläufer. . In: Böhme, W. (Ed.), "Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas" Band 2/II Echsen (Sauria) III (Lacertidae III: *Podarcis*) AULA-Verlag Wiensbaden, pp. 111-141.
- Toonen, R.J., Hughes, S., 2001.** Increased throughput for fragment analysis on an ABI PRISM 377 automated sequencer using a membrane comb and STRand software. *Biotechniques* 31, 1320-1324.
- Tryfonopoulos, G., Thanou, E., Chondropoulos, B., Fragedakis-Tsolis, S., 2008.** mtDNA analysis reveals the ongoing speciation on Greek populations of *Microtus (Terricola) thomasi* (Arvicolidae, Rodentia). *Biol. J. Linnean Soc.* 95, 117-130.
- Tryfonopoulos, G., Thanou, E., Fragedakis-Tsolis, S., Chondropoulos, B., 2010.** New data on the distribution and genetic structure of Greek moles of the genus *Talpa* (Mammalia, Talpidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 48, 188-193.
- Uetz, P., Hošek, J., 2016.** The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, accessed January 17, 2016.
- Uit de Weerd, D.R., Piel, W.H., Gittenberger, E., 2004.** Widespread polyphyly among Alopinae snail genera: when phylogeny mirrors biogeography more closely than morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 533-548.
- Uit de Weerd, D.R., Schneider, D., Gittenberger, E., 2005.** The provenance of the Greek land snail species *Isabellaria pharsalica*: molecular evidence of recent passive long-distance dispersal. *J. Biogeography* 32, 1571-1581.

- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomovic, L., Crnobrnja-Isailovic, J., Fumagalli, L., Mayer, W., 2008. Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): Evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 1116-1128.
- Vähä, J., Erkinaro, J., Niemelä, E., Primmer, C.R., 2007. Life-history and habitat features influence the within-river genetic structure of Atlantic salmon. *Mol Ecol* 16, 2638-2654.
- Valakos, E., Mylonas, M., 1992. Distribution and ecological aspects of the herpetofauna of Strofades Islands (Ionian Archipelago, Greece). *HERPETOZOA* 5, 33-39.
- Valakos, E., Pafilis, P., Sotiropoulos, K., Lymberakis, P., Maragou, P., Foufopoulos, J., 2008. The Amphibians and Reptiles of Greece. Chimaira, Frankfurt am Main.
- Valakos, E.D., Kourkouli, A., Skopeliti, M., Pafilis, P., Poulakakis, N., Voutsas, I.F., Lymberakis, P., Simou, C., Voelter, W., Tsitsilonis, O.E., 2007. Combining immunological and molecular data to assess phylogenetic relations of some Greek *Podarcis* species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 147, 1-10.
- van Andel, T.H., Shackleton, J.C., 1982. Late Paleolithic and Mesolithic Coastlines of Greece and the Aegean. *J. Field Archaeology* 9, 445-454.
- van Moorsel, C.H.M., Dijkstra, E.G.M., Gittenberger, E., 2000. Molecular Evidence for Repetitive Parallel Evolution of Shell Structure in Clausiliidae (Gastropoda, Pulmonata). *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 200-208.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535-538.
- Vasconcelos, R., Harris, D.J., Carretero, M.A., 2006. Genetic diversity within Corsican and Sardinian specimens of the Tyrrhenian Wall Lizard, *Podarcis tiliguerta*, estimated using mtDNA sequences. In: Corti C., L.C.P.B.M. (Ed.), *Mainland and insular lacertid lizards: a mediterranean perspective*. Firenze University press, Florence, pp. 199-207.
- Vences, M., Sanchez, E., Hauswaldt, J.S., Eikelmann, D., Rodríguez, A., Carranza, S., Donaire, D., Gehara, M., Helfer, V., Lötters, S., Werner, P., Schulz, S., Steinfartz, S., 2014. Nuclear and mitochondrial multilocus phylogeny and survey of alkaloid content in

true salamanders of the genus *Salamandra* (Salamandridae). Mol. Phylogenet. Evol. 73, 208-216.

**Venczel, M., 2006.** Lizards from the late Miocene of Polgárdi (W-Hungary). Nymphaea 33.

**Wagler, J.G., 1830.** Natiirliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Saugethiere und Vogel. Cotta'sche Buchhandlung, Miinchen, Stuttgart, Tubingen.

**Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984.** Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. Evolution 38, 1358-1370.

**Wellenreuther, M., Runemark, A., 2009.** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the Skyros wall lizard *Podarcis gaigeae* (Squamata: Lacertidae). Mol. Ecol. Res. 9, 1005-1008.

**Whitfield, J., 2007.** Linnaeus at 300: We are family. Nature 446, 247-249.

**Wielstra, B., Crnobrnja-Isailovic, J., Litvinchuk, S., Reijnen, B., Skidmore, A., Sotiropoulos, K., Toxopeus, A., Tzankov, N., Vukov, T., Arntzen, J.W., 2013.** Tracing glacial refugia of *Triturus* newts based on mitochondrial DNA phylogeography and species distribution modeling. Front. Zool. 10, 13.

**Wiens, J.J., Graham, C.H., 2005.** Niche conservatism: Integrating evolution, ecology, and conservation biology. Annu Rev Ecol Evol S 36, 519-539.

**Wiley, E.O., 1988.** Vicariance Biogeography. Ann. Rev. Ecol. Syst. 19, 513-542.

**Wiley, E.O., Lieberman, B.S., 2011.** Phylogenetics. Wiley-Blackwell, New York.

**Yang, Z., 2006.** Computational Molecular Evolution. Oxford University Press.

**Yang, Z., 2015.** The BPP program for species tree estimation and species delimitation. Curr. Zool. 61, 854-865.

**Yang, Z., Rannala, B., 2010.** Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 9264-9269.

**Yang, Z., Rannala, B., 2014.** Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. Mol. Biol. Evol. 31, 3125-3135.

**Zachos, J.C., Dickens, G.R., Zeebe, R.E., 2008.** An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. Nature 451, 279-283.

Zelilidis, A., Kontopoulos, N., Avramidis, P., Piper, D.J.W., 1998. Tectonic and sedimentological evolution of the Pliocene–Quaternary basins of Zakynthos island, Greece: case study of the transition from compressional to extensional tectonics. *Basin Res.* 10, 393-408.

Zhang, C., Rannala, B., Yang, Z., 2014. Bayesian species delimitation can be robust to guide tree inference errors. *Syst. Biol.* 63, 993-1004.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A., 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29, 2869-2876.

Zhou, W., Wen, Y., Fu, J.Z., Xu, Y., Jin, J., Ding, L.I., Min, M., Che, J., Zhang, Y., 2012. Speciation in the *Rana chensinensis* species complex and its relationship to the uplift of the Qinghai–Tibetan Plateau. *Mol Ecol* 21, 960-973.

Zinenko, O., Sovic, M., Joger, U., Gibbs, H.L., 2016. Hybrid origin of European Vipers (*Vipera magnifica* and *Vipera orlovi*) from the Caucasus determined using genomic scale DNA markers. *BMC Evol. Biol.* 16, 1-13.

Zinenko, O., Stümpel, N., Mazanaeva, L., Bakiev, A., Shiryaev, K., Pavlov, A., Kotenko, T., Kukushkin, O., Chikin, Y., Duisebayeva, T., Nilson, G., Orlov, N.L., Tuniyev, S., Ananjeva, N.B., Murphy, R.W., Joger, U., 2015. Mitochondrial phylogeny shows multiple independent ecological transitions and northern dispersion despite of Pleistocene glaciations in meadow and steppe vipers (*Vipera ursinii* and *Vipera renardi*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 84, 85-100.

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



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

---

I: Πληροφορίες δειγμάτων

II: Σύνολα δειγμάτων

III: Συμπληρωματικά αποτελέσματα

IV: Διάχυση αποτελεσμάτων

## Παράρτημα I

Κατάλογος δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή με αλφαβητική κατά ταχον σειρά, καθώς και κατάλογος αλληλουχιών που ελήφθησαν από τη διαδικτυακή βάση δεδομένων GenBank (κάτω από την οριζόντια μπάρα). Οι πληροφορίες που φαίνονται ανά δείγμα αντιστοιχούν κατά σειρά στον κωδικό του δείγματος, στο όνομα του ταχον, στον αριθμό κατάθεσης δείγματος (voucher) του ΜΦΙΚ ή στον κωδικό δείγματος (isolate) για τις ληφθείσες αλληλουχίες της GenBank, στη χώρα/περιοχή/τοποθεσία του δείγματος (λεπτομέρειες μόνο όπου υπήρχαν διαθέσιμες), στην αναφορά της μελέτης στην οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά και, τέλος, στον αριθμό πρόσβασης της κάθε αλληλουχίας στην GenBank.

Κωδικός Δείγματος	Όνομα Ταχον	Αριθμός Κατάθεσης ΜΦΙΚ (ή κωδικός δείγματος αλληλουχίας GenBank)	Χώρα - Περιοχή - Τοποθεσία	Μελέτη	Αριθμός Πρόσβασης GenBank (16S rRNA/cyt b/MC1R/Pod15b/Pod55)
069	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.61	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Στρογγυλό	Παρούσα Διατριβή (Poulakakis et al., 2003)	ddRADseq: TBP
070	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.176	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Φαράγγι Σαμαριάς	(isolate PE-12; cyt b) / Παρούσα Διατριβή (16S rRNA & nDNA markers)	KX658177 / AF486202 / KX658476 / KX658529 / KX658582
079	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.235	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Παξιμάδα	Παρούσα Διατριβή (Poulakakis et al., 2005d)	ddRADseq: TBP
093	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.327	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Κουφονήσι	(Pe93 isolate; 16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2003)	AY896147 / AF486213 / KX658477 / KX658530 / KX658583
				(isolate PE-23; cyt b) /	

				Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	
287	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.711	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Ελάσα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
431	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2440	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Μηλιά Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
599	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2520	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Φαράγγι Σαμαριάς	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
813	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2521	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Φαράγγι Σαμαριάς	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
816	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2405	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Λευκά Όρη, βόρεια πλευρά	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
817	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2406	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Λευκά Όρη - Γρελέσκα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
818	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2597	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Λάγγος Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
819	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2590	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Ασφένδου Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
820	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2603	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Θέρισσο Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
821	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2598	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Ροδάκινο Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
822	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2599	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Ροδάκινο Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
823	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2592	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Γραμβούσα Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
824	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2593	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Γραμβούσα Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
825	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2594	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Γραμβούσα Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
826	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2602	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Θέρισσο Χανίων	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP

956	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2491	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Χρυσή	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
957	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2492	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Χρυσή	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
958	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2493	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Χρυσή	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
959	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2494	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Χρυσή	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
960	<i>P. cretensis</i>	NHMC 80.3.51.2495	Ελλάδα - Νήσος Κρήτη - Νησίδα Χρυσή	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
015	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.583	Ελλάδα - Καρδίτσα - Σαραντάπορος	(Poulakakis et al., 2005d) (Pe15 isolate; mtDNA markers) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY896198 / AY896062 / KX658478 / KX658531 / KX658584
017	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.572	Ελλάδα - Καρδίτσα - Λίμνη Πλαστήρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
050	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.686	Ελλάδα - Δράμα - Παρανέστι	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
143	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.544	Ελλάδα - Λάρισσα - Όρος Όσσα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
636	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2407	ΠΓΔΜ - Μικρή Πρέσπα	Παρούσα Διατριβή	KX658178 / KX657876 / KX658479 / KX658532 / KX658585
658	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2462	Σερβία - Crnovska River	Παρούσα Διατριβή	KX658179 / KX657877 / KX658480 / KX658533 / KX658586
954	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2464	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Γυάρους	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
955	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2479	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Ανάφη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP

961	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2496	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Σέριφος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
962	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2497	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Σέριφος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
963	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2507	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Άνδρος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
964	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2517	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Αστυπάλαια	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
965	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2518	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Αστυπάλαια	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
966	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2523	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Νάξος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
967	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2567	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Μύκονος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
968	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2568	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Μύκονος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
969	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2604	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Φολέγανδρος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
970	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2611	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Σίκινος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
971	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2615	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
972	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2616	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
973	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2617	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
974	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2618	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
975	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2619	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
976	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2621	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα - Νησίδα Νέα Καμένη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
977	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2622	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα - Νησίδα Νέα Καμένη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP

978	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2623	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα - Νησίδα Νέα Καμένη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
979	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2624	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα - Νησίδα Νέα Καμένη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
980	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2625	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα - Νησίδα Νέα Καμένη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
981	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2626	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Θήρα - Νησίδα Νέα Καμένη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
982	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2637	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
983	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2638	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
984	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2656	Ελλάδα - Κοζάνη - Μονή Βαζελόνος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
985	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2661	Ελλάδα - Φλώρινα - Όρος Βίτσι	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
986	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2664	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Αμοργός	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
987	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2670	Ελλάδα - Κυκλάδες, Νήσος Ιος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
993	<i>P. erhardii</i>	NHMC 80.3.51.2735	Ελλάδα - Κοζάνη - Μονή Βαζελόνος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
051	<i>P. gageae gageae</i>	NHMC 80.3.56.1	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Βάλαξα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY768739 / AY768775/ KX658481 / KX658534 / KX658587

201	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.15	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Πλατειά	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY768735 / AY768771 / KX658482 / KX658535 / KX658588
206	<i>P. gaiageae weigandi</i>	NHMC 80.3.56.37	Ελλάδα - Σποράδες - Νησίδα Πιπέρι	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY768733 / AY768769 / KX658483 / KX658536 / KX658589
411	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.63	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
412	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.64	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
413	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.65	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
414	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.66	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
415	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.67	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
416	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.68	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-

417	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.69	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
418	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.70	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658180 / KX657878 / - / - / -
419	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.71	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
420	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.72	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
421	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.73	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
422	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.74	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
423	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.75	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
425	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.77	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
426	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.78	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
427	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.79	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
685	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.80	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
686	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.81	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-



687	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.82	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
688	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.83	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
689	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.84	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	KX658181 / KX657879 / - / - / -
690	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.85	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	-
692	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.87	Ελλάδα - Σποράδες - Νήσος Σκύρος - Άγιος Φωκάς	Παρούσα Διατριβή	KX658182 / KX657880 / - / - / -
693	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.88	Ελλάδα - Σποράδες - Νήσος Σκύρος - Άγιος Φωκάς	Παρούσα Διατριβή	-
694	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.89	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Έξω Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	KX658183 / KX657881 / - / - / -
696	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.91	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Λακονήσι	Παρούσα Διατριβή	KX658184 / KX657882 / - / - / -
697	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.92	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
698	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.93	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658185 / KX657883 / - / - / -
699	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.94	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658186 / KX657884 / - / - / -
701	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.96	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-

702	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.97	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
703	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.98	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
707	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.102	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Σκυροπούλα	Παρούσα Διατριβή	-
708	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.103	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Καρεφλού	Παρούσα Διατριβή	-
710	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.106	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Μέσα Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
711	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.107	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Μέσα Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
789	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.108	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
790	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.109	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
791	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.110	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
792	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.111	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
793	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.112	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
794	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.113	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-

795	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.114	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
796	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.115	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	-
810	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.120	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Μέσα Διαβάτης	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1008	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.118	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1009	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.119	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Παλαμάρι	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
094	<i>P. levendis</i>	NHMC 80.3.51.279	Ελλάδα - Νήσος Αντικύθηρα - Νησιδα Πορι	(Poulakakis et al., 2005d) (isolate Pe94; 16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2003) (isolate PE-31; cyt <i>b</i> ) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY896170 / AF486221 / KX658484 / KX658537 / KX658590
096	<i>P. levendis</i>	NHMC 80.3.51.288	Ελλάδα - Νήσος Αντικύθηρα - Νησιδα Πορι	(Poulakakis et al., 2005d) (isolate Pe96; 16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2003) (isolate PE-32; cyt <i>b</i> ) / Παρούσα	AY896171 / AF486222 / KX658485 / KX658538 / KX658591

				Διατριβή (nDNA markers)	
827	<i>P. levendis</i>	NHMC 80.3.51.2534	Ελλάδα – Νήσος Αντικύθηρα – Νησίδα Λαγουβάρδος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
828	<i>P. levendis</i>	NHMC 80.3.51.2530	Ελλάδα – Νήσος Αντικύθηρα – Νησίδα Πορί	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
829	<i>P. levendis</i>	NHMC 80.3.51.2531	Ελλάδα – Νήσος Αντικύθηρα – Νησίδα Πορί	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
830	<i>P. levendis</i>	NHMC 80.3.51.2529	Ελλάδα – Νήσος Αντικύθηρα – Νησίδα Πορί	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
852	<i>P. levendis</i>	NHMC 80.3.51.2535	Ελλάδα – Νήσος Αντικύθηρα – Νησίδα Λαγουβάρδος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
639	<i>P. lilfordi</i>	NHMC 80.3.59.2	Ισπανία – Νήσος Μαγιόρκα	(Kaplí et al., 2013) (isolate Plil1; cyt <i>b</i> ) / Παρούσα Διατριβή (16S rRNA & nDNA markers)	KX658187 / KF003361 / KX658486 / KX658539 / KX658592
640	<i>P. lilfordi</i>	NHMC 80.3.59.3	Ισπανία – Νήσος Μαγιόρκα	(Kaplí et al., 2013) (isolate Plil2; cyt <i>b</i> ) / Παρούσα Διατριβή (16S rRNA & nDNA markers)	KX658188 / KF003362 / KX658487 / KX658540 / KX658593
545	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.4	Μαυροβούνιο – Ada Bojana	Παρούσα Διατριβή	KX658189 / KX657885 / KX658488 / KX658541 / KX658594

547	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.6	Μαυροβούνιο – Ada Bojana	Παρούσα Διατριβή	-
548	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.7	Μαυροβούνιο – Ada Bojana	Παρούσα Διατριβή	-
549	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.8	Μαυροβούνιο – Ada Bojana	Παρούσα Διατριβή	-
550	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.9	Μαυροβούνιο – Niksic	Παρούσα Διατριβή	-
655	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.10	Μαυροβούνιο – Ada Bojana	Παρούσα Διατριβή	KX658190 / KX657886 / - / - / -
656	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.11	Βοσνία - Ερζεγοβίνη – Nevesinje	Παρούσα Διατριβή	KX658191 / KX657887 / KX658489 / KX658542 / KX658595 ddRADseq: TBP
657	<i>P. melisellensis</i>	NHMC 80.3.57.12 (NMP6V 74157)*	Βοσνία - Ερζεγοβίνη – Prozor	Παρούσα Διατριβή (Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	KX658192 / KX657888 / - / - / - ddRADseq: TBP
053	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.2	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιθαδόλιμνη	Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY768741 / AY768777 / KX658490 / KX658543 / KX658596
554	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.64	Ελλάδα – Κυκλάδες, Νήσος Μήλος – Νησίδα Αντίμηλος	Παρούσα Διατριβή	- / KX657889 / - / - / -
555	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.66	Ελλάδα – Κυκλάδες, Νήσος Μήλος – Ανασκαφές Μήλου	Παρούσα Διατριβή	KX658193 / KX657890 / KX658491 / KX658544 / KX658597
600	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.5	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658194 / KX657891 / - / - / -
601	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.10	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658195 / KX657892 / KX658492 / KX658545 / KX658598

603	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.78	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658196 / KX657893 / - / - / -
604	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.4	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658197 / KX657894 / - / - / -
605	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.6	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658198 / KX657895 / - / - / -
606	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.7	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658199 / KX657896 / - / - / -
607	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.8	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658200 / KX657897 / - / - / -
608	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.9	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658201 / KX657898 / - / - / -
609	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.11	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	-
610	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.12	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος	Παρούσα Διατριβή	KX658202 / KX657899 / - / - / -
613	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.67	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658203 / KX657900 / - / - / -
614	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.68	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658204 / KX657901 / - / - / -
615	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.69	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658205 / KX657902 / - / - / -
616	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.70	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	- / KX657903 / - / - / -
617	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.71	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658206 / KX657904 / - / - / -
618	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.72	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658207 / KX657905 / - / - / -
619	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.73	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658208 / KX657906 / - / - / -
620	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.74	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658209 / KX657907 / - / - / -
621	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.75	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658210 / KX657908 / - / - / -
622	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.76	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658211 / KX657909 / - / - / -

623	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.77	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος	Παρούσα Διατριβή	KX658212 / KX657910 / - / - / -
638	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.79	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Αδάμας	Παρούσα Διατριβή	KX658213 / KX657911 / KX658493 / KX658546 / KX658599
665	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.80	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη, εκκλησία Αγίου Κωνσταντίνου	Παρούσα Διατριβή	-
666	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.81	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη, εκκλησία Αγίου Κωνσταντίνου	Παρούσα Διατριβή	KX658214 / KX657912 / - / - / -
667	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.82	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη, εκκλησία Αγίου Κωνσταντίνου	Παρούσα Διατριβή	-
669	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.84	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη, εκκλησία Αγίου Κωνσταντίνου	Παρούσα Διατριβή	-
670	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.85	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη, εκκλησία Αγίου Κωνσταντίνου	Παρούσα Διατριβή	-
671	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.86	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Παραλία Παπικτινού	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
672	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.87	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Παράσπορος	Παρούσα Διατριβή	KX658215 / KX657913 / - / - / -
673	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.88	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Παράσπορος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP

674	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.89	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Παράσπορος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
675	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.90	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Κόμια	Παρούσα Διατριβή	-
676	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.91	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Κόμια	Παρούσα Διατριβή	KX658216 / KX657914 / - / - / -
677	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.92	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, ΒΔ Αδάμαντος, στο δρόμο προς Βάτο	Παρούσα Διατριβή	KX658217 / KX657915 / - / - / -
678	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.93	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, ΒΔ Αδάμαντος, στο δρόμο προς Βάτο	Παρούσα Διατριβή	-
679	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.94	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, ΒΔ Αδάμαντος, στο δρόμο προς Βάτο	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
680	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.95	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος, Ψαθί προς Χωριό	Παρούσα Διατριβή	-
681	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.96	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος, Ψαθί προς Χωριό	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
682	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.97	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος, Ψαθί προς Χωριό	Παρούσα Διατριβή	-
683	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.98	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος, Ψαθί προς Χωριό	Παρούσα Διατριβή	-
684	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.99	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Κίμωλος, Ψαθί προς Χωριό	Παρούσα Διατριβή	KX658218 / KX657916 / - / - / -



779	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.100	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη	Παρούσα Διατριβή	-
780	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.101	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη	Παρούσα Διατριβή	KX658219 / KX657917 / - / - / -
781	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.102	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη	Παρούσα Διατριβή	-
782	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.103	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη	Παρούσα Διατριβή	-
783	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.104	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη	Παρούσα Διατριβή	-
784	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.106	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Ζεφύρια	Παρούσα Διατριβή	KX658220 / KX657918 / - / - / -
785	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.107	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Ζεφύρια	Παρούσα Διατριβή	-
786	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.108	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Ζεφύρια	Παρούσα Διατριβή	-
787	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.109	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Ζεφύρια	Παρούσα Διατριβή	-
788	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.110	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Ζεφύρια	Παρούσα Διατριβή	-
988	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.105	Ελλάδα – Κυκλάδες – Νήσος Μήλος, Λίμνη Αχιβαδόλιμνη	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
003	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.144	Ελλάδα – Αρκαδία – Όρος Μαίναλο	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
014	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.79	Ελλάδα – Καρδίτσα – Καζάρμα	Παρούσα Διατριβή (Poulakakis et al., 2005d) (mtDNA markers)/	AY896187 / AY896134 / KX658494 / KX658547 / KX658600

				(nDNA markers)	
595	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.541	Ουκρανία - Lower Danube area, near Ukrainian-Romanian state border, trading river port of the town of Reni, Odessa Province, Reni Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658221 / KX657919 / KX658495 / KX658548 / KX658601
596	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.544	Ουκρανία - NW coast of the Lake Kagul, Odessa Province, Reni Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658222 / KX657920 / KX658496 / KX658549 / KX658602
635	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.545	Ελλάδα - Καστοριά - Επταχώρι	Παρούσα Διατριβή	KX658223 / KX657921 / KX658497 / KX658550 / KX658603
989	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.293	Ελλάδα - Γρεβενά - Μικρολίβαδο	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
990	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.549	Ελλάδα - Καρδίτσα - Λίμνη Πλαστήρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
991	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.559	Ελλάδα - Κοζάνη - Καπνοχώρι	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
992	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.562	Ελλάδα - Φλώρινα - Γάβρος προς λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
994	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.567	Ελλάδα - Κοζάνη - Όρος Άσκιο	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
995	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.585	Ελλάδα - Καρδίτσα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
996	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.597	Ελλάδα - Φλώρινα - Όρος Βίτσι	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
997	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.598	Ελλάδα - Φλώρινα - Όρος Βίτσι	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
998	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.77	Ελλάδα - Ευρυτανία - Όρη Άγραφα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
007	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.2	Ελλάδα - Αχαΐα - Καλάβρυτα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP

396	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.114	Ελλάδα - Αχαΐα - Όρος Ερύμανθος	Παρούσα Διατριβή	KX658224 / KX657922 / KX658498 / KX658551 / KX658604 ddRADseq: TBP
397	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.117	Ελλάδα - Μεσσηνία - Όρος Αιγάλεω	Παρούσα Διατριβή	KX658225 / KX657923 / KX658499 / KX658552 / KX658605
907	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.137	Ελλάδα - Μεσσηνία - παραλία Βοΐδοκοιλιάς	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
919	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.152	Ελλάδα - Λακωνία - Αβραμιάνικα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
999	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.118	Ελλάδα - Κορινθία - Επίδαυρος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1000	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.119	Ελλάδα - Κορινθία - Επίδαυρος	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1001	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.125	Ελλάδα - Ηλεία - Ολυμπία	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1002	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.126	Ελλάδα - Ηλεία - Ολυμπία	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1003	<i>P. peloponnesiacus</i>	NHMC 80.3.54.128	Ελλάδα - Κορινθία - Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
641	<i>P. pityusensis</i>	NHMC 80.3.176.1	Ισπανία - Νήσος Μαγιόρκα - Πάλμα (αλλόχθον)	(Kapli et al., 2013) (isolate Ppit1; cyt <i>b</i> ) / Παρούσα Διατριβή (16S rRNA & nDNA markers)	KX658226 / KF003363 / KX658500 / KX658553 / KX658606
642	<i>P. pityusensis</i>	NHMC 80.3.176.2	Ισπανία - Νήσος Μαγιόρκα - Πάλμα (αλλόχθον)	(Kapli et al., 2013) (isolate Ppit2; cyt <i>b</i> ) / Παρούσα Διατριβή (16S rRNA & nDNA markers)	KX658227 / KF003364 / KX658501 / KX658554 / KX658607

894	<i>P. siculus</i>	NHMC 80.3.55.17	Σλοβενία - Dragonje	Παρούσα Διατριβή	KX658228 / KX657924 / KX658502 / KX658555 / KX658608
170	<i>P. tauricus. tauricus</i>	NHMC 80.3.50.28	Ελλάδα - Φθιώτιδα - Ποταμός Σπερχειός	Παρούσα Διατριβή	KX658229 / KX657925 / - / - / -
180	<i>P. tauricus. tauricus</i>	NHMC 80.3.50.34	Ελλάδα - Έβρος, Φέρες	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY768710 / AY768746 / KX658503 / KX658556 / KX658609
223	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.26	Ελλάδα - Ειπάνησα - Νήσος Κεφαλονιά	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b) / Παρούσα Διατριβή (nDNA markers)	AY768713 / AY768749 / KX658504 / KX658557 / KX658610 ddRADseq: TBP
432	<i>P. tauricus. tauricus</i>	NHMC 80.3.50.66	Κριμαία - western part of Main range of the Crimean Mts. - near village Uzundzha, western slope of Mt. Chuvash-Koyi (Range Trapan-Bair), Sevastopol territory	Παρούσα Διατριβή	KX658230 / KX657926 / - / - / -
433	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.67	Κριμαία - western part of Main range of the Crimean Mts. - near village Uzundzha, western slope of Mt.	Παρούσα Διατριβή	-

434	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.68	Chuvash-Koyi (Range Trapan-Bair), Sevastopol territory Κριμαία - Southern Coast - between settlements Parthenit and Gurzuf, Cape Ayu-Dagh, Alushta territory	Παρούσα Διατριβή	KX658231 / KX657927 / - / - / -
435	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.69	Κριμαία - Southern Coast - between settlements Parthenit and Gurzuf, Cape Ayu-Dagh, Alushta territory	Παρούσα Διατριβή	-
436	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.70	Κριμαία - near Cape Sarych, locality of Choba-Tash, Sevastopol territory	Παρούσα Διατριβή	KX658232 / KX657928 / - / - / -
437	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.71	Κριμαία - near Cape Sarych, locality of Choba-Tash, Sevastopol territory	Παρούσα Διατριβή	-
438	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.72	Κριμαία - western border between Main range of the Crimean Mts. and Southern Coast - near town of Balaclava, Range Spilia, Sevastopol territory	Παρούσα Διατριβή	KX658233 / KX657929 / - / - / -
439	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.73	Κριμαία - western border between Main range of the Crimean Mts. and western Foothills - between villages of Rodnoe and	Παρούσα Διατριβή	KX658234 / KX657930 / - / - / -

440	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.74	Ternovka, Sevastopol territory Κριμαία - western border between Main range of the Crimean Mts. and western Foothills - between villages of Rodnoe and Ternovka, Sevastopol territory	Παρούσα Διατριβή	KX658235 / KX657931 / - / - / -
441	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.75	Κριμαία - western border between Main range of the Crimean Mts. and western Foothills - between villages of Rodnoe and Ternovka, Sevastopol territory	Παρούσα Διατριβή	-
442	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.76	Κριμαία - western border between Main range of the Crimean Mts. and western Foothills - between villages of Rodnoe and Ternovka, Sevastopol territory	Παρούσα Διατριβή	-
443	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.77	Κριμαία - extreme eastern maritime plot of Main Range of the Crimean Mts. - Dvuyakornaya Valley, between village of Yuzhnoe and settlement Ordzhonikidze, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	-

444	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.78	Κριμαία - extreme eastern maritime plot of Main Range of the Crimean Mts. - Dvuyakornaya Valley, between village of Yuzhnoe and settlement Ordzhonikidze, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	-
445	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.79	Κριμαία - extreme eastern maritime plot of Main Range of the Crimean Mts. - Dvuyakornaya Valley, between village of Yuzhnoe and settlement Ordzhonikidze, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658236 / KX657932 / - / - / -
446	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.80	Κριμαία - extreme eastern maritime plot of Main Range of the Crimean Mts. - Dvuyakornaya Valley, between village of Yuzhnoe and settlement Ordzhonikidze, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658237 / KX657933 / - / - / -
447	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.81	Κριμαία - eastern Foothills - Mt. Ak-Kaya, Belogorsk Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658238 / KX657934 / - / - / -
448	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.82	Κριμαία - eastern Foothills - Mt. Ak-Kaya, Belogorsk Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658239 / KX657935 / - / - / -
449	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.83	Κριμαία - eastern Foothills - Mt. Ak-Kaya, Belogorsk Distr.	Παρούσα Διατριβή	-

450	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.84	Κριμαία - eastern Foothills - Mt. Ak-Kaya, Belogorsk Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658240 / KX657936 / - / - / -
451	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.85	Κριμαία - eastern Foothills - Mt. Ak-Kaya, Belogorsk Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658241 / KX657937 / - / - / -
452	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.86	Κριμαία - Black Sea coast of Kerch Peninsula - Mt. Opuk, Lenin's Distr.	Παρούσα Διατριβή	-
453	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.87	Κριμαία - Black Sea coast of Kerch Peninsula - Mt. Opuk, Lenin's Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658242 / KX657938 / - / - / -
454	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.88	Κριμαία - Azov Sea, coast of Kerch Peninsula - Karalarskaya Steppe, between Cape Chagany (near village Zolotoe) and salt Lake Chokrak, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658243 / KX657939 / KX658505 / KX658558 / KX658611
455	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.89	Κριμαία - Azov Sea coast of Kerch Peninsula - Karalarskaya Steppe, valley of sulfatar spring Suurtash, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	-
456	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.90	Κριμαία - Azov Sea coast of Kerch Peninsula - Karalarskaya Steppe, valley of sulfatar spring Suurtash, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	-
457	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.91	Κριμαία - Azov Sea coast of Kerch Peninsula - Karalarskaya Steppe, valley of sulfatar spring Suurtash, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	-



458	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.92	Κριμαία – Azov Sea coast of Kerch Peninsula – Karalarskaya Steppe, valley of sulfatar spring Suurtash, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658244 / KX657940 / - / - / -
459	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.93	Κριμαία – Azov Sea coast of Kerch Peninsula – Karalarskaya Steppe, valley of river Sernaya, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658245 / KX657941 / - / - / -
462	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.96	Κριμαία – near the border of the western Foothills and Main Range – sanatorium Adzhi-Su, environs of village Polyana, Bakhchisarayi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658246 / KX657942 / - / - / -
463	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.97	Κριμαία – eastern part of the Kerch Peninsula – ruins of ancient town Ilurat near village Ivanovka, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658247 / KX657943 / - / - / -
464	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.98	Κριμαία – extreme eastern, part of Black Sea coast of Kerch Peninsula – environs of the village Yakovenkovo, Cape Ak-Burun, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658248 / KX657944 / - / - / -
465	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.99	Σερβία – environs of the village Šumarak	Παρούσα Διατριβή	KX658249 / KX657945 / - / - / -
467	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.101	Ρουμανία – ancient colony Histria near Tulcea	Παρούσα Διατριβή	KX658250 / KX657946 / - / - / -

468	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.102	Ρουμανία – ancient colony Histria near Tulcea	Παρούσα Διατριβή	KX658251 / KX657947 / - / - / -
469	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.103	Ρουμανία – ancient colony Histria near Tulcea	Παρούσα Διατριβή	KX658252 / KX657948 / - / - / -
470	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.104	Ρουμανία – ancient colony Histria near Tulcea	Παρούσα Διατριβή	KX658253 / KX657949 / - / - / -
471	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.105	Ρουμανία – ancient colony Histria near Tulcea	Παρούσα Διατριβή	KX658254 / KX657950 / - / - / -
472	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.106	Ουκρανία – northern border of Stentsovsko-Zhebriyanskie marshy areas – environs of the village Desantnoe, Killia Distr., Odessa Province	Παρούσα Διατριβή	KX658255 / KX657951 / - / - / -
474	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.108	Κριμαία – SE part of Main Range, upper belt of southern macroslope – SW spur of Ridge Papatete between the settlement Krasnokamenka and village Lesnoe, Sudak territory.	Παρούσα Διατριβή	KX658256 / KX657952 / - / - / -
475	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.109	Κριμαία – SW part of Main Range – area of the Pass Bechku between the Valleys Baidarskaya and Belbekskaya environs of village Peredovoe, border of Sevastopol territory and Bakhshisarayi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658257 / KX657953 / - / - / -

476	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.110	Κριμαία - SE part of Main Range, upper belt of southern macroslope - southern slopes of Upland Karabi-Yaila, valley of river Mikropotamo and foot of Mt. Likon, environs of the village Generalskoe, Alushta territory	Παρούσα Διατριβή	KX658258 / KX657954 / - / - / -
477	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.111	Κριμαία - NW Κριμαϊαν height plain - between the settlement Chernomorskyi and the village Olenevka, northern coast of Tarkhankutskyi Peninsula, Chernomorskoe Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658259 / KX657955 / - / - / -
479	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.113	Κριμαία - NW Κριμαϊαν height plain - between the settlement Chernomorskyi and the village Olenevka, northern coast of Tarkhankutskyi Peninsula, Chernomorskoe Distr	Παρούσα Διατριβή	KX658260 / KX657956 / - / - / -
480	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.114	Κριμαία - Southern Coast - environs of s. Parthenit, Cape Ayu-Dagh, Alushta Territory	Παρούσα Διατριβή	KX658261 / KX657957 / - / - / -
481	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.115	Κριμαία - Southern Coast - s. Vinogradnyi, Alushta territory	Παρούσα Διατριβή	KX658262 / KX657958 / - / - / -

482	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.116	Κριμαία - western Foothills - village Kuibyshevo Bakhshisarayi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658263 / KX657959 / - / - / -
484	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.118	Κριμαία - western Foothills - v. Priyatnoe Svidanie, Mt. Bakla, Bakhshisarayi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658264 / KX657960 / - / - / -
485	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.119	Κριμαία - central Foothills - suburbs of Simferopol, coast of Simferopol reservoir, Simferopol Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658265 / KX657961 / - / - / -
486	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.120	Κριμαία - western plain - v. Skvortsovo, Simferopol Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658266 / KX657962 / - / - / -
489	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.123	Κριμαία - western Foothills - v. Preduschelnoe, Mt Kachi-Kal'on, Bakhchisarayi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658267 / KX657963 / - / - / -
490	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.124	Κριμαία - extreme eastern plot of Main Range - stm. Solnechnyi, foot of Mt. Pasha Oba, Theodosia Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658268 / KX657964 / - / - / -
491	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.125	Κριμαία - SE coast - stm. Schebetovka, northern clope of Mt. Echki-Dagh, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658269 / KX657965 / - / - / -
492	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.126	Κριμαία - SE coast - Karadagh Reserve, SE slope of Mt. Karadagh, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658270 / KX657966 / - / - / -
493	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.127	Κριμαία - SE coast - Karadagh Reserve,	Παρούσα Διατριβή	KX658271 / KX657967 / - / - / -

			Southern slope of Ridge Kara-Agach, Theodosia territory		
494	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.128	Κριμαία – SE coast – Karadagh Reserve, Karadagh Valley, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658272 / KX657968 / - / - / -
495	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.129	Κριμαία – SE coast – stm. Krasnokamenka, Mt. Frenk Mezer, Sudak territory.	Παρούσα Διατριβή	KX658273 / KX657969 / - / - / -
496	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.130	Κριμαία – SE coast – Karadagh Reserve, S slope of Ridge Kara-Agach, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658274 / KX657970 / - / - / -
497	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.131	Κριμαία – SE coast – stm. Krasnokamenka, Mt. Gondarly-Kaya, Sudak territory	Παρούσα Διατριβή	KX658275 / KX657971 / - / - / -
498	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.132	Κριμαία – SE coast – Karadagh Reserve, SE slope of Mt. Karadagh, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658276 / KX657972 / - / - / -
499	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.133	Κριμαία – SE coast – Karadagh Reserve, NW slope of Mt. Legener Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658277 / KX657973 / - / - / -
500	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.134	Κριμαία – SE coast – Karadagh Reserve, Biological station, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658278 / KX657974 / - / - / -
501	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.135	Κριμαία – central part of Kerch Peninsula – between village Doroshenkovo and	Παρούσα Διατριβή	KX658279 / KX657975 / - / - / -

			reservoir Yuzmak, Lenino Distr.		
502	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.136	Κριμαία – eastern part of Kerch Peninsula – village Ivanovka, Churbashskaya ravine, near ancient town Ilurat, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658280 / KX657976 / - / - / -
503	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.137	Κριμαία – central part of Kerch Peninsula – village Leninskoe, southern slope of Ridge Parpachskiy, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658281 / KX657977 / - / - / -
504	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.138	Κριμαία – SE part of Kerch Peninsula – village Zavetnoe, Lenino Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658282 / KX657978 / - / - / -
507	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.40	Ελλάδα – Αρκαδία – Τρίπολη Ελλάδα –	Παρούσα Διατριβή	KX658283 / KX657979 / - / - / -
508	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.42	Αιτωλοακαρνανία – Μεσολόγγι, 2/39 Σύνταγμα Ευζώνων	Παρούσα Διατριβή	KX658284 / KX657980 / - / - / -
509	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.44	Ελλάδα – Κορινθία – Φενεός	Παρούσα Διατριβή	KX658285 / KX657981 / - / - / -
510	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.48	Ελλάδα – Λάρισα – Καλύβια	Παρούσα Διατριβή	KX658286 / KX657982 / KX658506 / KX658559 / KX658612
511	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.55	Ελλάδα – Ιωάννινα – Όρη Τζουμέρκα	Παρούσα Διατριβή	KX658287 / KX657983 / - / - / -
512	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.302	Ελλάδα – Φλώρινα – Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658288 / KX657984 / - / - / -
513	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.65	Ελλάδα – Ιωάννινα – Όρος Νεμέρτσικα, Βιτσικόπουλο	Παρούσα Διατριβή	KX658289 / KX657985 / - / - / -

514	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.139	Ελλάδα - Γρεβενά - Όρος Βόιο, Αηδόνα	Παρούσα Διατριβή	KX658290 / KX657986 / - / - / -
515	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.140	Ελλάδα - Γρεβενά - Όρος Βόιο, Αηδόνα	Παρούσα Διατριβή	- / KX657987 / - / - / -
516	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.141	Ελλάδα - Γρεβενά - Όρος Βόιο, Αηδόνα	Παρούσα Διατριβή	KX658291 / KX657988 / KX658507 / KX658560 / KX658613
517	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.142	Ελλάδα - Γρεβενά - Όρος Βόιο, Αηδόνα	Παρούσα Διατριβή	KX658292 / KX657989 / - / - / -
518	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.143	Ελλάδα - Κοζάνη - Όρος Βόιο, Άγιος Σωτήρας	Παρούσα Διατριβή	- / KX657990 / - / - / -
520	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.145	Ελλάδα - Κοζάνη - Όρος Βόιο, Βουζόρινα	Παρούσα Διατριβή	KX658293 / KX657991 / - / - / -
521	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.146	Ελλάδα - Κοζάνη - Όρος Βόιο, Άγιοι Ανάργυροι	Παρούσα Διατριβή	KX658294 / KX657992 / - / - / -
522	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.147	Ελλάδα - Τρικάλα - Όρη Αντιχάσια, Κορυδαλλός	Παρούσα Διατριβή	KX658295 / KX657993 / - / - / -
523	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.148	Ελλάδα - Τρικάλα - Όρη Αντιχάσια, Κορυδαλλός	Παρούσα Διατριβή	KX658296 / KX657994 / KX658508 / KX658561 / KX658614
524	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.149	Σερβία - Brvenica	Παρούσα Διατριβή	KX658297 / KX657995 / - / - / -
525	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.150	Σερβία - road to Studenica	Παρούσα Διατριβή	KX658298 / KX657996 / - / - / -
526	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.151	Σερβία - Maglič	Παρούσα Διατριβή	KX658299 / KX657997 / - / - / -
527	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.152	Ουκρανία - eastern environs of the villages Tabaki and Zaliznichne, Odessa Province, Bolgradskyi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658300 / KX657998 / - / - / -
535	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.160	Ουκρανία - Ukrainian-Moldavian state border along the river Bol'shoyi Yalpug, Odessa	Παρούσα Διατριβή	-

			Province, Bolgradskiyi Distr.,		
536	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.161	Ουκρανία – right bank of Dnieper river – suburbs of town of Nikolaev, settlement Shirokaya Balka, Nikolaev Province	Παρούσα Διατριβή	KX658301 / KX657999 / - / - / -
537	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.162	Ουκρανία – right bank of Dnieper river – suburbs of town of Nikolaev, settlement Shirokaya Balka, Nikolaev Province	Παρούσα Διατριβή	-
538	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.163	Ουκρανία – right bank of Dnieper river – suburbs of town of Nikolaev, settlement Shirokaya Balka, Nikolaev Province	Παρούσα Διατριβή	KX658302 / KX658000 / - / - / -
539	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.164	Ουκρανία – right bank of Dnieper river – suburbs of town of Nikolaev, settlement Shirokaya Balka, Nikolaev Province	Παρούσα Διατριβή	-
540	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.165	Ουκρανία – right bank of Dnieper river – suburbs of town of Nikolaev, settlement Shirokaya Balka, Nikolaev Province	Παρούσα Διατριβή	-
541	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.166	Μολδαβία – on the river Yalrug, suburbs of town of Comrat, autonomous region of Gagauzia	Παρούσα Διατριβή	KX658303 / KX658001 / - / - / -
542	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.167	Μολδαβία – on the river Yalrug, suburbs of town of Comrat, autonomous region of Gagauzia	Παρούσα Διατριβή	KX658304 / KX658002 / - / - / -



543	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.168	Μολδαβία - on the river Yalrug, suburbs of town of Comrat, autonomous region of Gagauzia	Παρούσα Διατριβή	KX658305 / KX658003 / - / - / -
544	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.169	Μολδαβία - on the river Yalrug, suburbs of town of Comrat, autonomous region of Gagauzia	Παρούσα Διατριβή	KX658306 / KX658004 / - / - / -
556	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.190	Ρουμανία - Tulcea - Macin	Παρούσα Διατριβή	KX658307 / KX658005 / - / - / -
557	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.191	Ρουμανία - Tulcea - Babadag	Παρούσα Διατριβή	KX658308 / KX658006 / - / - / -
558	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.192	Ρουμανία - Constanta county - Canarua Feti	Παρούσα Διατριβή	KX658309 / KX658007 / - / - / -
559	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.193	Ρουμανία - Constanta county - Gura Dobrogei	Παρούσα Διατριβή	KX658310 / KX658008 / - / - / -
561	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.196	Βουλγαρία - Golyamo Bukovo, Distr. Sredets	Παρούσα Διατριβή	KX658311 / KX658009 / - / - / -
562	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.197	Βουλγαρία - Petrelik, Distr. Gotse Delchev	Παρούσα Διατριβή	KX658312 / KX658010 / - / - / -
563	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.198	Βουλγαρία - Krapchene, Distr. Montana	Παρούσα Διατριβή	KX658313 / KX658011 / - / - / -
564	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.199	Βουλγαρία - Ognyanovo, Distr. Pazardzhik	Παρούσα Διατριβή	KX658314 / KX658012 / - / - / -
565	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.200	Βουλγαρία - Sredna Gora Mt., near Panagyurishte	Παρούσα Διατριβή	KX658315 / KX658013 / - / - / -
566	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.178	Σερβία - Gaj village	Παρούσα Διατριβή	KX658316 / KX658014 / - / - / -
568	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.180	Σερβία - surroundings of Banatska Palanka	Παρούσα Διατριβή	KX658317 / KX658015 / - / - / -
570	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.182	Σερβία - environs of Donji Milanovac	Παρούσα Διατριβή	KX658318 / KX658016 / - / - / -
571	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.183	Σερβία - Diana Karataš	Παρούσα Διατριβή	KX658319 / KX658017 / - / - / -

574	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.187	Σερβία - environs of Trgovište	Παρούσα Διατριβή	KX658320 / KX658018 / - / - / -
576	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.201	Ουκρανία - eastern environs of the villages Tabaki and Zaliznichne, Odessa Province, Bolgradskyi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658321 / KX658019 / - / - / -
582	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.207	Ουκρανία - Ukrainian-Moldavian state border along the river Bol'shoyi Yalrug, Odessa Province, Bolgradskyi Distr.,	Παρούσα Διατριβή	KX658322 / KX658020 / - / - / -
583	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.208	Ουκρανία - Odessa Province, Bolgradskyi Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658323 / KX658021 / - / - / -
584	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.209	Ουκρανία - right bank of Dnieper river - suburbs of town of Nikolaev, settlement Shirokaya Balka, Nikolaev Province	Παρούσα Διατριβή	KX658324 / KX658022 / - / - / -
588	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.213	Μολδαβία - on the river Yalrug, suburbs of town of Comrat, autonomous region of Gagauzia	Παρούσα Διατριβή	KX658325 / KX658023 / - / - / -
592	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.217	Κριμαία - SE coast, Karadagh Reserve, Mt. Malyi Karadagh, Theodosia territory	Παρούσα Διατριβή	KX658326 / KX658024 / - / - / -
593	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.218	Κριμαία - Tarkhankutskyi Peninsula, 5,5km to N-NW from village Olenevka, locality Dzhanghul', Chernomorskoe Distr.	Παρούσα Διατριβή	KX658327 / KX658025 / - / - / -

594	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.220	Κριμαία - extreme western part of Southern Coast, 1,5 km to SE from town of Balaclava, loc. Micro-Yalo, Sevastopol territory.	Παρούσα Διατριβή	KX658328 / KX658026 / - / - / -
612	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.189	Ελλάδα - Θεσσαλονίκη - Ποταμός Μαυρούδα	Παρούσα Διατριβή	KX658329 / KX658027 / - / - / -
626	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.223	Αλβανία - Kodër	Παρούσα Διατριβή	KX658330 / KX658028 / - / - / -
627	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.224	Αλβανία - Kodër	Παρούσα Διατριβή	KX658331 / KX658029 / - / - / -
628	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.225	ΠΓΔΜ - Vitachevo, S of Kavadarci	Παρούσα Διατριβή	KX658332 / KX658030 / - / - / -
629	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.226	Βουλγαρία - Gotse Delchev	Παρούσα Διατριβή	KX658333 / KX658031 / - / - / -
630	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.227	Βουλγαρία - Damyanica	Παρούσα Διατριβή	KX658334 / KX658032 / - / - / -
631	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.228	Βουλγαρία - Arkutino, sand dunes	Παρούσα Διατριβή	KX658335 / KX658033 / - / - / -
632	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.229	Βουλγαρία - Balgari	Παρούσα Διατριβή	KX658336 / KX658034 / - / - / -
633	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.230	Βουλγαρία - Malko Tarnovo	Παρούσα Διατριβή	KX658337 / KX658035 / - / - / -
634	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.231	ΠΓΔΜ - Vitachevo, S of Kavadarci	Παρούσα Διατριβή	KX658338 / KX658036 / - / - / -
637	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.234	Ουγγαρία - Kunpeszér	Παρούσα Διατριβή	KX658339 / KX658037 / - / - / -
643	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.235	Αλβανία - Golemaj	Παρούσα Διατριβή	KX658340 / KX658038 / KX658509 / KX658562 / KX658615
644	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.236	Αλβανία - Golemaj	Παρούσα Διατριβή	KX658341 / KX658039 / - / - / -
645	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.237	Αλβανία - Vagalat	Παρούσα Διατριβή	KX658342 / KX658040 / - / - / -

646	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.238	Αλβανία – Vagalat	Παρούσα Διατριβή	KX658343 / KX658041 / - / - / -
647	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.239	Αλβανία – Vagalat	Παρούσα Διατριβή	KX658344 / KX658042 / - / - / -
648	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.240	Αλβανία – Kodër	Παρούσα Διατριβή	KX658345 / KX658043 / - / - / -
649	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.241	Αλβανία – Vagalat	Παρούσα Διατριβή	KX658346 / KX658044 / - / - / -
650	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.242	Αλβανία – Halo	Παρούσα Διατριβή	KX658347 / KX658045 / - / - / -
651	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.243	Ουγγαρία – Bugac	Παρούσα Διατριβή	KX658348 / KX658046 / - / - / -
652	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.244	Ουγγαρία – Bugac	Παρούσα Διατριβή	KX658349 / KX658047 / - / - / -
653	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.245	Ουγγαρία – Bugac	Παρούσα Διατριβή	KX658350 / KX658048 / - / - / -
654	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.246	Αλβανία – Kodër	Παρούσα Διατριβή	KX658351 / KX658049 / - / - / -
659	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.248	Σερβία – Crnovska River	Παρούσα Διατριβή	KX658352 / KX658050 / - / - / -
660	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.249	Τουρκία – Keşan	Παρούσα Διατριβή	KX658353 / KX658051 / - / - / -
661	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.250	Τουρκία – paragem II pedras berma estrada	Παρούσα Διατριβή	KX658354 / KX658052 / - / - / -
662	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.251	Κριμαία – Mt. Yuzhnaya Demerdzhi, Alushta territory	Παρούσα Διατριβή	KX658355 / KX658053 / - / - / -
663	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.232 (HNHM-HER_2014.2.1)**	Ουγγαρία – Kiskunság – Kunpeszér	Παρούσα Διατριβή	KX658356 / KX658054 / - / - / -
664	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.233 (HNHM-HER_2010.68.1)**	Ουγγαρία – Kiskunság – Kunpeszér	Παρούσα Διατριβή	KX658357 / KX658055 / - / - / -
712	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.252	Ελλάδα – Αιτωλοακαρνανία – Λίμνη Τριχωνίδα	Παρούσα Διατριβή	KX658358 / KX658056 / KX658510 / KX658563 / KX658616

713	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.253	Ελλάδα – Αιτωλοακαρνανία – Λίμνη Τριχωνίδα	Παρούσα Διατριβή	KX658359 / KX658057 / KX658511 / KX658564 / KX658617
714	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.254	Ελλάδα – Κορινθία – Αρχαίος Φενεός	Παρούσα Διατριβή	KX658360 / KX658058 / - / - / -
715	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.255	Ελλάδα – Κορινθία – Αρχαίος Φενεός	Παρούσα Διατριβή	KX658361 / KX658059 / - / - / -
716	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.256	Ελλάδα – Κορινθία – Αρχαίος Φενεός	Παρούσα Διατριβή	KX658362 / KX658060 / - / - / - ddRADseq: TBP
717	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.257	Ελλάδα – Κορινθία – Αρχαίος Φενεός	Παρούσα Διατριβή	KX658363 / KX658061 / - / - / - ddRADseq: TBP
718	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.258	Ελλάδα – Κορινθία – Αρχαίος Φενεός	Παρούσα Διατριβή	KX658364 / KX658062 / KX658512 / KX658565 / KX658618 ddRADseq: TBP
719	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.259	Βουλγαρία – Ladarevo	Παρούσα Διατριβή	KX658365 / KX658063 / - / - / -
720	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.260	Βουλγαρία – Sozopol	Παρούσα Διατριβή	KX658366 / KX658064 / - / - / -
721	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.261	Σερβία – Prohor Pčinjski	Παρούσα Διατριβή	KX658367 / KX658065 / - / - / -
726	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.266	ΠΓΔΜ – Pretor, Lake Prespa	Παρούσα Διατριβή	KX658368 / KX658066 / - / - / -
727	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.267	ΠΓΔΜ – Pretor, Lake Prespa	Παρούσα Διατριβή	KX658369 / KX658067 / - / - / -
728	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.268	ΠΓΔΜ – Pretor, Lake Prespa	Παρούσα Διατριβή	KX658370 / KX658068 / - / - / -
730	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.270	ΠΓΔΜ – Pretor, Lake Prespa	Παρούσα Διατριβή	KX658371 / KX658069 / - / - / -
732	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.272	Αλβανία – Lin	Παρούσα Διατριβή	KX658372 / KX658070 / - / - / -
733	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.273	Αλβανία – Lin	Παρούσα Διατριβή	KX658373 / KX658071 / - / - / -
734	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.274	Ελλάδα – Φλώρινα – Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP

735	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.275	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
736	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.276	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
738	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.278	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658374 / KX658072 / - / - / - ddRADseq: TBP
739	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.279	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658375 / KX658073 / - / - / -
740	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.280	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658376 / KX658074 / - / - / -
741	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.281	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658377 / KX658075 / - / - / -
742	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.282	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658378 / KX658076 / - / - / -
743	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.283	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658379 / KX658077 / - / - / -
744	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.284	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658380 / KX658078 / - / - / -
745	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.285	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658381 / KX658079 / - / - / -
746	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.286	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658382 / KX658080 / - / - / -
747	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.287	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658383 / KX658081 / KX658513 / KX658566 / KX658619
748	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.288	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658384 / KX658082 / - / - / -
749	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.289	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658385 / KX658083 / - / - / -
750	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.290	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658386 / KX658084 / - / - / -
751	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.291	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658387 / KX658085 / - / - / -
752	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.247	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνες Πρέσπες, Άγιος Γερμανός	Παρούσα Διατριβή	KX658388 / KX658086 / - / - / -

759	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.38	Ελλάδα - Αρκαδία - Τρίπολη	Παρούσα Διατριβή	- / KX658087 / - / - / -
761	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.41	Ελλάδα - Αιτωλοακαρνανία - Μεσολόγγι, 2/39 Σύνταγμα Ευζώνων	Παρούσα Διατριβή	KX658389 / KX658088 / KX658514 / KX658567 / KX658620
762	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.43	Ελλάδα - Κορινθία - Φενεός	Παρούσα Διατριβή	- / KX658089 / - / - / -
763	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.45	Ελλάδα - Κορινθία - Λίμνη Στυμφαλία	Παρούσα Διατριβή	KX658390 / KX658090 / KX658515 / KX658568 / KX658621
764	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.46	Ελλάδα - Κορινθία - Λίμνη Στυμφαλία	Παρούσα Διατριβή	KX658391 / KX658091 / - / - / -
765	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.49	Ελλάδα - Κορινθία - Φενεός, Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658392 / KX658092 / - / - / -
766	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.50	Ελλάδα - Κορινθία - Φενεός, Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658393 / KX658093 / - / - / -
767	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.51	Ελλάδα - Κορινθία - Φενεός, Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658394 / KX658094 / - / - / -
768	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.52	Ελλάδα - Κορινθία - Φενεός, Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658395 / KX658095 / - / - / -
769	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.53	Ελλάδα - Κορινθία - Φενεός, Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658396 / KX658096 / - / - / -
770	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.56	Ελλάδα - Επύνησα - Νήσος Ζάκυνθος, κοντά στη Λίμνη Κερί	Παρούσα Διατριβή	KX658397 / KX658097 / KX658516 / KX658569 / KX658622
771	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.57	Ελλάδα - Επύνησα- Νήσος Ζάκυνθος, στο κέντρο της πόλης	Παρούσα Διατριβή	KX658398 / KX658098 / - / - / -
772	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.58	Ελλάδα - Επύνησα- Νήσος Ζάκυνθος, Χώρα προς Αργάσι	Παρούσα Διατριβή	KX658399 / KX658099 / KX658517 / KX658570 / KX658623 ddRADseq: TBP
773	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.59	Ελλάδα - Επύνησα - Νήσος Ζάκυνθος, Χώρα προς Αργάσι	Παρούσα Διατριβή	KX658400 / KX658100 / - / - / -

774	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.60	Ελλάδα – Επάνησα – Νήσος Ζάκυνθος, Καλιπάδες	Παρούσα Διατριβή	KX658401 / KX658101 / - / - / -
775	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.62	Ελλάδα – Ιωάννινα – Όρη Νεμέρτσικα – Παλιοχώρι	Παρούσα Διατριβή	KX658402 / KX658102 / - / - / -
776	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.303	Ελλάδα – Φλώρινα – Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658403 / KX658103 / - / - / -
777	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.304	Ελλάδα – Φλώρινα – Λίμνες Πρέσπες	Παρούσα Διατριβή	KX658404 / KX658104 / - / - / -
778	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.221	Ελλάδα – Αχαΐα – Δάσος Στροφυλιάς	Παρούσα Διατριβή	KX658405 / KX658105 / - / - / -
797	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.292	ΠΓΔΜ – Stenje, Prespansko jezero	Παρούσα Διατριβή	KX658406 / KX658106 / - / - / -
801	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.296	Αλβανία – Cajupit pass	Παρούσα Διατριβή	KX658407 / KX658107 / - / - / - ddRADseq: TBP
805	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.300	Αλβανία – Cajupit pass	Παρούσα Διατριβή	KX658408 / KX658108 / - / - / -
806	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.301	Αλβανία – Cajupit pass	Παρούσα Διατριβή	KX658409 / KX658109 / - / - / -
815	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.305	Ελλάδα – Καβάλα, Νήσος Θάσος – Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658410 / KX658110 / - / - / - ddRADseq: TBP
854	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.306	Ελλάδα – Καβάλα, Νήσος Θάσος – Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658411 / KX658111 / - / - / - ddRADseq: TBP
855	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.307	Ελλάδα – Καβάλα, Νήσος Θάσος – Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658412 / KX658112 / - / - / - ddRADseq: TBP
856	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.308	Ελλάδα – Καβάλα, Νήσος Θάσος – Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658413 / KX658113 / - / - / - ddRADseq: TBP
857	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.309	Ελλάδα – Καβάλα, Νήσος Θάσος – Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658414 / KX658114 / KX658518 / KX658571 / KX658624 ddRADseq: TBP



858	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.310	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658415 / KX658115 / KX658519 / KX658572 / KX658625
859	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.311	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	- / KX658116 / - / - / -
860	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.312	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658416 / KX658117 / - / - / -
861	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.313	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658417 / KX658118 / - / - / -
862	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.314	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658418 / KX658119 / - / - / -
863	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.315	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658419 / KX658120 / - / - / -
864	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.316	Ελλάδα - Νέστος - Κεραμωτή	Παρούσα Διατριβή	KX658420 / KX658121 / - / - / -
865	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.317	Ελλάδα - Νέστος - Κεραμωτή	Παρούσα Διατριβή	KX658421 / KX658122 / KX658520 / KX658573 / KX658626 ddRADseq: TBP
866	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.318	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658422 / KX658123 / - / - / - ddRADseq: TBP
867	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.319	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	Παρούσα Διατριβή	KX658423 / KX658124 / - / - / -
869	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.333	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνη Πετρών	Παρούσα Διατριβή	-
870	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.334	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνη Πετρών	Παρούσα Διατριβή	KX658424 / KX658125 / - / - / -

871	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.335	Ελλάδα - Φλώρινα - Λίμνη Χειμαδίτιδα προς Λίμνη Ζάζαρη	Παρούσα Διατριβή	KX658425 / KX658126 / - / - / -
872	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.336	Ελλάδα - Πέλλα - Λίμνη Άγρα	Παρούσα Διατριβή	KX658426 / KX658127 / KX658521 / KX658574 / KX658627
873	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.337	Ελλάδα - Ιωάννινα - νησίδα της Λίμνης Παμβώτιδας	Παρούσα Διατριβή	KX658427 / KX658128 / - / - / -
874	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.338	Ελλάδα - Ιωάννινα - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Κτήριο E1	Παρούσα Διατριβή	KX658428 / KX658129 / - / - / - ddRADseq: TBP
875	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.339	Ελλάδα - Ιωάννινα - Όρος Μιτσικέλι, Λιγγιάδες	Παρούσα Διατριβή	KX658429 / KX658130 / - / - / -
876	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.340	Ελλάδα - Ιωάννινα - Ζαγόρι, Μεσοβούνι	Παρούσα Διατριβή	KX658430 / KX658131 / - / - / -
877	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.341	Ελλάδα - Ιωάννινα - Δωδώνη	Παρούσα Διατριβή	KX658431 / KX658132 / - / - / -
878	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.342	Ελλάδα - Ιωάννινα - Ζαγόρι, Δίλοφο, Άγιος Μηνάς	Παρούσα Διατριβή	KX658432 / KX658133 / KX658522 / KX658575 / KX658628
879	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.343	Ελλάδα - Ιωάννινα - Κόνιτσα	Παρούσα Διατριβή	KX658433 / KX658134 / KX658523 / KX658576 / KX658629
880	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.344	Ελλάδα - Ιωάννινα - απέναντι από το νησί της Λίμνης Παμβώτιδας	Παρούσα Διατριβή	KX658434 / KX658135 / - / - / -
881	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.345	Ελλάδα - Έβρος - Φέρες	Παρούσα Διατριβή	KX658435 / KX658136 / - / - / -
882	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.346	Ελλάδα - Έβρος - Τρεις Βρύσες	Παρούσα Διατριβή	KX658436 / KX658137 / - / - / -
883	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.347	Ελλάδα - Αχαΐα - Όρος Κλοκός	Παρούσα Διατριβή	KX658437 / KX658138 / KX658524 / KX658577 / KX658630

884	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.320	Ελλάδα - Αρκαδία - Κοσμάς	Παρούσα Διατριβή	KX658438 / KX658139 / - / - / -
885	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.321	Ελλάδα - Αρκαδία - Κοσμάς	Παρούσα Διατριβή	KX658439 / KX658140 / KX658525 / KX658578 / KX658631
886	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.322	Ελλάδα - Αρκαδία - Κοσμάς	Παρούσα Διατριβή	KX658440 / KX658141 / - / - / - ddRADseq: TBP
887	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.323	Ελλάδα - Λακωνία - Καρυές	Παρούσα Διατριβή	KX658441 / KX658142 / KX658526 / KX658579 / KX658632 ddRADseq: TBP
888	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.324	Ελλάδα - Λακωνία - Καρυές	Παρούσα Διατριβή	KX658442 / KX658143 / KX658527 / KX658580 / KX658633
889	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.325	Ελλάδα - Κορινθία - Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658443 / KX658144 / - / - / -
890	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.326	Ελλάδα - Κορινθία - Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658444 / KX658145 / - / - / -
891	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.327	Ελλάδα - Κορινθία - Λίμνη Δόξας	Παρούσα Διατριβή	KX658445 / KX658146 / - / - / -
892	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.328	Ελλάδα - Κορινθία - Λούζι	Παρούσα Διατριβή	KX658446 / KX658147 / - / - / - ddRADseq: TBP
893	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.329	Ελλάδα - Κορινθία - Sikionas	Παρούσα Διατριβή	KX658447 / KX658148 / - / - / -
895	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.330	Ρουμανία - Muntii Macinului	Παρούσα Διατριβή	-
896	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.331	Ρουμανία - Muntii Macinului	Παρούσα Διατριβή	-
897	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.332	Ελλάδα - Αργολίδα - Ναύπλιο	Παρούσα Διατριβή	KX658448 / KX658149 / - / - / -
927	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.195	Ελλάδα - Έβρος - Δορίσκος	Παρούσα Διατριβή	KX658449 / KX658150 / - / - / -
928	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.61	Ελλάδα - Αιτωλοακαρνανία - Όρος Αράκυνθος, Καρίτσα	Παρούσα Διατριβή	KX658450 / KX658151 / - / - / - ddRADseq: TBP

929	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.348	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κέρκυρα, Σιδάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658451 / KX658152 / - / - / -
930	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.349	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κέρκυρα, Σιδάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658452 / KX658153 / - / - / -
931	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.350	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κέρκυρα, Σιδάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658453 / KX658154 / - / - / -
932	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.351	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κέρκυρα, Σιδάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658454 / KX658155 / - / - / -
933	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.352	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κέρκυρα, Σιδάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658455 / KX658156 / - / - / - ddRADseq: TBP
934	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.353	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κέρκυρα, Σιδάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658456 / KX658157 / - / - / -
935	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.354	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κέρκυρα, Σιδάρι	Παρούσα Διατριβή	KX658457 / KX658158 / - / - / -
936	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.355	Ελλάδα – Καρδίτσα – Μουζάκι	Παρούσα Διατριβή	KX658458 / KX658159 / - / - / - ddRADseq: TBP
937	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.356	Σερβία – Šipacina	Παρούσα Διατριβή	KX658459 / KX658160 / - / - / -
938	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.357	Σερβία – Šipacina	Παρούσα Διατριβή	KX658460 / KX658161 / - / - / -
939	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.358	Kosovo – Cerajë	Παρούσα Διατριβή	KX658461 / KX658162 / - / - / -
940	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.359	Kosovo – Gjonaj	Παρούσα Διατριβή	KX658462 / KX658163 / - / - / -
941	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.360	Kosovo – Gjonaj	Παρούσα Διατριβή	KX658463 / KX658164 / - / - / -
942	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.361	Αλβανία – Përbreg	Παρούσα Διατριβή	KX658464 / KX658165 / - / - / -
943	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.362	Αλβανία – Lume	Παρούσα Διατριβή	KX658465 / KX658166 / - / - / -
945	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.367	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κεφαλονιά, Ληξούρι	Παρούσα Διατριβή	KX658466 / KX658167 / - / - / -
946	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.368	Ελλάδα – Επτάνησα – Νήσος Κεφαλονιά, Ληξούρι	Παρούσα Διατριβή	KX658467 / KX658168 / - / - / -

947	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.63	Ελλάδα – Μεσσηνία – Ποταμός Πάμισος, δίπλα από το αεροδρόμιο Καλαμάτας	Παρούσα Διατριβή	KX658468 / KX658169 / - / - / -
948	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.170	Αλβανία – Uznovë	Παρούσα Διατριβή	KX658469 / KX658170 / - / - / -
949	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.171	Αλβανία – Divjakë-Karavastë NP	Παρούσα Διατριβή	KX658470 / KX658171 / - / - / -
950	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.172	Αλβανία – Divjakë-Karavastë NP	Παρούσα Διατριβή	KX658471 / KX658172 / - / - / -
951	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.173	Αλβανία – Maliq	Παρούσα Διατριβή	KX658472 / KX658173 / - / - / -
952	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.174	Αλβανία – Maliq	Παρούσα Διατριβή	KX658473 / KX658174 / - / - / -
953	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.175	Αλβανία – Fierzë	Παρούσα Διατριβή	KX658474 / KX658175 / - / - / -
625	<i>P. waglerianus</i>	NHMC 80.3.150.1	Ιταλία – Σικελία – castle dona fiorata	Παρούσα Διατριβή	KX658475 / KX658176 / KX658528 / KX658581 / KX658634
1006 Εξωομάδα ddRADSeq	<i>Lacerta trilineata</i>	NHMC 80.3.60.418	Ελλάδα – Επτανήσα – Νήσος Κέρκυρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1007 Εξωομάδα ddRADSeq	<i>Lacerta trilineata</i>	NHMC 80.3.60.419	Ελλάδα – Επτανήσα – Νήσος Κέρκυρα	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
1010 Εξωομάδα ddRADSeq	<i>Hellenolacerta graeca</i>	NHMC 80.3.65.28	Ελλάδα – Λακωνία – Κρούβρυση	Παρούσα Διατριβή	ddRADseq: TBP
-	<i>P. bocagei</i>	Gpb6	Ισπανία – Lugo	(Pinho et al., 2006) (16S rRNA) / (Harris and Sá-Sousa, 2002) (cyt b)	DQ081075 / AF469426 / - / - / -
-	<i>P. bocagei</i>	Sar1	Ισπανία – Lugo	(Pinho et al., 2010) (MC1R) / (Pereira et al., 2013) (Pod55 & Pod15b)	- / - / GU180961 / KC681232 / KC681696

-	<i>P. bocagei</i>	MP3	Πορτογαλία - Πόρτο - Madalena	(Pinho et al., 2006) (16S rRNA) / (Harris and Sá- Sousa, 2002) (cyt <i>b</i> )	DQ081076 / AF469424 / - / - / -
-	<i>P. bocagei</i>	Vair5	Πορτογαλία - Πόρτο - Vairao	(Pinho et al., 2010)	- / - / GU180965 / - / -
-	<i>P. bocagei</i>	3.120	Πορτογαλία - Πόρτο - Madalena	(Pereira et al., 2013)	- / - / - / KC681228 / KC681693
-	<i>P. filfolensis</i>	Fil01	Μάλτα - Comino	(Buades et al., 2013)	- / JX852112 / - / - / -
-	<i>P. filfolensis</i>	12_1	Μάλτα - Comino	(Salvi et al., 2014)	- / - / KJ027748 / KJ027908 / KJ027961
-	<i>P. filfolensis</i>	Fil02	Μάλτα - Maltese archipelago	(Rodríguez et al., 2013b)	- / KF022052 / - / - / -
-	<i>P. filfolensis</i>	17_2	Μάλτα - Νήσος Μάλτα - Balzan	(Salvi et al., 2014)	- / - / KJ027769 / KJ027930 / KJ027975
052	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.34	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Όρος Κόχυλας	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768731 / AY768767 / - / - / -
199	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.11	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Μέσα Διαβάτης	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY76879 / AY768765 / - / - / -
200	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.14	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησίδα Σαρακινό	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768737 / AY768773 / - / - / -

202	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.29	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Κούλουρη	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b)	AY768730 / AY768766 / - / - / -
203	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.25	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Λακονήσι	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b)	AY768732 / AY768768 / - / - / -
204	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.16	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Ρήνεια	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b)	AY768717 / AY768772 / - / - / -
205	<i>P. gaiageae gaiageae</i>	NHMC 80.3.56.22	Ελλάδα - Σποράδες, Νήσος Σκύρος - Νησιδα Σκυροπούλα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b)	AY768738 / AY768774 / - / - / -
207	<i>P. gaiageae weigandi</i>	NHMC 80.3.56.38	Ελλάδα - Σποράδες - Νησιδα Πιπέρι	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b)	AY768734 / AY768770 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	BIS3	Κροατία - Vis archipelago - Biševo Island	(Podnar et al., 2004)	AY185019 / AY185062 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	BRU1	Κροατία - Vis archipelago - Brusnik islet	(Podnar et al., 2004)	AY185017 / AY185057 / - / - / -

-	<i>P. melisellensis</i>	CAV	Κροατία - Cavtat	(Podnar et al., 2004)	AY185012 / AY185023 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	GLA	Κροατία - Lastovo archipelago - Glavat islet	(Podnar et al., 2004)	AY185014 / AY185042 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	HVA	Κροατία - Hvar Island	(Podnar et al., 2004)	AY185011 / AY185020 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	JAB1	Κροατία - Vis archipelago - Jabuka islet	(Podnar et al., 2004)	AY185018 / AY185097 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	KCA	Κροατία - Korčula Island	(Podnar et al., 2004)	AY185013 / AY185028 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	KOR	Κροατία - Istria - Koromačno	(Podnar et al., 2004)	AY185010 / AY185029 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	LAS1	Κροατία - Lastovo Island	(Podnar et al., 2004)	AY185015 / AY185036 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	NCGC1	Μαυροβούνιο - Budva	(Podnar et al., 2014)	- / KF373650 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	NCGCL1	Μαυροβούνιο - Mt. Lovćen	(Podnar et al., 2014)	- / KF373651 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	NHJS1	Βοσνία - Ερζεγοβίνη - Ramsko lake	(Podnar et al., 2014)	- / KF373649 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	PUR	Κροατία - Kornati archipelago - Purara islet	(Podnar et al., 2004)	AY185009 / AY185052 / - / - / -
-	<i>P. melisellensis</i>	VZP	Κροατία - Vis Island - Zlopolje	(Podnar et al., 2004)	AY185016 / AY185097 / - / - / -
054	<i>P. milensis milensis</i>	NHMC 80.3.52.3	Ελλάδα - Κυκλάδες - Νήσος Μήλος - Νησίδα Άγιος Ευστάθιος	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768740 / AY768776 / - / - / -
132	<i>P. muralis</i>	NHMC 80.3.53.45	Ελλάδα - Λάρισα - Όρος Κίτσαβος	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2003) (cyt <i>b</i> )	AY896181 / AF486232 / - / - / -



-	<i>P. muralis</i>	MTA1	Ισπανία - Asturias - Tanes	(Pinho et al., 2006)	DQ081106 / DQ081150 / - / - / -
-	<i>P. muralis</i>	DB8970	Ισπανία - Asturias - Tanes	(Salvi et al., 2013)	- / - / - / KF372123 / - / -
-	<i>P. muralis</i>	Tan11	Ισπανία - Asturias - Tanes	(Pereira et al., 2013)	- / - / - / - / KC681277 / KC681728
-	<i>P. siculus</i>	Lucania	Ιταλία - Vallo della Lucania	(Podnar et al., 2005)	AY770912 / AY770886 / - / - / -
168	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.22	Ελλάδα - Επτάνησα - Νήσος Κέρκυρα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768714 / AY768750 / - / - / -
175	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.20	Ελλάδα - Επτάνησα - Νήσος Ζάκυνθος	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768728 / AY768764 / - / - / -
176	<i>P. tauricus tauricus</i>	NHMC 80.3.50.35	Ελλάδα - Φλώρινα - Νίκη	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768711 / AY768747 / - / - / -
181	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.18	Ελλάδα - Αχαΐα - Καλάβρυτα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768712 / AY768748 / - / - / -
182	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.17	Ελλάδα - Αρκαδία - Δημητσάνα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et	AY768708 / AY768744 / - / - / -

				al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	
196	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.15	Ελλάδα - Αιτωλοακαρνανία - Αγρίνιο	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768706 / AY768742 / - / - / -
197	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.21	Ελλάδα - Αρκαδία - Βυτίνα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768727 / AY768721 / - / - / -
208	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.2	Ελλάδα - Ιωάννινα - Θεριάκισι	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768726 / AY768762 / - / - / -
220	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.23	Ελλάδα - Αρκαδία - Λεβίδι	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768717 / AY768753 / - / - / -
224	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.33	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt <i>b</i> )	AY768723 / AY768759 / - / - / -
225	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.36	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et	AY768724 / AY768760 / - / - / -

				al., 2005c) (cyt b)	
227	<i>P. tauricus thasopulae</i>	NHMC 80.3.50.32	Ελλάδα - Καβάλα, Νήσος Θάσος - Νησίδα Θασοπούλα	(Poulakakis et al., 2005d) (16S rRNA) / (Poulakakis et al., 2005c) (cyt b)	AY768725 / AY768761 / - / - / -
233	<i>P. tauricus ionicus</i>	NHMC 80.3.50.1	Ελλάδα - Ηλεία - Δάσος Στροφυλιάς, κοντά στην Καλογριά	(Poulakakis et al., 2005c)	AY768721 / AY768757 / - / - / -
-	<i>P. tiliguerta</i>	Til01	Γαλλία - Κορσική - Padodell	(Buades et al., 2013)	- / JX852113 / - / - / -
-	<i>P. tiliguerta</i>	Trp1	Γαλλία - Κορσική - Padodell	(Buades et al., 2013)	- / - / JX126692 / - / -
-	<i>P. tiliguerta</i>	PT6	Γαλλία - Βόρεια Κορσική	(Pereira et al., 2013)	- / - / - / KC681281 / KC681736
-	<i>P. tiliguerta</i>	Til02	Γαλλία - Κορσική - Padodell	(Buades et al., 2013)	- / JX852114 / - / - / -
-	<i>P. tiliguerta</i>	Tf2	Γαλλία - Κορσική - Padodell	(Buades et al., 2013)	- / - / JX126691 / - / -
-	<i>P. tiliguerta</i>	PT5	Γαλλία - Κορσική - Solenzarea	(Pereira et al., 2013)	- / - / - / KC681283 / KC681735
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Gallotia caesaris caesaris</i>	GagaH1	Ισπανία - Κανάριες Νήσοι - Νήσος El Hierro	(Carranza et al., 2006b) (16S rRNA) / (Carranza et al., 2004) (cyt b)	DQ298684 / AY151843 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Gallotia caesaris gomerae</i>	GagaG1	Ισπανία - Κανάριες Νήσοι - Νήσος La Gomera	(Carranza et al., 2006b) (16S rRNA) / (Carranza et al., 2004) (cyt b)	DQ298683 / AY151842 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Lacerta bilineata</i>	YCN-1	Ιταλία - Puglia, Noce	(Mayer and Beyerlein, 2001)	AF149973 / - / - / - / -

Βαθμονόμηση BEAST	<i>Lacerta bilineata</i>	-	Ιταλία - Melfi, Basilicata	(Brueckner and Duering, 2001)	- / AF233419 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Lacerta bilineata</i>	NHMC 80.3.61.26 clone 1	Ελλάδα - Ιωάννινα	(Sagonas et al., 2014)	KJ940220 / KJ940309 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Lacerta strigata</i>	isolate_3	Γεωργία	(Godinho et al., 2005)	DQ097098 / DQ097091 / - / - / - -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Lacerta viridis meridionalis</i>	NHMC 80.3.61.51	Ελλάδα - Έβρος	(Sagonas et al., 2014)	KJ940223 / KJ940312 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Lacerta viridis guentherpetersi</i>	NHMC 80.3.61.1	Ελλάδα - Πιερία	(Sagonas et al., 2014)	KJ940234 / KJ940323 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon lepidus</i>	ET-4	Ισπανία - Alicante	(Pavlicev and Mayer, 2009)	GQ142094 / GQ142119 / - / - / - -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon lepidus</i>	Nev418	Ισπανία - Almeria	(Nunes et al., 2011)	- / - / JF732968 / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon pater</i>	-	Τυνησία - Tabarka	(Paulo et al., 2008)	AF378958 / - / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon pater</i>	-	Τυνησία - Tabarka	(Paulo et al., 2008)	- / AF378964 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon pater</i>	Tun3	Τυνησία - Tabarka	(Nunes et al., 2011)	- / - / JF732957 / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon princeps</i>	-	Μη διαθέσιμη πληροφορία	(Harris et al., 1998)	AF080384 / AF080383 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon tangitana</i>	-	Τυνησία - Azrou	(Paulo et al., 2008)	AF378957 / - / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon tangitana</i>	-	Τυνησία - Azrou	(Paulo et al., 2008)	- / AF378959 / - / - / -
Βαθμονόμηση BEAST	<i>Timon tangitana</i>	Azr2	Τυνησία - Azrou	(Nunes et al., 2011)	- / - / JF732953 / - / -
Απομακρυσμένη Εξωομάδα	<i>Atlantolacerta andreanskyi</i>	LN-4	Μαρόκο - Jebel Toubkal	(Pavlicev and Mayer, 2009)	AF206603 / AF206537 / - / - / -
Απομακρυσμένη Εξωομάδα & Βαθμονόμηση BEAST	<i>Lacerta agilis</i>	NHMC 80.3.64.3	Ελλάδα - Μακεδονία - Δράμα	(Sagonas et al., 2014)	KJ940218 / KJ940307 / - / - / -
Απομακρυσμένη Εξωομάδα &	<i>Lacerta agilis</i>	Lagi1	Ισπανία	(Nunes et al., 2011)	- / - / JF732966 / - / -

Βαθμονόμηση BEAST					
Απομακρυσμένη Εξωομάδα	<i>Teira dugesii</i>	DG-18	Πορτογαλία – Madeira	(Pavlicev and Mayer, 2009)	GQ142096 / GQ142121 / - / - / -

\* Κατάθεση στο Εθνικό Μουσείο Πράγας (NMP - National Museum of Prague)

\*\* \* Κατάθεση στο Ουγγρικό Μουσείο Φυσικής Ιστορίας (HNHM - Hungarian Natural History Museum)

## Παράρτημα II

Κατάλογος δειγμάτων/αλληλουχιών/παρουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή σε αλφαβητική και αύξουσα σειρά κατά κωδικό δείγματος (ή κωδικό Genbank για τις ληφθείσες) και αντιστοιχισή τους στα ακόλουθα Σύνολα Δειγμάτων (βλ. Πρώτο Κεφάλαιο): I. Δύο mtDNA Τόποι (*16S rRNA* και *cyt b*), II. Αντιπρόσωποι των RTP συναθροίσεων, III. ddRADseq, IV. Μικροδορυφορικοί Τόποι, V. BP&P, και VI. BEAST πέντε γενετικών τύπων.

Κωδικός	Σύνολο Δειγμάτων I	Σύνολο Δειγμάτων II	Σύνολο Δειγμάτων III	Σύνολο Δειγμάτων IV	Σύνολο Δειγμάτων V	Σύνολο Δειγμάτων VI
12_1	x	x				x
17_2	x	x				x
3.120	x	x				x
AF233419						x
AF378957						x
AF378958						x
AF378959						x
AF378964						x
Azr2						x
BIS3	x					
BRU1	x					
CAV	x					
DB8970	x	x				x
DG-18	x					
ET-4						x
Fil01	x	x				x
Fil02	x	x				x
GagaG1						x
GagaH1						x
GLA	x					
Gpb6	x	x				x
HVA	x					
JAB1	x					
KCA	x					
KOR	x					
L.strigata isolate_3						x
Lagi1	x	x				x
LAS1	x					
LN-4	x					
Lucania	x					
MP3	x	x				x
MTA1	x	x				x
NCGC1	x					
NCGCL1	x					
Nev418						x

NHJS1	x					
NHMC						x
80.3.61.1						x
NHMC						
80.3.61.26						x
clone 1						
NHMC						x
80.3.61.51						x
NHMC						
80.3.64.3	x	x				x
PT6	x	x				x
PUR	x					
Sar1	x	x				x
Tan11	x	x				x
Tf2	x	x				x
Til01	x	x				x
Til02	x	x				x
Timon						
princeps						x
Tp1	x	x				x
Tun3						x
Vair5	x	x				x
VZP	x					
YCN-1						x
003				x		
014	x	x				x
015	x	x				x
017				x		
047				x		
050				x		
051	x	x		x	x	x
052	x			x		
053	x	x		x	x	x
054	x			x		
069				x		
070	x	x				x
079				x		
093	x	x				x
094	x	x				x
096	x	x				x
132	x					
143				x		
168	x			x		
170	x			x		
175	x			x		
176	x			x		
180	x	x		x	x	x
181	x			x		
182	x			x		
196	x			x		
197	x			x		

199	x				x	
200	x				x	
201	x	x			x	x
202	x				x	
203	x				x	
204	x				x	
205	x				x	
206	x	x			x	x
207	x				x	
208	x				x	
220	x				x	
223	x	x	x		x	x
224	x					
225	x				x	
227	x					
233	x				x	
287			x			
396	x	x	x			x
397	x	x	x			x
411					x	
412					x	
413					x	
414					x	
415					x	
416					x	
417					x	
418	x				x	
419					x	
420					x	
421					x	
422					x	
423					x	
425					x	
426					x	
427					x	
431			x			
432	x				x	
433					x	
434	x				x	
435					x	
436	x					
437					x	
438	x				x	
439	x				x	
440	x				x	
441					x	
442					x	
443					x	
444					x	
445	x				x	
446	x				x	



447	x			x		
448	x			x		
449				x		
450				x		
451				x		
452				x		
453	x			x		
454	x	x		x	x	x
455				x		
456				x		
457				x		
458	x			x		
459	x			x		
462	x					
463	x			x		
464	x			x		
465	x			x		
467	x			x		
468	x			x		
469	x			x		
470	x					
471	x			x		
472	x			x		
473				x		
474	x			x		
475	x			x		
476	x			x		
477	x			x		
479	x			x		
480	x					
481	x					
482	x			x		
484	x			x		
485	x			x		
486	x			x		
489	x			x		
490	x			x		
491	x			x		
492	x			x		
493	x			x		
494	x			x		
495	x			x		
496	x			x		
497	x			x		
498	x			x		
499	x			x		
500	x			x		
501	x			x		
502	x			x		
503	x			x		
504	x			x		

507	x			x		
508	x			x		
509	x					
510	x	x		x	x	x
511	x			x		
512	x			x		
513	x			x		
514	x			x		
515	x			x		
516	x	x		x	x	x
517	x			x		
518	x			x		
519						
520	x			x		
521	x			x		
522	x			x		
523	x	x		x	x	x
524	x			x		
525	x			x		
526	x			x		
527	x			x		
535				x		
536	x			x		
537				x		
538	x			x		
539				x		
540				x		
541	x			x		
542	x			x		
543	x			x		
544	x			x		
545	x	x		x	x	x
547				x		
548				x		
549				x		
550				x		
554	x					
555	x	x		x	x	x
556	x			x		
557	x			x		
558	x			x		
559	x			x		
561	x			x		
562	x			x		
563	x			x		
564	x			x		
565	x			x		
566	x			x		
568	x			x		
570	x			x		
571	x			x		

574	x			x		
576	x			x		
582	x			x		
583	x			x		
584	x			x		
588	x			x		
592	x			x		
593	x			x		
594	x			x		
595	x	x				x
596	x	x				x
599			x			
600	x			x		
601	x	x		x	x	x
603	x			x		
604	x			x		
605	x			x		
606	x			x		
607	x			x		
608	x					
609				x		
610	x			x		
611				x		
612	x			x		
613	x			x		
614	x			x		
615	x			x		
616	x			x		
617	x			x		
618	x			x		
619	x			x		
620	x			x		
621	x			x		
622	x			x		
623	x			x		
625	x	x				x
626	x			x		
627	x			x		
628	x			x		
629	x			x		
630	x			x		
631	x			x		
632	x			x		
633	x			x		
634	x			x		
635	x	x				x
636	x	x				x
637	x			x		
638	x	x		x	x	x
639	x	x				x
640	x	x				x

641	x	x				x
642	x	x				x
643	x	x		x	x	x
644	x			x		
645	x			x		
646	x			x		
647	x			x		
648	x			x		
649	x			x		
650	x			x		
651	x			x		
652	x			x		
653	x			x		
654	x			x		
655	x			x		
656	x	x	x	x	x	x
657	x		x	x		
658	x	x				x
659	x			x		
660	x			x		
661	x			x		
662	x			x		
663	x					
664	x			x		
665				x		
666	x			x		
667				x		
669				x		
670				x		
671			x			
672	x			x		
673			x	x		
674			x	x		
675				x		
676	x			x		
677	x			x		
678				x		
679			x	x		
680				x		
681			x	x		
682				x		
683				x		
684	x			x		
685				x		
686				x		
687				x		
688				x		
689	x			x		
690				x		
692	x			x		
693				x		

694	x			x		
696	x			x		
697				x		
698	x					
699	x			x		
701				x		
702				x		
703				x		
707				x		
708				x		
710			x			
711			x			
712	x	x		x	x	x
713	x	x		x	x	x
714	x			x		
715	x			x		
716	x		x	x		
717	x		x	x		
718	x	x	x	x	x	x
719	x			x		
720	x			x		
721	x			x		
726	x			x		
727	x			x		
728	x			x		
730	x			x		
732	x			x		
733	x			x		
734			x			
735			x			
736			x			
738	x		x	x		
739	x			x		
740	x			x		
741	x			x		
742	x			x		
743	x			x		
744	x			x		
745	x			x		
746	x			x		
747	x	x		x	x	x
748	x			x		
749	x			x		
750	x			x		
751	x			x		
752	x			x		
759	x			x		
761	x	x		x	x	x
762	x					
763	x	x		x	x	x
764	x			x		

765	x			x		
766	x			x		
767	x			x		
768	x			x		
769	x			x		
770	x	x		x	x	x
771	x			x		
772	x	x	x	x	x	x
773	x			x		
774	x			x		
775	x			x		
776	x			x		
777	x			x		
778	x			x		
779				x		
780	x			x		
781				x		
782				x		
783				x		
784	x			x		
785				x		
786				x		
787				x		
788				x		
789				x		
790				x		
791				x		
792				x		
793				x		
794				x		
795				x		
796				x		
797	x			x		
801	x		x	x		
805	x			x		
806	x			x		
810			x			
813			x			
815	x		x	x		
816			x			
817			x			
818			x			
819			x			
820			x			
821			x			
822			x			
823			x			
824			x			
825			x			
826			x			
827			x			

828			x			
829			x			
830			x			
852			x			
854	x		x	x		
855	x		x	x		
856	x		x	x		
857	x	x	x	x	x	x
858	x	x		x	x	x
859	x			x		
860	x			x		
861	x			x		
862	x			x		
863	x			x		
864	x			x		
865	x	x	x	x	x	x
866	x		x	x		
867	x			x		
869				x		
870	x			x		
871	x			x		
872	x	x		x	x	x
873	x			x		
874	x			x		
875	x			x		
876	x			x		
877	x			x		
878	x	x		x	x	x
879	x	x		x	x	x
880	x			x		
881	x			x		
882	x			x		
883	x	x		x	x	x
884	x			x		
885	x	x		x	x	x
886	x		x	x		
887	x	x	x	x	x	x
888	x	x		x	x	x
889	x			x		
890	x			x		
891	x			x		
892	x		x	x		
893	x			x		
894	x	x				x
895	x			x		
896	x			x		
897	x			x		
907			x			
919			x			
927	x					
928	x		x			

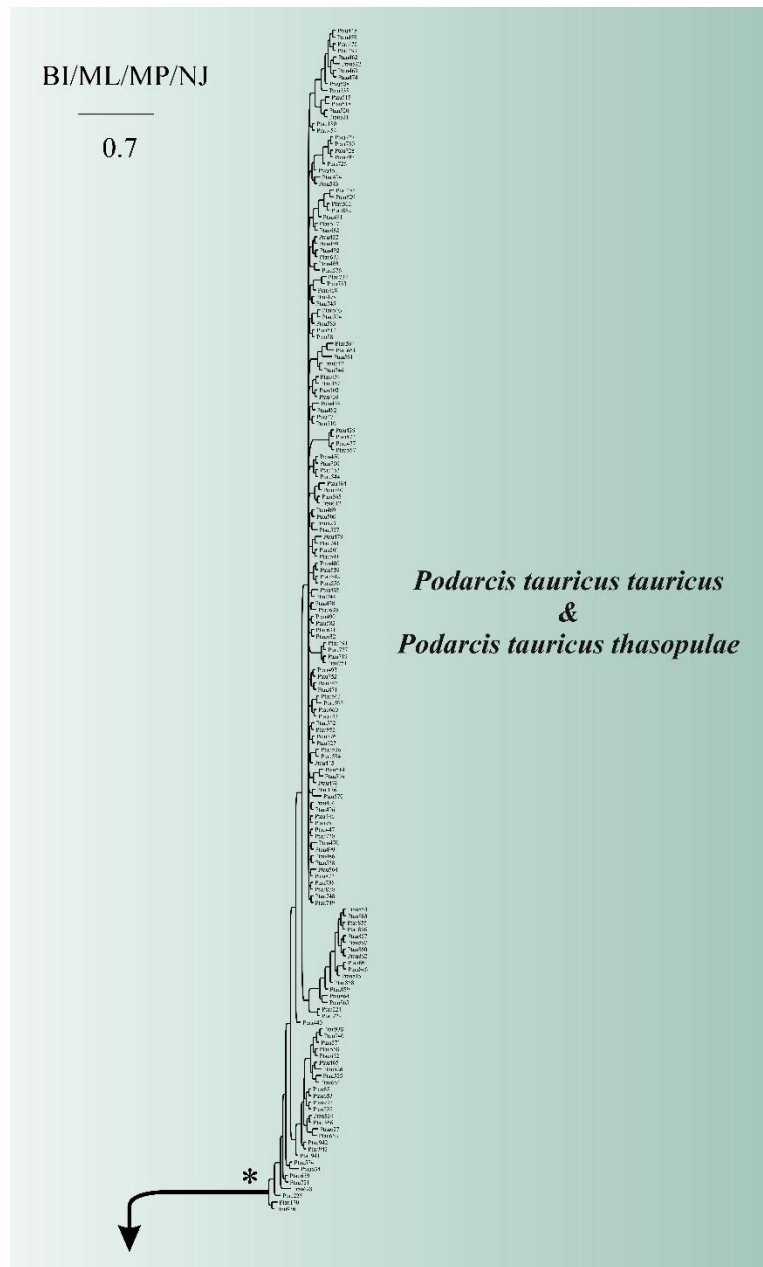
929	x	
930	x	
931	x	
932	x	
933	x	x
934	x	
935	x	
936	x	x
937	x	
938	x	
939	x	
940	x	
941	x	
942	x	
943	x	
945	x	
946	x	
947	x	
948	x	
949	x	
950	x	
951	x	
952	x	
953	x	
954		x
955		x
956		x
957		x
958		x
959		x
960		x
961		x
962		x
963		x
964		x
965		x
966		x
967		x
968		x
969		x
970		x
971		x
972		x
973		x
974		x
975		x
976		x
977		x
978		x
979		x
980		x



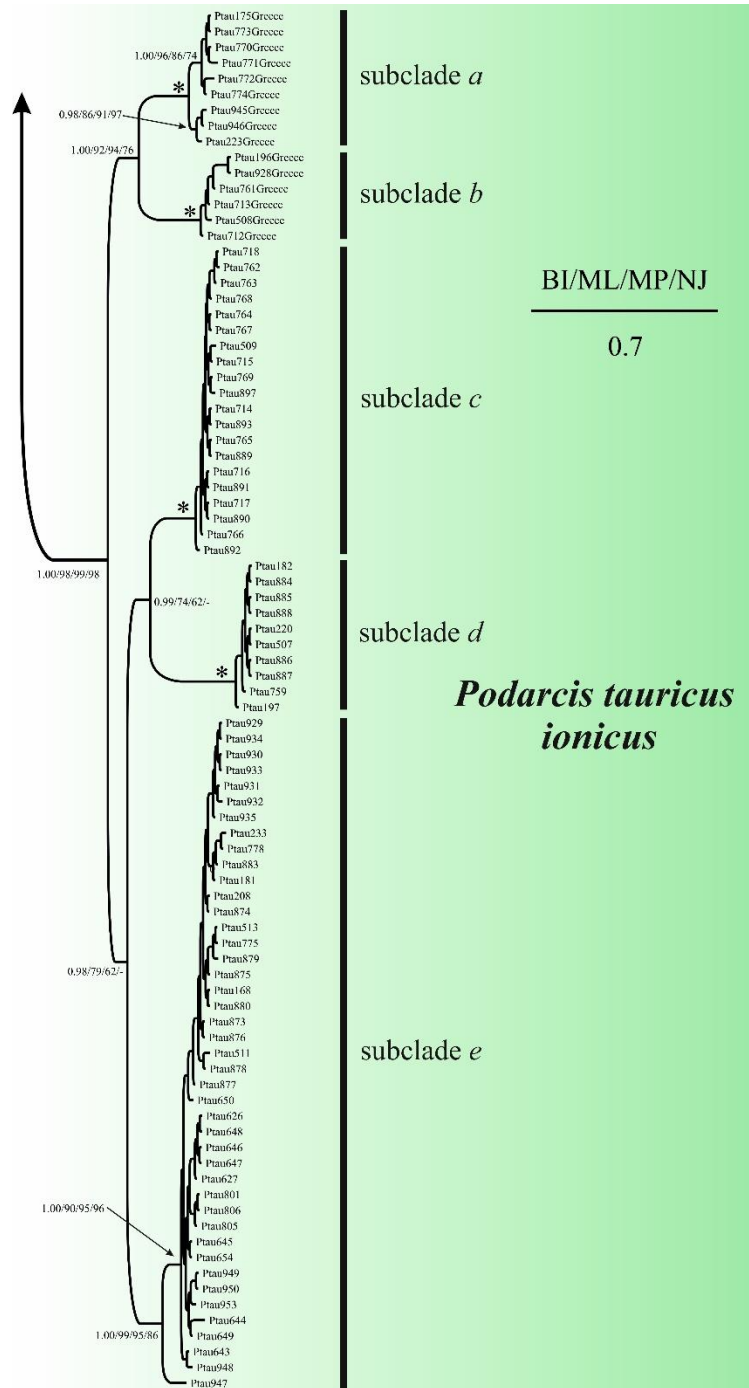
981	x
982	x
983	x
984	x
985	x
986	x
987	x
988	x
989	x
990	x
991	x
992	x
993	x
994	x
995	x
996	x
997	x
998	x
999	x
1000	x
1001	x
1002	x
1003	x
1006	x
1007	x
1008	x
1009	x
1010	x

## Παράρτημα III

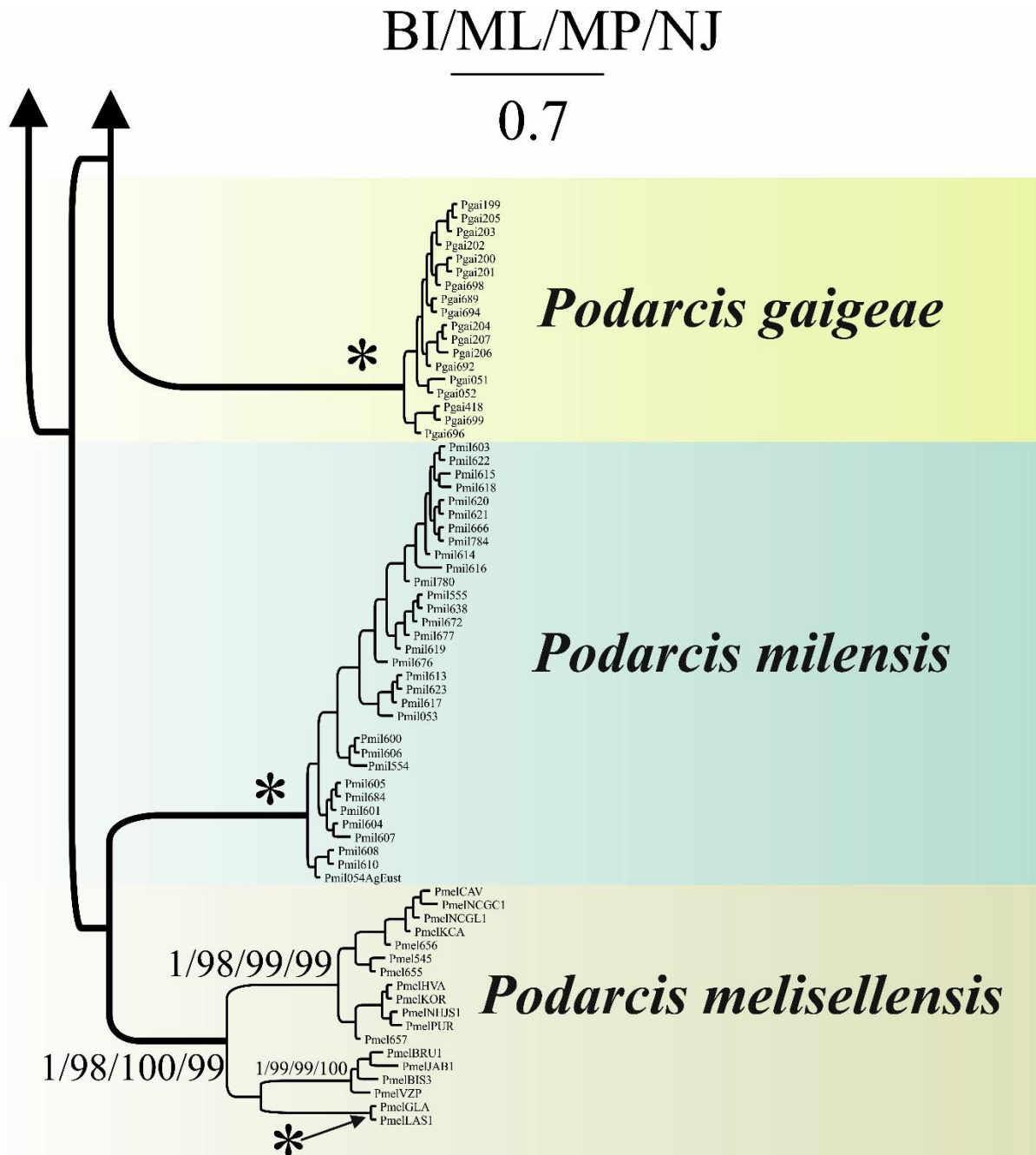
Συμπληρωματικά αποτελέσματα (εικόνες και πίνακες) της παρούσας διατριβής



Εικόνα Σ1. Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο mtDNA γενετικών τόπων (*cyt b* και *16S rRNA*) όσον αφορά τον φυλογενετικό κλάδο που αντιστοιχεί στα taxa *Podarcis tauricus tauricus* και *P. t. thasopulae*. Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (>0,95) και οι τιμές bootstrap (>50%) όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται πάνω από το κάθε φυλογενετικό κλαδί. Στις περιπτώσεις που δεν δίνεται τιμή η στατιστική υποστήριξη είναι μικρή, ενώ οι παύλες υποδηλώνουν διαφορετική τοπολογία. Τέλος, οι αστερισκοί υποδεικνύουν απόλυτη στατιστική υποστήριξη από όλες τις μεθόδους.

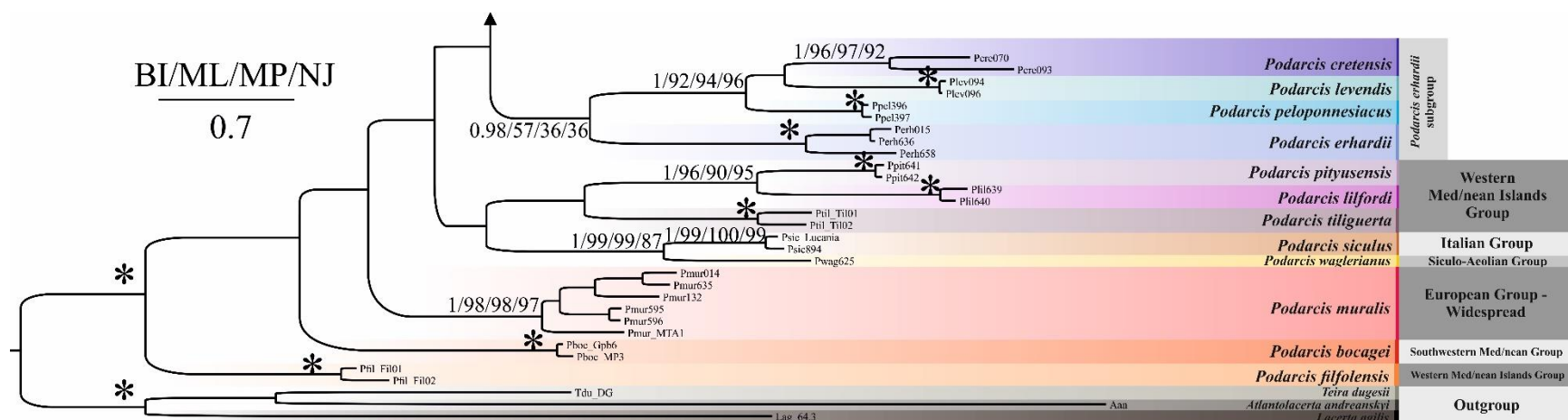


Εικόνα Σ2. Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο mtDNA γενετικών τόπων (*cyt b* και *16S rRNA*) όσον αφορά τον φυλογενετικό κλάδο που αντιστοιχεί στο taxon *Podarcis tauricus ionicus*. Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (>0,95) και οι τιμές bootstrap (>50%) όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται πάνω από το κάθε φυλογενετικό κλαδί. Στις περιπτώσεις που δεν δίνεται τιμή η στατιστική υποστήριξη είναι μικρή, ενώ οι παύλες υποδηλώνουν διαφορετική τοπολογία. Τέλος, οι αστερίσκοι υποδεικνύουν απόλυτη στατιστική υποστήριξη από όλες τις μεθόδους.



Εικόνα Σ3. Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο mtDNA γενετικών τόπων (*cyt b* και *16S rRNA*) όσον αφορά τους φυλογενετικούς κλάδους που αντιστοιχούν στα είδη *Podarcis gaigeae*, *P. milensis* και *P. melisellensis*. Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (>0,95) και οι τιμές bootstrap (>50%) όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται πάνω από το κάθε φυλογενετικό κλαδί. Στις περιπτώσεις που δεν δίνεται τιμή η στατιστική υποστήριξη είναι μικρή, ενώ οι παύλες υποδηλώνουν διαφορετική τοπολογία. Τέλος, οι αστερίσκοι υποδεικνύουν απόλυτη στατιστική υποστήριξη από όλες τις μεθόδους.



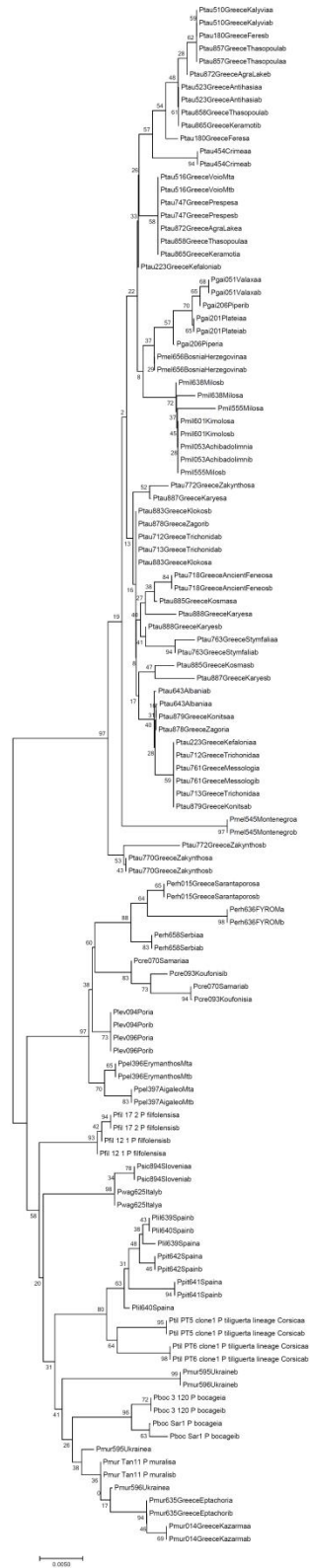


Εικόνα Σ4. Η τοπολογία του Bayesian Inference γονιδιακού δέντρου βάσει των δύο mtDNA γενετικών τόπων (*cyt b* και *16S rRNA*) όσον αφορά τους φυλογενετικούς κλάδους που αντιστοιχεί στα taxa που δεν ανήκουν στην υποομάδα ειδών «*Podarcis tauricus*». Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (>0,95) και οι τιμές bootstrap (>50%) όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται πάνω από το κάθε φυλογενετικό κλαδί. Στις περιπτώσεις που δεν δίνεται τιμή η στατιστική υποστήριξη είναι μικρή, ενώ οι παύλες υποδηλώνουν διαφορετική τοπολογία. Τέλος, οι αστερίσκοι υποδεικνύουν απόλυτη στατιστική υποστήριξη από όλες τις μεθόδους.

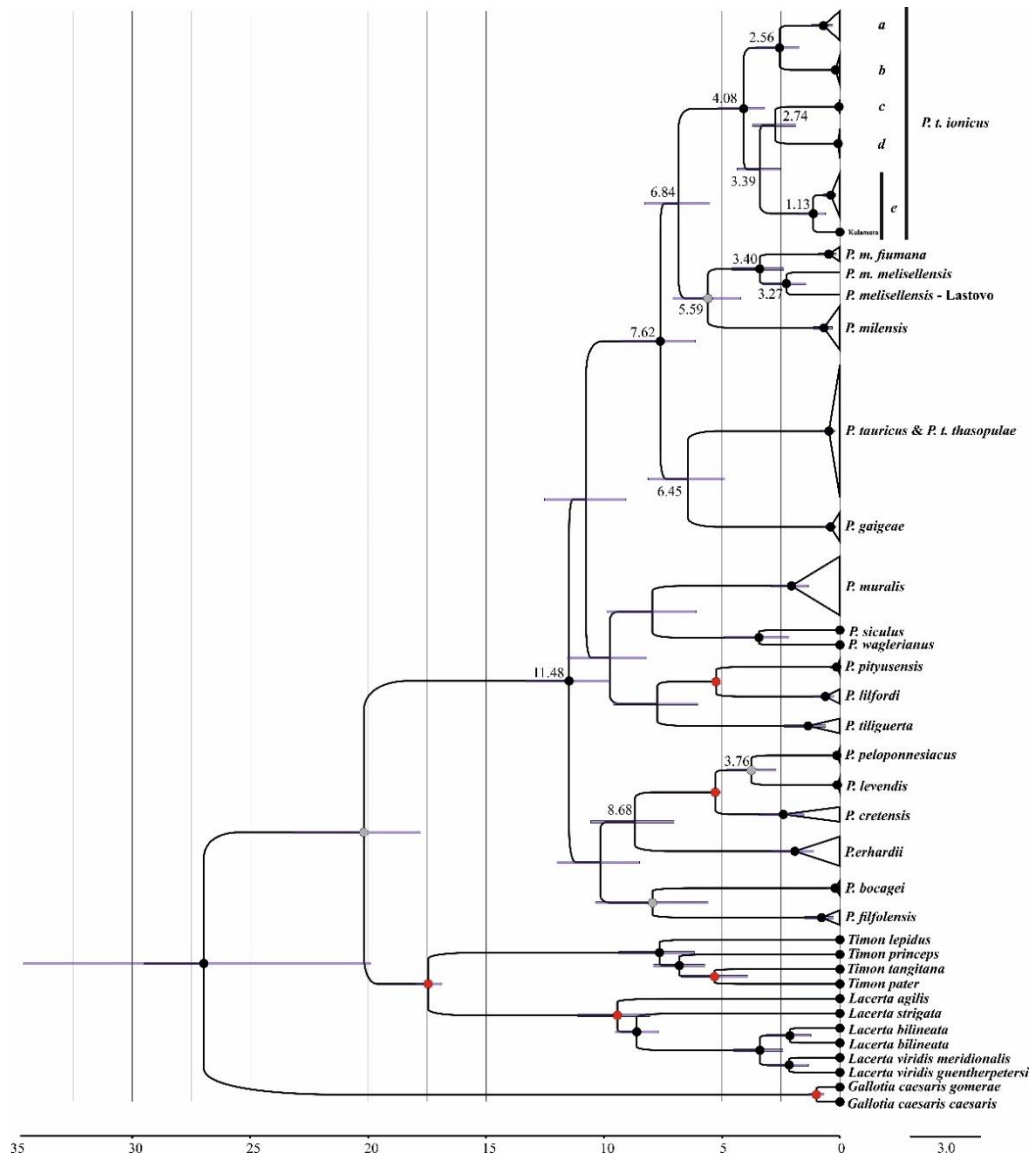








Εικόνα Σ7. Φυλογενετικό δέντρο βάσει της μεθόδου NJ με χρήση των phased data του γενετικού τόπου Rod15b. Στη βάση των κλάδων φαινόνται οι τιμές bootstrap.



Εικόνα Σ8. Το παραγόμενο βαθμονομημένο Bayesian δέντρο της χρονοφυλογενετικής ανάλυσης βάσει του Συνόλου Δειγμάτων VI, αλλά μόνο για τους δύο mtDNA τύπους και τροποποιημένο με προσθήκη των δειγμάτων (α) *P. t. ionicus* από Καλαμάτα και (β) *P. melisellensis* που αντιστοιχούν με τους υποκλάδους «lastovo» και «melisellensis». Οι χρωματισμένοι με μαύρο και γκριζο χρώμα κόμβοι υποδηλώνουν απόλυτη (εκ των υστέρων πιθανότητα = 1,00) και πολύ καλή ( $0,95 < \text{εκ των υστέρων πιθανότητα} < 1,00$ ) στατιστική υποστήριξη, ενώ η έλλειψη κύκλου υποδηλώνει χαμηλή στατιστική υποστήριξη. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι κόμβοι που χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία βαθμονόμησης. Οι αριθμοί στους κλάδους αποτελούν τους χρόνους απόκλισης σε εκατομμύρια χρόνια μερικών επιλεγμένων φυλογενετικών κλάδων, ενώ οι οριζόντιες μπάρες δείχνουν την αβεβαιότητα (95% HPD) της εκτίμησης των χρόνων. Η μπάρα στο κάτω μέρος είναι βαθμονομημένη επίσης σε εκατομμύρια χρόνια.

**Πίνακας Σ1.** Οι ανά ζεύγος mtDNA γενετικές αποστάσεις μεταξύ και εντός των κύριων φυλογενετικών κλάδων της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», όπως αποκαλύφθηκαν από τις φυλογενετικές αναλύσεις.

Λόγω του υπερβολικά μεγάλου μεγέθους ο πίνακας δεν παρατίθεται παρά μόνο ηλεκτρονικά σε μορφή MS Excel στους εξής συνδέσμους:

[https://www.researchgate.net/publication/308414777\\_Supplementary\\_Table\\_2\\_MPE\\_Psonis\\_et\\_al\\_2017\\_Podarcis\\_tauricus\\_species\\_subgroup\\_Pairwise\\_genetic\\_p-distances\\_concerning\\_the\\_focal\\_Podarcis\\_tauricus\\_species\\_subgroup\\_and\\_its\\_conspicuous\\_cyt\\_b\\_dataset\\_-](https://www.researchgate.net/publication/308414777_Supplementary_Table_2_MPE_Psonis_et_al_2017_Podarcis_tauricus_species_subgroup_Pairwise_genetic_p-distances_concerning_the_focal_Podarcis_tauricus_species_subgroup_and_its_conspicuous_cyt_b_dataset_-)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790316302329>

**Πίνακας Σ2.** Οι ανά ζεύγος nDNA γενετικές μεταξύ και εντός των κύριων φυλογενετικών κλάδων της υποομάδας ειδών «*P. tauricus*», όπως αποκαλύφθηκαν από τις φυλογενετικές αναλύσεις.

Λόγω του υπερβολικά μεγάλου μεγέθους ο πίνακας δεν παρατίθεται παρά μόνο ηλεκτρονικά σε μορφή MS Excel στους εξής συνδέσμους:

[https://www.researchgate.net/publication/308414777\\_Supplementary\\_Table\\_2\\_MPE\\_Psonis\\_et\\_al\\_2017\\_Podarcis\\_tauricus\\_species\\_subgroup\\_Pairwise\\_genetic\\_p-distances\\_concerning\\_the\\_focal\\_Podarcis\\_tauricus\\_species\\_subgroup\\_and\\_its\\_conspicuous\\_cyt\\_b\\_dataset\\_-](https://www.researchgate.net/publication/308414777_Supplementary_Table_2_MPE_Psonis_et_al_2017_Podarcis_tauricus_species_subgroup_Pairwise_genetic_p-distances_concerning_the_focal_Podarcis_tauricus_species_subgroup_and_its_conspicuous_cyt_b_dataset_-)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790316302329>

## Παράρτημα IV

### Διάχυση των αποτελεσμάτων (παρουσιάσεις σε συνέδρια και δημοσιεύσεις)

#### Παρουσιάσεις σε συνέδρια

- a. **Psonis N.**, Karameta E., Antoniou A., Kotsakiozi P., Sagonas K., Lymberakis P., Pavlidis P., Stamatakis A. & Poulakakis N. 2015 *Molecular Phylogeny of the Balkan Podarcis (Sauria, Lacertidae) using ddRAD-tag genomic data*. 13th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, 07-11 October, Heraklion, Crete, Greece.
- b. **Psonis N.**, Antoniou A., Kukushkin V.O., Petrov B., Crnobrnja – Isailović J., Gherghel I., Jablonski D., Lymberakis P. & Poulakakis N. 2015 *Investigating the phylogeography and population structure of the Podarcis tauricus group*. 7th Biennial Conference of the International Biogeography Society, 8-12 January, Bayreuth, Germany.
- c. **Ψώνης N.**, Αντωνίου Α., Kukushkin O.V., Petrov B., Crnobrnja – Isailović J., Gherghel I., Jablonski D., Λυμπεράκης Π & Πουλακάκης Ν. 2014 *Μοριακή Φυλογένεση και Φυλογεωγραφία της εξελικτικής ομάδας Podarcis tauricus (Sauria, Lacertidae)*. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Οικολογίας, Μυτιλήνη 9-12 Οκτωβρίου.
- d. **Psonis N.**, Kukushkin V.O., Petrov B., Crnobrnja – Isailović J., Gherghel I., Lymberakis P. & Poulakakis N. 2013 *Phylogeny and phylogeography of Podarcis tauricus group; insights from mitochondrial and nuclear data*. SEH 17th European Congress of Herpetology, Veszprém, Hungary 22-27 August.

#### Δημοσιεύσεις

- a. **Psonis N.**, Antoniou A., Kukushkin V.O., Petrov B., Crnobrnja – Isailović J., Gherghel I., Jablonski D., Lymberakis P. & Poulakakis N. (2017) *Hidden diversity in the Podarcis tauricus (Sauria, Lacertidae) species subgroup in the light of multilocus phylogeny and species delimitation*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, 6-17.
- b. Psonis N., (Phylogeography)
- c. Psonis N., (ddRADseq)

## Αντίγραφο Δημοσιεύσεων

Molecular Phylogenetics and Evolution 106 (2017) 6–17



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ympev](http://www.elsevier.com/locate/ympev)Hidden diversity in the *Podarcis tauricus* (Sauria, Lacertidae) species subgroup in the light of multilocus phylogeny and species delimitationNikolaos Psonis<sup>a,b,\*</sup>, Aglaia Antoniou<sup>c</sup>, Oleg Kukushkin<sup>d</sup>, Daniel Jablonski<sup>e</sup>, Boyan Petrov<sup>f</sup>, Jelka Cmobrnja-Isailović<sup>g,h</sup>, Konstantinos Sotiropoulos<sup>i</sup>, Iulian Gherghel<sup>j,k</sup>, Petros Lymberakis<sup>a</sup>, Nikos Poulakakis<sup>a,b</sup><sup>a</sup> Natural History Museum of Crete, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Knossos Avenue, Iraklio 71409, Greece<sup>b</sup> Department of Biology, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Vassilika Voutou, Iraklio 70013, Greece<sup>c</sup> Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Center for Marine Research, Gournes Pedlados, Iraklio 71003, Greece<sup>d</sup> Department of Biodiversity Studies and Ecological Monitoring, T.I. Vyazemskii Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS, Nauki Str., 24, str. Kurortnoe, Theodosia 298188, Republic of the Crimea, Russian Federation<sup>e</sup> Department of Zoology, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovakia<sup>f</sup> National Museum of Natural History, Sofia 1000, Bulgaria<sup>g</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Vršinačka 33, Niš 18000, Serbia<sup>h</sup> Department of Evolutionary Biology, Institute for Biological Research “Sinisa Stanković”, University of Belgrade, Despota Stefana 142, Beograd 11000, Serbia<sup>i</sup> Department of Biological Applications and Technologies, School of Health Sciences, University of Ioannina, Ioannina 45110, Greece<sup>j</sup> Department of Integrative Biology, Oklahoma State University, 501 Life Sciences West, Stillwater 74078, OK, USA<sup>k</sup> Department of Biology, Case Western Reserve University, 2080 Adelbert Road, Cleveland 44106 OH, USA

## ARTICLE INFO

## Article History:

Received 22 February 2016

Revised 19 August 2016

Accepted 12 September 2016

Available online 15 September 2016

## Keywords:

Coalescent methods

Hidden genetic diversity

Phylogenetic analyses

Species complex

Species delimitation

## ABSTRACT

The monophyletic species subgroup of *Podarcis tauricus* is distributed in the western and southern parts of the Balkans, and includes four species with unresolved and unstudied inter- and intra-specific phylogenetic relationships. Using sequence data from two mitochondrial and three nuclear genes and applying several phylogenetic methods and species delimitation approaches to an extensive dataset, we have reconstructed the phylogeny of the *Podarcis* wall lizards in the Balkans, and re-investigated the taxonomic status of the *P. tauricus* species subgroup. Multilocus analyses revealed that the aforementioned subgroup consists of five major clades, with *P. melisellenis* as its most basal taxon. Monophyly of *P. tauricus* sensu stricto is not supported, with one of the subspecies (*P. t. ioniacus*) displaying great genetic diversity (hidden diversity or cryptic species). It comprises five, geographically distinct, subclades with genetic distances on the species level. Species delimitation approaches revealed nine species within the *P. tauricus* species subgroup (*P. melisellenis*, *P. gaigeae*, *P. milensis*, and six in the *P. tauricus* complex), underlining the necessity of taxonomic re-evaluation. We thus synonymize some previously recognized subspecies in this subgroup, elevate *P. t. tauricus* and *P. g. gaigeae* to the species level and suggest a distinct Albanian-Greek clade, provisionally named as the *P. ioniacus* species complex. The latter clade comprises five unconfirmed candidate species that call for comprehensive studies in the future.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Wall lizards of the genus *Podarcis* Wagler, 1830 belong to the family of Lacertidae, currently including 23 species (Sindaco et al., 2013; Uetz and Hošek, 2016). The genus is western European in origin, its diversity being the result of several vicariance events mainly related to the fragmentation of the western microplates during the Miocene (Oliverio et al., 2000). It is now the predomi-

nant reptile group in southern Europe, distributed from northwestern Africa through the Iberian and the Italian peninsulas to the Balkans, northwestern Asia Minor and the Crimean peninsula (Arnold, 1973). Taxonomy within *Podarcis* is complicated and continuously subject to revision, due to the existence of substantial intra-specific variability (Arnold et al., 1978). The first molecular phylogenetic studies on the genus (Harris and Arnold, 1999; Oliverio et al., 2000) divided it into several species groups, with relationships mainly unresolved.

The focal taxa of this study form part of the Balkan species group, which is phylogenetically comprised of two distinct species subgroups: (a) the *P. erhardi* subgroup, including *P. cretensis*

\* Corresponding author at: Natural History Museum of Crete, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Knossos Avenue, Iraklio 71409, Greece.

E-mail address: nikos.psonis@gmail.com (N. Psonis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.09.007>

1055-7903/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

(Wettstein, 1952), *P. erhardii* (Bedriaga, 1882), *P. levandis* Lymberakis, Poulakakis, Kalliontzopoulou, Valakos, & Mylonas, 2008, and *P. peloponnesiacus* (Bibron & Bory, 1833); and (b) the *P. tauricus* species subgroup, consisting of *P. gaigeae* (Werner, 1930), *P. melsellensis* (Braun, 1877), *P. milensis* (Werner, 1930) and *P. tauricus* (Pallas, 1814). In the second subgroup, *P. gaigeae* and *P. milensis* are island endemics. Two morphological subspecies of the former are currently recognized: *P. g. gaigeae* (Werner, 1930) on the Skyros Archipelago, and *P. g. weigandi* (Gruber & Schultze-Westrum, 1971) on the islet of Piperi. On the other hand, *P. milensis* includes three morphological subspecies [*P. m. milensis* (Bedriaga, 1882), *P. m. adolfjordansi* (Buchholz, 1962), and *P. m. gerakuniae* (Müller, 1938)], distributed on the Milos Archipelago. *Podarcis tauricus* is the species with the widest distribution within the subgroup, ranging mainly in the southern Balkans and eastern Europe (Fig. 1C). It is subdivided into three currently recognized subspecies (Sindaco and Jeremcenko, 2008): (a) *P. t. tauricus* (Pallas, 1814); (b) *P. t. ionianus* (Lehrs, 1902); and (c) *P. t. thasopulae* (Kattinger, 1942), of which the first two are geographically isolated by the Pindos mountain range (Fig. 1C), and the third is a stenoendemic subspecies inhabiting the islet of Thasopoula (north Aegean). Finally, *Podarcis melsellensis* is distributed along the Dalmatian coast and on many of its islands, currently represented by two subspecies: *P. m. melsellensis* (Braun, 1877), *P. m. fiumana* (Werner, 1891), and one undescribed lineage (Podnar et al., 2004; Sindaco and Jeremcenko, 2008).

The phylogenetic relationships and phylogeography of the *P. tauricus* subgroup has previously been investigated on the basis of mitochondrial DNA (mtDNA) loci (Podnar et al., 2014, 2004; Poulakakis et al., 2005a,b). The analysis of a dataset including all the species of the *P. tauricus* subgroup, but with limited number of specimens solely from Greece, supported monophyly of the *P. tauricus* species subgroup with two major clades. The first included *P. tauricus* sensu stricto, and the second comprised *P. gaigeae*, *P. milensis*, and *P. melsellensis* (moderate statistical support). In addition, the existence of two major lineages within *P. tauricus* sensu stricto with substantial high genetic diversity was detected. Moreover, mtDNA data for *P. melsellensis* revealed the presence of three major subclades (*melsellensis*, *fiumana*, and *Lastovo* subclades) with distinct geographic structure that is in discordance with its current subspecies taxonomy (Podnar et al., 2014, 2004).

To date, there has been no comprehensive study of the *P. tauricus* species subgroup with extensive sampling coverage and genetic information from both mitochondrial and nuclear DNA. Such a study will contribute to (a) the discovery of hidden diversity, (b) comparison of phylogenetic assessment among nuclear and mitochondrial markers, (c) comparison between gene trees and species trees, (d) evaluation of the phylogenetic relationships among the focal taxa in the light of new findings, and (e) estimation of the number of species included in the *P. tauricus* species subgroup. To that end, two mitochondrial and three nuclear markers were analysed using an extensive dataset. This included samples from the entire distribution area of the focal taxa and involved several multilocus phylogenetic analyses and coalescence-based approaches.

## 2. Material and methods

### 2.1. Specimens, DNA extraction, amplification and sequencing

Total genomic DNA was isolated using a standard ammonium acetate extraction protocol from muscle, liver or blood of specimens preserved in absolute ethanol. The sampling localities are shown in Fig. 1 and the tissue samples are listed in Appendix A. All the samples were deposited in the Natural History Museum

of Crete, University of Crete (NHMC), but see Appendix A. The identification of species was based on external morphological characters sensu Arnold and Ovenden (2002). In total, 317 individuals constituting the ingroup were used (298 belonging to the focal *P. tauricus* species subgroup), including 13 species from more than 200 localities.

Double-stranded PCR was performed to amplify partial sequences of two mitochondrial gene (mtDNA) fragments [the large subunit of ribosomal RNA (16S rRNA) and the cytochrome *b* (*cyt b*)], and three nuclear gene (nDNA) fragments [the melanocortin receptor 1 (MC1R) and two anonymous nDNA markers (*Pod15b* and *Pod55*)]. These two anonymous markers have been recently added to the genomic resources and used for phylogenetic, species delimitation, population genetics and phylogeographic studies in *Podarcis* spp. (Pereira et al., 2013). Primers and conditions used in PCR amplifications and in cycle sequencing reactions are given in Table 1.

Single stranded sequencing of the PCR product was performed using the Big-Dye Terminator (v3.1) Cycle Sequencing kit<sup>®</sup> on an ABI3730 automated sequencer following the manufacturer's protocol and using the same primers as in PCR.

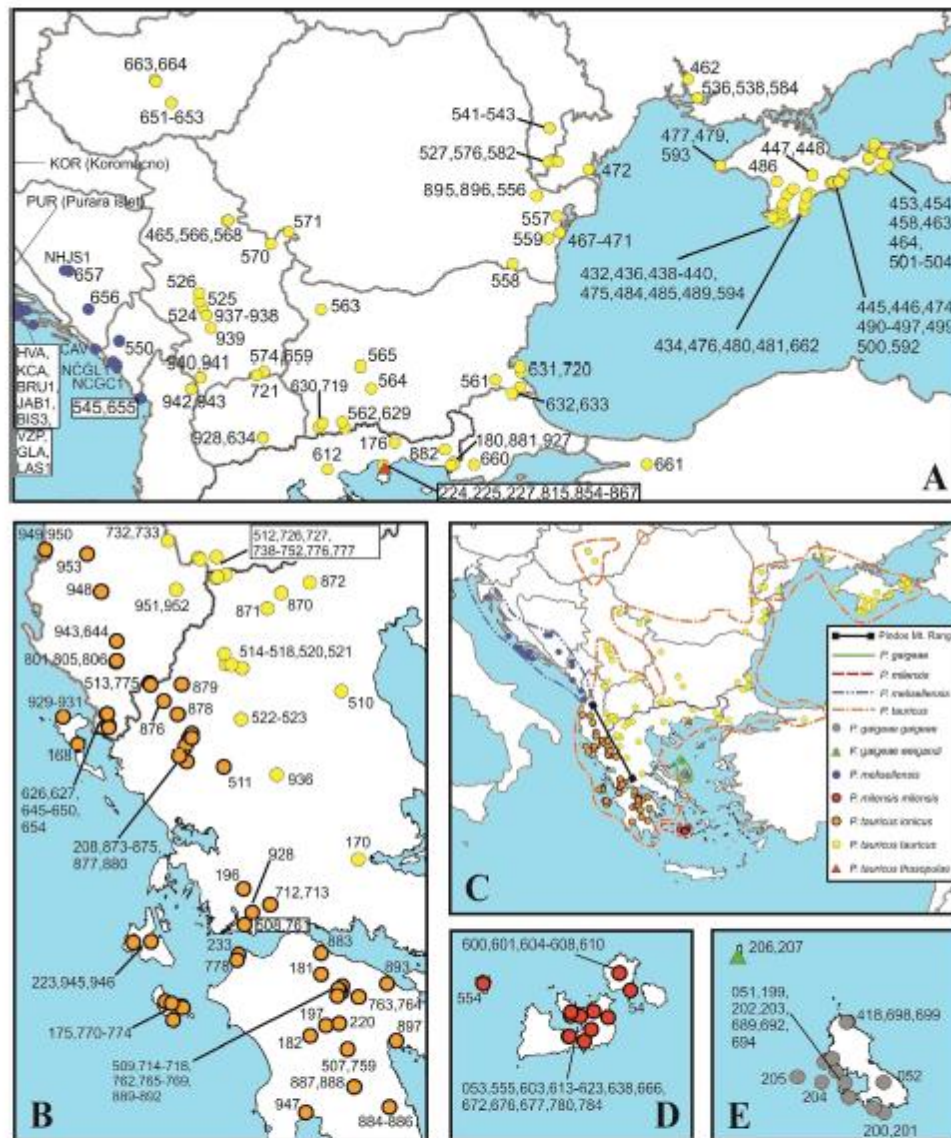
Sequences were viewed and edited using CodonCode Aligner v. 3.7.1 (CodonCode Corporation<sup>®</sup>). The authenticity of the sequences and the homology to the targeted genes were evaluated with a BLAST search in the NCBI genetic database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All newly determined sequences have been deposited in GenBank (Appendix A). Sequences of *Podarcis* were retrieved from GenBank (131 in total) and included in the phylogenetic analyses. Moreover, sequences of *Atlantolacerta andreanskyi* (Werner, 1929), *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758, and *Teira dugesii* (Milne-Edwards, 1829) were also retrieved and used as outgroups. Information for the downloaded sequences (gene sampling, corresponding accession numbers, and studies generating the sequences) are presented in Appendix A.

To ensure that nuclear copies of mtDNA (pseudo-genes) were not present in the dataset several precautions and observations were conducted: (a) the general agreement in the topology, between the two mtDNA markers, (b) the absence of indels in the *cyt b* since it is a protein-coding gene, and (c) the absence of double peaks in the sequence chromatographs.

### 2.2. Alignment, genetic distances and model selection

The alignment of the sequences was performed separately for each gene with MAFFT (v.7; Katoh and Standley, 2013) with default parameters and the following alignment strategies of iterative refinement method: L-INS-i for *cyt b*, MC1R, and *Pod-55*, Q-INS-i for 16S rRNA, and E-INS-i for *Pod15b*. Alignment gaps were inserted to resolve length differences between sequences. Cytochrome *b* and MC1R sequences were translated into amino acids prior to analysis, and did not show any stop codons. Sequence divergences (*p*-distances) were estimated in MEGA (v.6.06; Tamura et al., 2013). The alignment used is available on request.

The alignment was partitioned into nine blocks, including 6 blocks for the 1st, 2nd, and 3rd codon positions for each one of the two protein-coding genes (*cyt b*, MC1R) and three blocks for each one of the other gene fragments (16S rRNA, *Pod55*, and *Pod15b*). This initial partition scheme was loaded in PartitionFinder (v.1.1.0; Lanfear et al., 2012) to calculate and select the best-fit partitioning scheme and models of molecular evolution for each downstream analysis (the model list was different for each analysis). The nine blocks were considered to have linked branch lengths and the model selection was based on the Bayesian Information Criterion (BIC; Schwarz, 1978), ignoring the models that include both gamma distribution and invariable sites (Yang, 2006). Finally, the greedy option was selected to search for the best-fit solutions.



**Fig. 1.** Maps showing the localities of the samples and the distribution of the taxa belonging to the *P. tauricus* species subgroup: (A) northern parts of the entire range of *P. tauricus* species subgroup; (B) distribution pattern of *P. tauricus ionicus* and *P. t. tauricus* in the southwestern part of the Balkans; (C) sampled localities in the entire area of *P. tauricus* species subgroup; (D) Milos Island group and sampled localities of *P. milosensis milosensis*; (E) Sikyros Island group and Piperi islet and sampled localities of *P. galgasi*. The numbers/codes on the maps correspond to the sample codes of Appendix A.

To notice, in the species delimitation analysis and coalescent species tree inference the data were partitioned by loci due to requirement of ploidy provision.

### 2.3. Gene tree estimation on mtDNA, nuDNA and concatenated loci

Phylogenetic trees were constructed using Neighbor Joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987), Maximum Parsimony (MP), Maximum

Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). Neighbor Joining analysis was performed in MEGA using the p-distances. Bootstrapping with 1000 pseudo-replicates was used to examine the robustness of clades in the resulting tree (Felsenstein, 1985). Maximum Parsimony analysis was performed with PAUP (v.4.0b10; Swofford, 2002) with heuristic searches using stepwise addition and performing tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping (Swofford et al., 1996). Confidence in the nodes was assessed by

**Table 1**  
Primers and conditions used in PCR amplifications<sup>a</sup> and in cycle sequencing reactions.

Gene	Primers	Sequence (5'–3')	Size (bp)	Conditions	Reference
16S rRNA	16SAr-1	CGGCCCGCTGTATATCAAAAACAT	~530	3 mM MgCl <sub>2</sub> , 94 °C/1 min, 42–52.9 °C/1 min, 72 °C/1 min × 35 cycles	Palumbi (1996)
	16SBr-b	GGAGCTCCGGTGTGAACCTCAGATC			
<i>Cyt b</i>	GUJDC	TGACTTGAARAACCAVCGTTG	~510	3 mM MgCl <sub>2</sub> , 94 °C/1 min, 42–48.6 °C/1 min, 72 °C/1 min × 35 cycles	Palumbi (1996)
	CB2	CCTCAGAAATGATATTTGCTCTCA			
	L14841	AAAAAGCTTCCATCCACATCTCAGCATGATGAAA			
MC1R	MC1RF	GGONGCCATYGTCAAGAACCGGAACC	~700	1.5 mM MgCl <sub>2</sub> , 94 °C/1 min, 59 °C/1 min, 72 °C/1 min × 35 cycles	Pinho et al. (2010)
	MC1RR	CTCCGRAAGGCRTAATGATGGGGTCCAC			
Pod55	pod55f	GGATCTTTATAGGAGAGTCAGGCC	~500		Pezeira et al. (2013)
	pod55r	TTCAGATTGTGTTTATCTGGTGG			
Pod15b	pod15bf	AATCTCGCTAAATGCAAGCCTTGG	~550		Pezeira et al. (2013)
	pod15br	GCCAGGAGAAATAGCTACTCCATCC			

<sup>a</sup> Using single Taq DNA polymerase (KAPA BIOSYSTEMS®).

1000 bootstrap replicates, with the random addition of taxa. Maximum Likelihood analysis was performed with RAxML (v.8.1.21; Stamatakis, 2014). To ensure that the inferred ML tree was not a local optimum, 200 ML searches for each dataset were conducted. The confidence of the branches of the best ML tree was further assessed based on 1000 rapid bootstrap replicates (under the GTRCAT model). Bayesian Inference was performed in MrBayes (v.3.2.1; Ronquist et al., 2012), with four runs and eight chains for each run for 10<sup>7</sup> generations, and the current tree was saved to file every 1000 generations. In order to confirm that the chains had achieved stationarity, we evaluated “burn-in” by plotting log-likelihood scores and tree lengths against generation number using Tracer (v.1.6; Rambaut et al., 2013). The -lnL stabilized after approximately 10<sup>5</sup> generations and the first 25% of the trees were discarded by default, as a conservative measure to avoid the possibility of including random sub-optimal trees. A majority rule consensus tree (“Bayesian” tree) was then produced from the posterior distribution of trees, and the posterior probabilities were calculated as the percentage of samples recovering any particular clade, where probabilities ≥ 95% indicate significant support.

Mitochondrial genetic clusters that represent “independently evolving” entities were selected, considering only the ingroup, using the method of Zhang et al. (2013), which identifies genetic clusters using a Poisson Tree Processes (PTP) model. Identical sequences were omitted from this analysis. For the concatenated phylogenetic analyses, at least one exemplar representing each PTP group (genetic cluster) in the mtDNA analysis was selected for sequencing the three nuclear markers. Following the same procedure as in mtDNA data, all phylogenetic (NJ, MP, ML and BI) analyses were performed, additionally, on (a) a concatenated dataset containing the two mitochondrial (16S rRNA and *cyt b*) and the three nuclear genes (MC1R, Pod55, and Pod15b) and (b) a dataset including only the nDNA markers. These datasets included 60 entities representing 16 morphologically identified *Podarcis* species, for which all five genes were amplified. Sequences representing the above genes were also obtained from NCBI belonging to *Lacerta agilis* (used as outgroup), *P. bocagei* (Seoane, 1884), *P. filiformis* (Bedriaga, 1876), *P. muralis*, and *P. tiliguerta* (Gmelin, 1789).

#### 2.4. Coalescent species tree

The coalescent species tree analysis was performed using the BEAST 2 software package (v.2.4.0; Bouckaert et al., 2014). The input files (xml) were created using BEAUti v. 2.4.0, implemented also in the BEAST 2 package. The nucleotide substitution models were not given a priori but instead the BEAST Model Test option was selected. As for other priors the Yule Model was selected for speciation and the Uncorrelated Lognormal Model for describing the relaxed molecular clock. The MCMC analysis was run for

$4 \times 10^8$  generations, saving the result every 5,000 generations. The obtained log files were analysed with Tracer v.1.6. (Rambaut et al., 2014) to verify that the convergence of the analysis had been achieved and that satisfactory effective sample sizes had been obtained (ESSs values >200). The value of -lnL was stabilized after  $4 \times 10^7$  generations and the first 10% from the 20,000 saved ones were discarded. To display the species tree the softwares FigTree (v. 1.4.2; part of the BEAST 2 package) and DensiTree (v.2.2.4; Bouckaert, 2010) were used.

#### 2.5. Species delimitation

Bayesian species delimitation was conducted using BPP (v.3.1 as implemented in BPPx; Yang, 2015) with the dataset for the five molecular markers considered as four independently evolving loci (mtDNA, MC1R, Pod55, and Pod15b) and solely including the nine major clades and subclades of *P. tauricus* species subgroup as potential distinct species. The method uses the multispecies coalescent model to compare different models of species delimitation and species phylogeny in a Bayesian framework, accounting for incomplete lineage sorting due to ancestral polymorphism and gene tree-species tree conflicts (Rannala and Yang, 2013; Yang and Rannala, 2014, 2010). For the prior distributions the approach of Leaché and Fujita (2010) was followed, considering three different combinations of prior: (a)  $\theta \sim G(1, 10)$  and  $\tau^0 \sim G(1, 10)$ , both with a prior mean = 0.1 and variance = 0.01, (b) assuming relatively small ancestral population sizes and shallow divergences among species:  $\theta \sim G(2, 2000)$  and  $\tau^0 \sim G(2, 2000)$ , both with a prior mean = 0.001 and variance =  $5 \times 10^{-7}$ , and (c) assuming large ancestral populations sizes:  $\theta \sim G(1, 10)$  and relatively shallow divergences among species:  $\tau^0 \sim G(2, 2000)$ , which is a conservative combination of priors that should favour models containing fewer species. The rjMCMC analyses (algorithm 1) were performed for 100,000 generations (sampling interval of three) with a burn-in period of 2500 and each species delimitation model was assigned equal prior probability. Each analysis was run at least twice, initiated with different starting seeds, to confirm consistency between runs. The topology of the phylogenetic tree based on the concatenated dataset was given as starting tree.

For comparison reasons, species delimitation was also performed in STACEY (v. 1.2.1; Jones, 2015), which is implemented in the software package BEAST 2. The input files (xml) were created using BEAUti. The nucleotide substitution models were not given a priori but instead the BEAST Model Test option was selected. As for other priors the Fossilized Birth Death Model was selected for speciation and the Uncorrelated Lognormal Model for describing the relaxed molecular clock. The MCMC analysis was run for 10<sup>8</sup> generations, saving the result every 5000 generations. The obtained log files were analysed with Tracer to verify that the convergence



of the analysis had been achieved and that satisfactory effective sample sizes had been obtained. The value of  $-lnL$  was stabilized after  $10^7$  generations and the first 10% from the 20,000 saved ones were discarded. The analysis and the display of the results of the species delimitation and its statistical support were made by SpeciesDelimitationAnalyser (Jones et al., 2015).

### 3. Results

The best-fit partitioning schemes for each downstream analysis (BI and ML) and the selected nucleotide substitution models are summarized in the Supplementary Table S1. Different analyses and datasets resulted in different partitioning schemes and selected models.

In PTP analysis, 34 distinct evolutionary entities were identified (Suppl. Fig. S1). Up to 10 specimens from each evolutionary entity (Appendix A) were chosen and sequenced for the nuclear markers (MC1R, Pod55, and Pod15b), with the exception of the samples 947 (*P. tauricus* from Kalamata) and 132 (*P. muralis* from Kisavos Mt.), for which we failed to amplify the nDNA markers, as well as for the samples for which the mtDNA sequences were retrieved from GenBank (e.g. Lastovo subclade of *P. melisellensis*).

#### 3.1. Concatenated gene trees

For the phylogenetic analyses at mtDNA level, a concatenated (cyt *b* and 16S rRNA) data set including 365 individuals (86 unique haplotypes) was used (sequences both generated here

and downloaded), with 362 of them constituting the ingroup. A total of 1004 base pairs (cyt *b* 465 bp and 16S rRNA 539 bp) were aligned, with 294 (29.3%) alignment sites being variable and 266 (26.5%) parsimony informative (349 and 279, respectively, when outgroups were included in the analysis). For the nDNA data, a total of 1739 base pairs (MC1R 696 bp, Pod55 474 bp, and Pod15b 569 bp) were aligned, with 164 (9.4%) alignment sites being variable and 103 (5.9%) parsimony informative (172 and 103, respectively, when outgroup was included in the analysis). The length of the sequences produced in the present study varied from 576 to 696 bp for the MC1R gene, from 408 to 474 bp for the Pod55 gene, and from 415 to 541 bp for the Pod15b gene. Finally, for the concatenated dataset (all five molecular markers) a total of 2718 base pairs were aligned, with 438 (16.1%) alignment sites being variable and 353 (13.0%) parsimony informative (468 and 355, respectively, when outgroup was included in the analysis).

Sequence divergence (p-distance) ranged from 0 to 23.7% for the cyt *b* gene and from 0 to 19.9% for the 16S rRNA gene. The mtDNA genetic distances among and within the major clades revealed by the phylogenetic analyses are shown in Tables 2 and 3, whereas the pairwise mtDNA genetic distances are shown in Supplementary Table S2. Sequence divergence ranged from 0 to 2.7% for the MC1R gene, from 0 to 3.3% for the Pod55 gene, and from 0 to 5.9% for the Pod15b gene. Table 4 shows the nDNA genetic distances among and within the major clades revealed by the phylogenetic analyses, whereas the pairwise nDNA genetic distances are shown in Supplementary Table S2.

**Table 2**  
Genetic p-distances of the cyt *b* (below diagonal–left) and 16S rRNA genes (above diagonal–right) among the major clades. Values in diagonal (italics) are within clades sequence divergence (cyt *b*/16S rRNA), whereas dashes indicate the absence of the taxon from the 16S rRNA gene sampling, and n.a. indicate inability to compute inter-lineage divergence due to unitary representative of the clade.

Clade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. <i>P. t. tauricus</i> & <i>P. t. thoaspulæ</i>	0.4/0.1	5.3	5.6	5.2	5.9	6.7	7.3	5.6	5.8	4.8	5.7	–	6.1	7.3	6.8	7.3	–	10.9	15.4	13.4
2. <i>P. t. tauricus</i>	10.6	5.0/1.4	5.0	4.4	4.7	6.6	6.5	5.2	5.6	5.0	5.8	–	6.2	6.7	5.44	6.3	–	9.	14.8	12.2
3. <i>P. galgene</i>	11.9	11.4	0.3/0.2	4.7	5.5	6.2	6.4	5.9	6.0	5.0	5.5	–	5.6	5.8	6.0	6.6	–	11.2	15.4	11.3
4. <i>P. milensis</i>	11.0	10.6	9.6	1.0/0.4	4.3	6.9	6.1	5.5	5.5	5.0	6.2	–	5.5	6.0	6.3	6.8	–	9.7	14.6	12.3
5. <i>P. melisellensis</i>	12.2	12.3	10.8	10.4	3.7/1.3	6.1	6.1	5.1	5.9	4.6	5.6	–	5.2	5.1	5.1	5.1	–	8.3	12.7	11.7
6. <i>P. cretensis</i>	13.4	13.3	14.6	13.4	15.2	4.6/2.3	3.7	3.4	5.7	5.1	6.4	–	6.9	7.3	6.4	5.6	–	8.9	14.1	12.8
7. <i>P. leventis</i>	12.4	14.1	15.2	13.3	14.4	7.9	0.2/0.0	2.9	5.0	5.3	6.4	–	6.8	7.2	6.0	5.7	–	9.6	15.3	12.8
8. <i>P. peloponneisicus</i>	14.1	14.7	15.9	14.3	16.3	7.3	7.5	0.3/0.0	4.0	3.8	5.1	–	5.5	6.6	6.0	5.5	–	9.3	14.6	12.4
9. <i>P. ehardii</i>	13.8	13.5	15.1	13.0	13.5	13.6	12.4	13.2	2.7/1.3	4.9	5.5	–	5.5	6.5	6.4	6.0	–	9.9	15.0	12.6
10. <i>P. pitrusensis</i>	18.2	16.2	17.7	15.4	15.4	15.9	18.6	17.6	16.9	0.3/0.0	1.5	–	4.9	5.3	5.0	5.7	–	8.3	13.7	11.4
11. <i>P. illfordi</i>	16.4	14.5	15.2	15.1	13.8	13.8	124.7	142	16.2	10.4	1.1/0.2	–	4.7	5.4	6.0	6.4	–	9.9	14.3	11.5
12. <i>P. rikguensis</i>	14.0	17.2	17.6	16.1	15.4	14.2	15.4	14.3	16.1	14.4	15.8	3.3/–	–	–	–	–	–	–	–	–
13. <i>P. siculus</i>	12.0	13.2	14.2	13.8	12.0	14.5	15.3	16.5	12.1	13.7	15.3	14.3	1.9/0.0	2.2	5.3	6.5	–	10.5	11.	12.5
14. <i>P. wagnerianus</i>	13.3	13.6	13.8	13.4	11.5	16.1	14.6	16.4	13.3	12.4	13.4	13.2	6.6	n.a./n.a.	5.4	6.1	–	10.6	12.5	12.2
15. <i>P. muralis</i>	14.3	14.0	16.9	14.3	13.7	13.3	14.0	15.3	13.3	16.3	16.0	13.2	11.8	12.1	3.9/1.2	5.5	–	9.4	14.3	11.5
16. <i>P. bocagei</i>	14.4	14.9	14.7	15.8	14.2	15.4	15.5	16.0	16.2	17.2	15.2	13.2	15.2	12.7	12.1	0.7/0.0	–	8.8	13.4	11.4
17. <i>P. filloensis</i>	16.6	17.1	16.1	16.8	16.0	17.6	14.8	17.3	16.3	17.1	15.0	16.3	15.4	14.3	16.0	15.4	2.9/–	–	–	–
18. <i>T. dugesi</i>	18.2	18.7	20.2	19.4	20.2	15.9	14.4	16.4	17.6	19.4	18.1	18.3	17.5	17.5	17.9	17.0	16.8	n.a./n.a.	12.6	10.8
19. <i>A. andreasnyi</i>	18.3	18.6	19.2	18.1	20.6	19.1	18.8	20.2	17.5	22.8	23.7	22.1	20.4	20.2	19.7	17.6	21.1	16.8	n.a./n.a.	16.0
20. <i>L. agrilis</i>	17.8	19.0	20.0	17.2	17.8	15.9	15.0	18.5	16.6	17.6	15.7	20.9	17.3	17.2	18.1	19.3	19.8	16.6	20.8	n.a./n.a.

**Table 3**Genetic distances of the mtDNA (cyt b/16S rRNA; below diagonal-left) and the nuDNA genes (Pcd55/Pod15b/MC1R; above diagonal-right) among the major subclades of *Podarcis tauricus* *ionicus*. Values in diagonal (italic) are within subclade sequence divergence for the five loci (cyt b/16S rRNA/Pod55/Pod15b/MC1R).

<i>Podarcis tauricus ionicus</i> subclade	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
(a) Zakynthos and Kefallonia Islands	0.6/0.5/0.0/0.2/0.0	0.1/0.3/0.3	0.2/0.5/0.6	0.0/0.2/0.3	0.2/0.3/0.3
(b) Western central Greece (Sterea Ellada)	5.3/3.2	0.7/0.20.1/0.0/0.1	0.2/0.5/0.4	0.0/0.2/0.2	0.1/0.1/0.1
(c) Northeastern Peloponnisos	8.7/2.6	9.2/3.6	0.3/0.0/0.2/0.8/0.0	0.2/0.2/0.4	0.2/0.4/0.5
(d) Central & Southeastern Peloponnisos	7.4/2.5	7.6/3.1	7.7/1.2	0.2/0.0/0.0/0.0/0.1	0.1/0.1/0.2
(e) Northern & Southwestern Peloponnisos, Northwestern Greece, Kerkyra Island, South-southwestern Albania	7.7/2.5	6.9/2.7	7.4/1.5	6.2/1.6	0.5/0.2/0.2/0.1/0.0

All mtDNA phylogenetic analyses (NJ, MP, ML, and BI) produced trees with very similar topologies (Suppl. Figs. S2 and S3). Unweighted parsimony analysis produced more than 10,000 equally parsimonious trees with a length of 1370 steps (consistency index CI = 0.366, retention index RI = 0.934). The large number of equally parsimonious solutions was largely due to terminal branch swapping. Maximum likelihood analysis resulted in a topology with InL = -7367.62. Bayesian inference resulted in a topology with mean InL = -8348.59. Identical topologies were recovered for each of the four runs with the full dataset, and the 50% majority-rule consensus tree of the  $75 \times 10^3$  trees remaining after burn-in is presented in Supplementary Fig. S2 (full topology), as well as in Supplementary Fig. S3 (collapsed to main clades topology). According to the resulted tree, the specimens of the genus *Podarcis* used in the present study are clustered into several main clades, with the majority of the morphologically recognized species being monophyletic. The phylogenetic relationships among them are mostly unresolved with the exception of four groupings; the *Podarcis tauricus* species subgroup, the *P. erhardii* species subgroup, the *P. siculus* - *P. wagnerianus* pair, and the *P. ptyusensis* - *P. lilfordi* pair. In the focal *P. tauricus* species subgroup, which appears monophyletic with moderate to high statistical support, five well-supported clades with unresolved phylogenetic relationships among them are recognized corresponding to the morphologically recognized taxa *P. melisellensis*, *P. milensis*, *P. gaigeae*, *P. t. ionicus* and *P. t. tauricus* - *P. t. thasopulae*. According to the mtDNA topology *P. tauricus* is polyphyletic, although with low statistical support, due to the more closely relationship of *P. t. ionicus* to *P. gaigeae*. On the other hand, *P. t. ionicus* is a monophyletic taxon, with five well-supported subclades (a - e; see Suppl. Fig. S3 for their corresponding distribution). However, the among-subclades relationships are partly resolved (only a and b have sister group relationship with high statistical support, whereas the relationship between c and d is supported by moderate to high statistical value. The other two subspecies of *P. tauricus* (*P. t. tauricus* and *P. t. thasopulae*) are grouped together in the same clade, containing specimens from a wide range of *P. tauricus* distribution (Fig. 1A-C) with low genetic diversity (Suppl. Fig. S2). The clade of *P. gaigeae* includes specimens from the island of Skyros and the islets Sarakino, Plateia, Koulouri, Exo Diavatis, Lakonisi, Skyropoula, Valaxa, Palamari, Rineia, and Piperi, with the subspecies inhabiting the latter (*P. g. weigandii*) not being phylogenetically distinct from *P. g. gaigeae* (Suppl. Fig. S2). The clade of *P. melisellensis* is divided into three, geographically distinct, subclades, with unresolved phylogenetic relationships among them (Suppl. Figs. S2 and S3). Two of them are originating from Dalmatian islands and islets (first subclade from Glavat and Lastovo, and the second from Jabuka, Brusnik, BiSevo, and Vis), whereas the third one contains specimens from Montenegro, Bosnia & Herzegovina, Croatian coastal area (Koromačno-Istria, Cavtat-Dalmatia) and some Dalmatian islands (Korčula Island, Purara islet, and Hvar Island). Finally, the clade of *P. milensis* consists of specimens from the island group of Milos (Milos Island, Kimolos Island, and Antimilos and Agios Efstathios islets).

All phylogenetic (NJ, MP, ML, and BI) analyses of the nuDNA dataset produced phylogenies (Suppl. Fig. 4) that are in agreement with the mitochondrial ones (Suppl. Figs. S2 and S3) with InL = -3943.03 for ML and InL = -4084.80 for BI, but with incongruities in statistical support.

Respectively, all phylogenetic (NJ, MP, ML, and BI) analyses of the concatenated dataset (mtDNA and nuDNA) produced a more resolved phylogenetic tree (Fig. 2; InL = -10,299.76 for ML and InL = -10,192.86 for BI). Based on this tree and the results obtained from the mtDNA data (a) there is high to moderate statistical support that *P. melisellensis* is the root taxon of the *P. tauricus* species subgroup, (b) in the *P. erhardii* species subgroup, *P. erhardii* is the root taxon and *P. peloponnesiacus*, *P. lewendis*, and *P. cretensis* are close related with the latter two being sister taxa, (c) *P. tillguerta* is more closely related to the *P. lilfordi* - *P. ptyusensis* pair and (d) *P. muralis* and *P. bocagei* have sister-taxon relationship.

### 3.2. Species tree

In the multilocus coalescent species tree analysis the ESS values were good (>224) with InL = -9788.00. The species tree (Figs. 3 and 4) is partly in agreement with the concatenated tree (Fig. 2) supporting (a) the monophyly of *P. tauricus* species subgroup, (b) the monophyly of *P. t. ionicus*, (c) *P. erhardii* being the root taxon of the homonym species subgroup, (d) *P. tillguerta* being closely related to the sister taxa *P. lilfordi* and *P. ptyusensis*, (e), and (f) the sister taxon relationship between *P. muralis* and *P. bocagei*. On the other hand, the majority of the nodes that are close the root have low statistical support. The same applies for the phylogenetic relationships among the major clades of the *P. tauricus* species subgroup, as well as among the *P. t. ionicus* subclades. Finally, the sister taxon relationship between *P. cretensis* and *P. lewendis* is not supported.

### 3.3. Species delimitation

According to the estimated phylogenies, nine major clades and subclades are present within the *P. tauricus* species subgroup. In the BP&P analyses all nine of them were estimated as distinct species with the posterior probabilities ranging from 0.91 to 1.00, accounting all three prior combination schemes that supported the above solution of nine species with moderate, absolute, and good statistical support, respectively (Table 5). The rest of the solutions of either six, seven or eight species were estimated to have low statistical support. The analysis through STACEY produced high ESS values (>290) with InL = -5832.81, resulted also in nine different species with almost absolute statistical support (p.p. = ~1.00). It is worth noticing that these nine clades/subclades were also estimated as different species within the *P. tauricus* species subgroup based on the single locus (here mtDNA) species delimitation analysis of PTP. In addition, PTP proposed to consider as different species the three *P. melisellensis* subclades, as well as the lineage from Kalamata within the subclade e of *P. t. ionicus*. In sum-

**Table 4**

Genetic distances of the Pod55 and Pod15b (within brackets) genes (below diagonal-left) and the MC1R gene (above diagonal-right) among the major clades. Values in diagonal (italics) are within lineages sequence divergence for the three loci (Pod55/Pod15b/MC1R), whereas dashes indicate the absence of the taxon from the gene sampling, and n.a. indicate inability to compute inter-lineage divergence due to unitary representative of the clade.

Clade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1. <i>P. tauricus tauricus</i> & <i>Podarcis tauricus thasopulae</i>	<i>0.0/</i> <i>0.3/</i> <i>0.3</i>	0.3	0.5	0.3	0.5	0.9	0.8	0.8	0.2	0.8	0.5	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.9	2.0	
2. <i>P. tauricus ionicus</i>	0.3 (0.6)	<i>0.1/</i> <i>0.2/</i> <i>0.3</i>	0.6	0.2	0.4	0.9	0.8	0.6	0.2	0.8	0.5	0.8	0.7	0.7	0.6	0.6	0.8	2.0	
3. <i>P. galgene</i>	0.9 (0.9)	0.7 (0.9)	<i>0.0/</i> <i>0.0/</i> <i>0.0</i>	0.5	0.7	1.1	1.0	1.0	0.4	1.0	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	2.0	
4. <i>P. millensis</i>	0.4 (0.7)	0.3 (0.7)	0.9 (1.0)	<i>0.0/</i> <i>0.0/</i> <i>0.1</i>	0.3	0.7	0.7	0.7	0.1	0.7	0.4	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	1.9	
5. <i>P. mollisellensis</i>	0.9 (1.3)	0.8 (1.1)	1.4 (1.1)	0.8 (1.4)	<i>0.2/</i> <i>1.1/</i> <i>0.2</i>	0.9	0.8	0.8	0.2	0.7	0.5	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	1.8	
6. <i>P. cretensis</i>	1.0 (3.1)	1.3 (3.0)	1.9 (2.9)	1.2 (3.1)	1.1 (3.3)	<i>0.0/</i> <i>0.0/</i> <i>0.2</i>	0.4	1.0	0.7	1.3	0.9	1.0	1.3	1.3	1.3	1.2	1.4	2.6	
7. <i>P. levandis</i>	1.1 (2.8)	1.4 (2.7)	2.0 (2.7)	1.3 (2.9)	1.2 (3.1)	0.1 (0.8)	<i>0.0/</i> <i>0.0/</i> <i>0.0</i>	0.9	0.6	1.2	0.7	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	2.4	
8. <i>P. peloponnesiacus</i>	1.7 (3.1)	1.9 (2.8)	2.6 (3.0)	1.9 (3.1)	1.8 (3.2)	0.7 (1.0)	0.8 (0.9)	<i>0.0/</i> <i>0.4/</i> <i>0.0</i>	0.6	1.2	0.9	1.1	1.2	1.2	0.9	0.8	1.3	2.4	
9. <i>P. erhardii</i>	1.2 (4.1)	1.5 (3.9)	2.0 (3.8)	1.3 (4.0)	1.3 (4.2)	0.2 (2.0)	0.4 (1.9)	0.9 (2.1)	<i>0.4/</i> <i>2.2/</i> <i>0.0</i>	0.6	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	1.8	
10. <i>P. pityusensis</i>	1.7 (3.5)	1.8 (3.3)	2.5 (2.8)	1.8 (3.5)	1.7 (3.4)	0.7 (2.9)	0.8 (2.7)	1.4 (3.0)	0.9 (3.7)	<i>0.0/</i> <i>0.0/</i> <i>0.0</i>	0.3	0.5	0.9	1.2	0.9	0.9	1.0	2.2	
11. <i>P. lilfordi</i>	1.6 (3.3)	1.8 (3.2)	2.5 (2.7)	1.8 (3.3)	1.7 (3.2)	0.6 (2.5)	0.7 (2.4)	1.3 (2.6)	0.8 (3.5)	0.0 (0.4)	<i>0.0/</i> <i>0.0/</i> <i>0.0</i>	0.2	0.6	0.9	0.6	0.5	0.6	2.0	
12. <i>P. tiliguerta</i>	1.8 (3.8)	2.2 (3.7)	2.5 (3.2)	1.8 (3.5)	1.6 (3.7)	0.8 (2.9)	0.9 (2.6)	1.5 (2.8)	1.0 (3.9)	1.0 (1.4)	0.9 (1.0)	<i>0.7/</i> <i>1.1/</i> <i>0.3</i>	0.9	1.2	0.8	0.8	0.9	2.34	
13. <i>P. siculus</i>	2.1 (3.3)	2.3 (2.7)	3.1 (3.0)	2.4 (3.2)	1.8 (2.8)	1.2 (2.7)	1.3 (2.5)	1.9 (2.6)	1.6 (3.5)	1.9 (2.4)	1.8 (2.2)	2.5 (2.4)	n.a/ n.a/ n.a	0.4	0.8	0.9	0.5	2.	
14. <i>P. wagnerianus</i>	1.0 (3.1)	1.3 (2.5)	1.9 (2.9)	1.2 (3.1)	1.6 (2.6)	0.5 (2.3)	0.6 (1.9)	1.2 (2.2)	0.7 (3.3)	1.2 (2.0)	1.1 (1.8)	1.3 (2.2)	1.2 (0.4)	n.a/ n.a/ n.a	1.0	0.9	0.7	2.4	
15. <i>P. muralis</i>	2.0 (3.0)	1.8 (2.9)	2.5 (2.8)	1.8 (3.2)	2.1 (3.0)	1.5 (2.3)	1.7 (2.2)	2.3 (2.5)	1.9 (3.4)	2.2 (2.3)	2.2 (1.9)	2.7 (1.9)	2.2 (2.0)	1.6 (1.6)	<i>0.1/</i> <i>0.3/</i> <i>0.2</i>	0.5	0.7	2.2	
16. <i>P. bocagei</i>	2.1 (3.4)	2.45 (3.1)	3.0 (2.9)	2.3 (3.4)	2.6 (3.0)	1.5 (2.7)	1.6 (2.1)	2.1 (2.5)	1.9 (3.7)	2.3 (2.2)	2.1 (1.8)	2.5 (2.0)	2.3 (2.0)	1.5 (1.1)	1.9 (1.1)	<i>0.0/</i> <i>0.4/</i> <i>0.0</i>	0.9	2.3	
17. <i>P. filfolensis</i>	0.7 (2.8)	0.6 (2.7)	1.2 (2.6)	0.5 (2.7)	0.4 (3.0)	0.7 (2.0)	0.8 (1.6)	1.4 (1.8)	1.0 (3.1)	1.3 (2.1)	1.3 (1.7)	1.3 (2.2)	1.9 (2.1)	1.2 (1.7)	1.8 (1.6)	2.3 (1.8)	<i>0.0/</i> <i>0.0/</i> <i>0.6</i>	2.4	
18. <i>Incerta agilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-/ n.a.

mary PTP estimated 12 distinct species within the *P. tauricus* species subgroup.

#### 4. Discussion

This study provides a recapitulating phylogenetic reconstruction and assessment of the inter- and intra-specific relationships and diversity of the *P. tauricus* species subgroup. The data presented here feature complete taxon sampling, with representatives of all presently recognized species and most subspecies in the species subgroup. Specimens throughout the species' distribution ranges were incorporated and several phylogenetic and coalescent based methods were applied to generate gene trees, species trees and determine species delimitation. Among other things, our findings revealed several taxonomic discrepancies.

##### 4.1. Phylogenetic relationships within the Balkan Wall lizards

Phylogenetic relationships between species groups in the genus remain largely unresolved. Failure to reconstruct them among the major clades of *Podarcis* could be due to rapid diversification early on in the evolutionary history of the genus, producing short but ancient branches with a low phylogenetic signal (Oliverio et al., 2000). This has already been cited as giving rise to the difficulty in resolving phylogenetic relationships in the Lacertidae family (Pavlicev and Mayer, 2009).

Two monophyletic species subgroups were revealed for the Balkan species group (*P. tauricus* and *P. erhardii*), in line with previous studies. However, although the *P. tauricus* subgroup appears to be more closely related to *P. erhardii*, this is not statistically supported by either a concatenated (Fig. 2) or a coales-

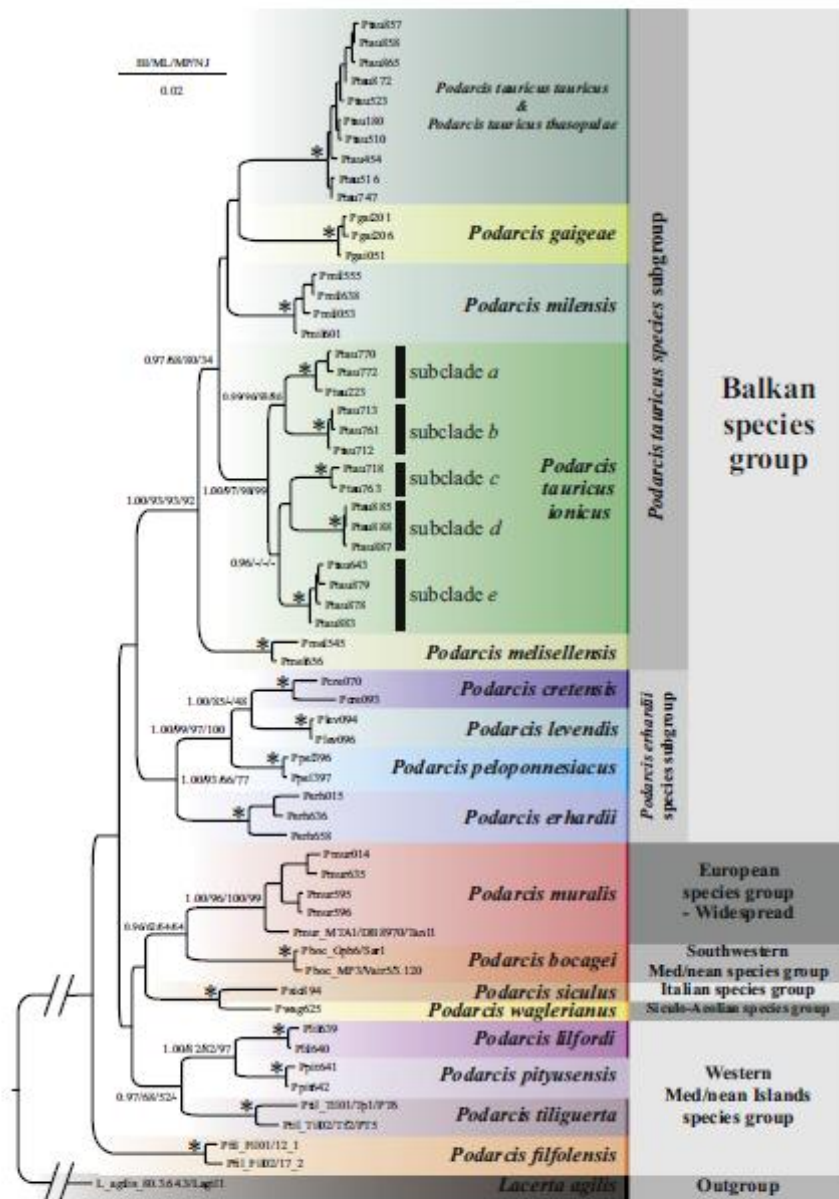


Fig. 2. Bayesian Inference tree based on the concatenated (mtDNA & nDNA) dataset focusing on the *P. tauricus* species subgroup. The posterior probabilities (>0.95) and bootstrap support (>50%) of all the phylogenetic methods used are given near the branches. No values, mean low statistical support and dashes mean different topology or polytomy. Asterisks indicate absolute support by all methods (BI/ML/MP/NJ).

cent approach (Fig. 3). This indicates that more markers should be implemented to evaluate their phylogenetic affinity. Within the *P. erhardii* species subgroup, phylogenetic relationships are fully resolved with high statistical support in the concatenated tree (Fig. 2), indicating *P. erhardii* as the root taxon of the spe-

cies subgroup. Moreover, *P. cretensis* and *P. lewendis* are sister taxa and both closely related to *P. peloponnesiacus*, resolving the phylogenetic relationships of these species, though the latter relationship is not well-supported in the species tree (Figs. 3 and 4).

14

N. Pavnis et al / Molecular Phylogenetics and Evolution 106 (2017) 6–17

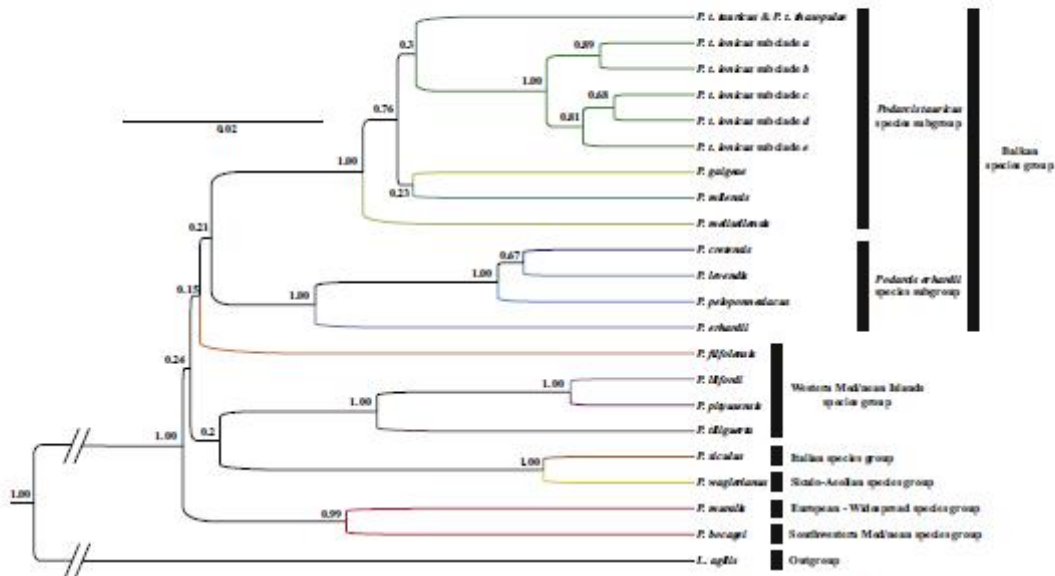


Fig. 3. The consensus multilocus coalescent species tree of the *P. tauricus* species subgroup and its conspecifics. The posterior probabilities are given near the branches.

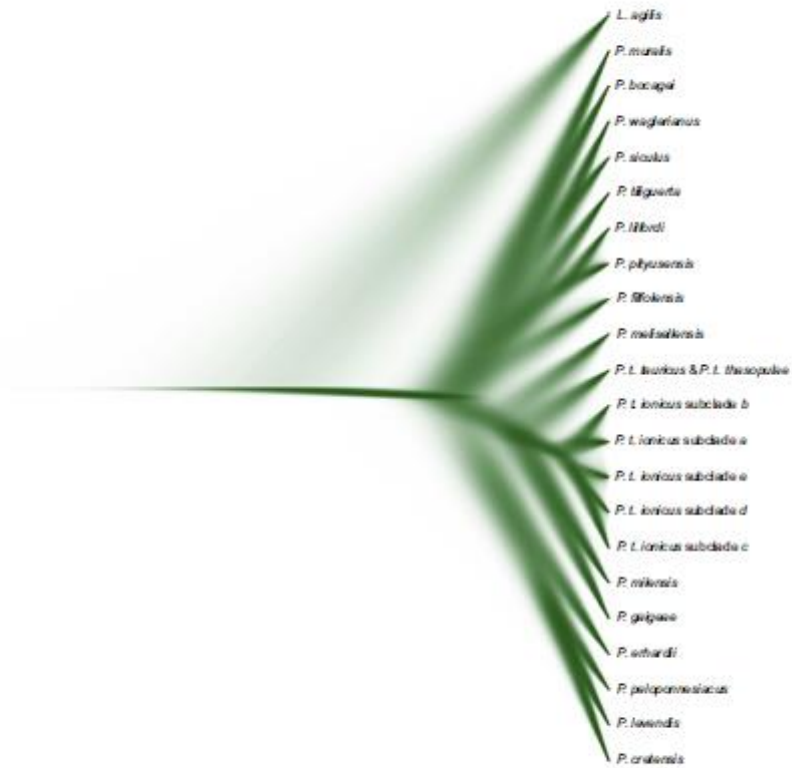


Fig. 4. Set of all trees (shown as a star tree) generated by the multilocus coalescent species tree analysis of the *P. tauricus* species subgroup and its conspecifics.

Table 5

Species delimitation results for the *P. tauricus* species subgroup based on BPP software assuming nine species and using different prior schemes. The posterior probabilities are average values of two independent mcmc runs using different seed numbers.

Prior scheme	$\theta \sim G(1, 10) - \tau^0 \sim G(1, 10)$		$\theta \sim G(2, 2000) - \tau^0 \sim G(2, 2000)$		$\theta \sim G(1, 10) - \tau^0 \sim G(2, 2000)$	
	Posterior probability	Prior probability	Posterior probability	Prior probability	Posterior probability	Prior probability
6	–	–	–	–	<0.01	0.18
7	0.01	0.18	–	–	<0.01	0.18
8	0.11	0.13	<0.01	0.13	~0.10	0.13
9	0.88	0.06	~1.00	0.06	~0.90	0.06
Candidate species	Posterior probability					
<i>P. melisensis</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>P. t. tauricus</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>P. gaigeae</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>P. melisellensis</i>	1.00		1.00		1.00	
<i>P. t. ionicus</i> Subclade a	0.99		1.00		0.99	
<i>P. t. ionicus</i> Subclade b	0.93		1.00		0.96	
<i>P. t. ionicus</i> Subclade c	0.97		1.00		0.98	
<i>P. t. ionicus</i> Subclade d	0.95		1.00		0.94	
<i>P. t. ionicus</i> Subclade e	0.91		1.00		0.91	
<i>P. t. ionicus</i> Subclades b & e	0.05		–		0.05	
<i>P. t. ionicus</i> Subclades d & e	0.03		–		0.02	
<i>P. t. ionicus</i> Subclades a & d	–		–		0.01	

4.2. Phylogenetics relationships within the *Podarcis tauricus* species subgroup

Though largely unresolved, phylogenetic relationships among the current morphological taxa (Figs. 2 and 3) within the *P. tauricus* species subgroup were unexpected. No support was found for the previously published topology (Poulakakis et al., 2005a, b), which indicated a sister-taxon relationship between *P. melisensis* and *P. gaigeae*, with *P. tauricus* as the root taxon of the species subgroup. Instead, the *P. tauricus* species subgroup is subdivided into five major clades, with *P. melisellensis* as the root taxon of the subgroup. Three of the clades correspond to three of the four morphological species in the species subgroup (*P. melisellensis*, *P. melisensis*, and *P. gaigeae*). The other two clades include specimens of *P. tauricus*, without evidence that they are clustered together in a monophyletic group. The first of those clades corresponds to the subspecies *P. t. ionicus*, whereas the second consists of the other two subspecies (*P. t. tauricus* and *P. t. thasopulae*), which appear to be phylogenetically indistinguishable (Suppl. Fig. 2). Therefore, the taxonomy of *P. tauricus* at the species and subspecies level is not valid (see below). Genetic distance between the above two clades is comparable to the species level distances in *Podarcis* (Tables 2 and 4), as well as in other Lacertidae [e.g. *Lacerta* (Sagonas et al., 2014) and *Phoenicolacerta* (Tamar et al., 2015)].

It is worth noting here that *P. tauricus* has been considered a species complex with high genetic diversification (Poulakakis et al., 2005a), especially due to the high genetic divergence found within *P. t. ionicus* (Figs. 2–4, Tables 3 and 5). Five geographically distinct subclades were recovered within *P. t. ionicus*. Based on the mtDNA tree, their phylogenetic relationships were partly resolved. The subclades from the southern Ionian Islands (subclade a) and western central Greece (subclade b) have a sister-subclade relationship, whereas the other three subclades are clustered together, with the subclade from Albania, northwestern Greece and the western Peloponnisos (subclade e) being the most basal, and the subclades from the northeastern (subclade c) and south-central Peloponnisos (subclade d) forming a sister group. The genetic distances between them (Table 3) are relatively high (e.g. for the *cyt b* fragment they range from 5.4% to 9.2%), reaching and in some cases exceeding those among the morphologically recognized species of *P. levendis*, *P. cretensis*, and *P. peloponnesiacus*.

4.3. How many species? A proposed taxonomy of the *Podarcis tauricus* species subgroup in the light of multilocus phylogeny and species delimitation

In concordance with gene tree estimations, Bayesian species delimitation approaches clearly support a scheme of nine species within the *P. tauricus* species subgroup. PTP analysis estimated 12 distinct species within the *P. tauricus* species subgroup. Nevertheless, these results should be treated with caution, as PTP may overestimate the number of species in cases of uneven sampling between putative species (Zhang et al., 2013), as e.g. with *P. melisellensis*.

Based on the aforementioned results and the fact that the two clades of *P. tauricus* are morphologically, geographically, and phylogenetically distinct, the taxonomic status of *P. tauricus* should be revised by splitting the species into two separate taxa. The first taxon, *Podarcis tauricus* (Pallas, 1814) with type locality in northern Crimea, includes the populations currently assigned to the subspecies *P. t. tauricus* and *P. t. thasopulae*, together being synonymized under monotypic *Podarcis tauricus* without further subspecific division. The second taxon corresponds either to a distinct evolutionary species (de Queiroz, 2005), *Podarcis ionicus* (Lehrs, 1902), with type locality in the island of Kerkyra (Corfu Isl), displaying high levels of intraspecific genetic diversity (five Deep Conspecific Lineages; DCL, Table 3), or to a species complex comprising of up to five Unconfirmed Candidate Species (UCS) (Padiál et al., 2010). For the time being and until extensive genetic, morphological and ecophysiological examination is carried out, we propose referring to this second taxon as the *P. ionicus* species complex. According to Padiál et al. (2010), the provisional names for *P. ionicus* phylogenetic subclades a to e should be: (a) *Podarcis ionicus* [Ca1 Poulakakis et al., 2005a], (b) *Podarcis ionicus* [Ca2 Psonis et al., 2016], (c) *Podarcis ionicus* [Ca3 Psonis et al., 2016], (d) *Podarcis ionicus* [Ca4 Poulakakis et al., 2005a], and (e) *Podarcis ionicus* [Ca5 Lehrs, 1902]. The Greek island endemics *P. melisensis* and *P. gaigeae* did not display any phylogenetic structure and geographic pattern. Intra-specific phylogeny of the specimens inhabiting different islands and islets was in both cases bush-like, indicating either a recent colonization/fragmentation history or high gene flow among them. Given that *P. g. weigandi* and *P. g. gaigeae* could not be distinguished from each other, the subspecific taxonomy of *P. gaigeae* should be revised by synonymizing the current subspecies under monotypic *P. gaigeae* with no further subspecific

division, a proposal that has already been highlighted by Poulakakis et al. (2005b). For *P. milensis*, more samples from the rest of its subspecies (*P. m. adolfjordansi* and *P. m. gerakinae*) should be included in future analyses if safe conclusions are to be reached. Finally, *P. melisellensis* is represented by three lineages that have already been recognized at the subspecies level: *P. m. melisellensis*, *P. m. fiumana*, and a third undescribed lineage corresponding to the *Lastovo* subclade.

## 5. Conclusions

According to the present study, the *P. tauricus* species subgroup is a monophyletic unit that includes five major clades, with unresolved intra-clades phylogenetic relationships and *P. melisellensis* as the root taxon. Monophyly of *P. tauricus* sensu stricto is not supported, with *P. t. ionicus* displaying high levels of hidden genetic diversity, comprising five subclades with partially resolved phylogenetic relationships. Genetic diversification within *P. t. tauricus*, *P. g. gaigeae*, and *P. milensis* was found to be low, whereas the taxonomic validity of the subspecies *P. t. tauricus* – *P. t. thasopulae* and *P. g. gaigeae* – *P. g. weigandi* is unfounded; they should be regarded as synonyms. Finally, species delimitation approaches clearly support the existence of nine distinct species within the *P. tauricus* species subgroup. The main focus of further research should be on the *P. ionicus* species complex as defined above, comprising five Unconfirmed Candidate Species. This will necessitate detailed population-genetic analysis of nuclear markers in contact zones, as well as of the morphology and ecology typifying these UCS. Finally, though not the focus of the present study, it is clear that despite having used three nuDNA and two mtDNA loci, phylogenetic relationships among the species of the entire genus remain largely unresolved. To gain a fuller understanding, future investigations should consider selecting numerous and more appropriate molecular markers.

## Acknowledgements

We wish to express our gratitude, in alphabetical order, to Roman Alekseev (Nikolaev, Ukraine), Miguel A. Carretero (Research Centre in Biodiversity and Genetic Resources, Universidade do Porto, Vila do Conde, Portugal), Igor Doromin (Institute of Zoology, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia), Arkadyi Dovzhenko (Khersonsky State Agrarian University, Kherson, Ukraine), Daniel Grula and Ivan Stolarik (both from Comenius University in Bratislava, Department of Zoology, Slovakia), Václav Gvozdík (Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic and National Museum of Prague), Tomáš Husák, Daniel Koleska (both from Czech University of Life Sciences Prague, Department of Zoology and Fisheries, Czech Republic), Emmanouela Karameta, Panayiotis Pafilis, Konstantinos Sagonas (all three from National and Kapodistrian University of Athens, Department of Zoology – Marine Biology, Athens, Greece), Spartak Litvinchuk (Institute of Cytology, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia), Andrey Matvyeyev (Danube Biosphere Reserve, Ukrainian Academy of Science, Vilko, Ukraine), Edivárd Mizsei (Aggtelek National Park Directorate, Hungary), Anton Nadolnyi (Crimean Republic anti-Plague Station, Simferopol, Republic of Crimea), Leonid Sokolov (National Nature Park “Tuzlovskiy Limany”, Tatarbunary, Ukraine), Ilias Strachinis (Aristotle University of Thessaloniki, School of Biology, Thessaloniki, Greece), Manos Stratakis (University of Crete, Department of Biology, Iraklio, Greece), Georgi Popgeorgiev, Nikolay Tzankov (both from National Museum of Natural History Sofia, Bulgaria), Helen Sviridenko (Institute of Zoology, Ukrainian Academy of Science, Kyiv, Ukraine), Vladimir Tsurcanu (Institute of Zoology, Academy

of Sciences of the Republic of Moldova, Cishinau), and Judit Vörös (Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary) for sending us several tissue samples or for their help in the field, as well as to Manolis Nikolakakis (University of Crete, Natural History Museum of Crete, Irakleio, Greece) for helping in drawing the distribution map, to Apostolos Trichas (University of Crete, Natural History Museum of Crete, Irakleio, Greece) for the lizard's photograph, and, finally, to Municipal Port Fund of Keramoti and the fishing boat “Parmenides” for helping us traveling to Thasopoula islet (North Aegean).

We wish also to thank the editor and two anonymous reviewers for providing us with comments that significantly improved an earlier version of the manuscript.

This study was funded by NSRF 2007-2013 programme for development, European Social Fund, Operational Programme, Education and Lifelong Learning investing in knowledge society, Ministry of Education and Religious Affairs, Managing Authority, Co-financed by Greece and the European Union.

DJ was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0147-15, Comenius University grants UK/20/2014, UK/37/2015 and by the Societas Europea Herpetologica's SEH Grant in Herpetology 2015 – Mapping and Distributions.

JCI was supported by Grants no. 173025 and no. 1613051 funded by Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia; samples were collected by permits No. 353-01-505/2012-03 issued by Ministry of Environment, Mining and Spatial Planning of Republic of Serbia and No. 353-01-54/2013-08, Ministry of Energetics, Development and Nature Protection of Republic of Serbia.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jympev.2016.09.007>.

## References

- Amold, E.N., 1973. Relationships of the Palearctic lizards assigned to the genera *Lacerta*, *Agrotoides* and *Psammotrogon* (Reptilia: Lacertidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 25, 291–366.
- Amold, E.N., Burton, J.A., Oudenden, D., 1978. Field Guide to the Reptiles and Amphibians of Britain and Europe. Collins, London.
- Amold, E.N., Oudenden, D., 2002. A Field Guide to the Reptiles and Amphibians of Britain and Europe. HarperCollins Publishers, London.
- Bouckaert, R.R., 2010. DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 26, 1372–1373.
- Bouckaert, R.R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T.J., Wu, C., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J., 2014. BEAST 2: A Software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003537.
- de Queiroz, K., 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6600–6607.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies – an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Harris, J.D., Amold, N.E., 1999. Relationships of wall lizards, *Podarcis* (Reptilia: Lacertidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Copeia*, 749–754.
- Jones, G., Aydin, Z., Oxeelman, B., 2015. DISSECT: an assignment-free Bayesian discovery method for species delimitation under the multispecies coalescent. *Bioinformatics* 31, 991–998.
- Jones, G.R., 2015. Species Delimitation and Phylogeny Estimation Under the Multispecies Coalescent. *bioRxiv*.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villalbanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196–6200.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29 (6), 1695–1701.

- Leaché, A.D., Fujita, M.K., 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 277, 3071–3077.
- Olivero, M., Bologna, M.A., Mariottini, P., 2000. Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* Wagler, 1830 and *Tetra* Gray, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *J. Biogeogr.* 27, 1403–1420.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M., 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* 7, 1–14.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 205–248.
- Pavlicev, M., Mayer, W., 2009. Fast radiation of the subfamily Lacertinae (Reptilia: Lacertidae): history or methodical artefact? *Mol. Phylog. Evol.* 52, 727–734.
- Pereira, C., Couto, A., Iulis, C., Costa, D., Mourão, S., Pinho, C., 2013. Twenty-one new sequence markers for population genetics, species delimitation and phylogenetics in wall lizards (*Podarcis* spp.). *BMC Res. Notes* 6, 299.
- Pinho, C., Rocha, S., Carvalho, B.M., Lopes, S., Mourão, S., Vallinoto, M., Brunes, T.D., Haddad, C.F.B., Gonçalves, H., Sequeira, F., Ferrand, N., 2010. New primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. *Conserv. Genet. Resour.* 2, 181–185.
- Podnar, M., Madarić, B.B., Mayer, W., 2014. Non concordant phylogeographical patterns of three widely distributed endemic Western Balkans lacertid lizards (Reptilia, Lacertidae) shaped by specific habitat requirements and different responses to Pleistocene climatic oscillations. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 52, 119–129.
- Podnar, M., Mayer, W., Tvrkovič, N., 2004. Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, (Lacertidae). *Org. Divers. Evol.* 4, 307–317.
- Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Pafilis, P., Zouras, E., Mylonas, M., 2005a. Phylogeography of Balkan wall lizard (*Podarcis tauricus*) and its relatives inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Ecol.* 14, 2433–2443.
- Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Zouras, E., Mylonas, M., 2005b. Phylogenetic relationships and biogeography of *Podarcis* species from the Balkan Peninsula by bayesian and maximum likelihood analyses of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylog. Evol.* 37, 845–857.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2014. Tracer v1.6 Available from <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, W., Drummond, A.J., 2013. MCMC Trace Analysis Tool. Version v1.6.0, 2003–2013.
- Rannala, B., Yang, Z., 2013. Improved reversible jump algorithms for Bayesian species delimitation. *Genetics* 194, 245–253.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Sagonas, K., Poulakakis, N., Lymberakis, P., Pamakelis, A., Pafilis, P., Valakos, E.D., 2014. Molecular systematics and historical biogeography of the green lizards (*Lacerta*) in Greece: insights from mitochondrial and nuclear DNA. *Mol. Phylog. Evol.* 76C, 144–154.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Schwarz, G., 1978. Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* 6, 461–464.
- Sindaco, R., Jermolenko, V.K., 2008. *The Reptiles of the Western Palearctic*. Edizioni Belvedere, Latina (Italy).
- Sindaco, R., Venchi, A., Grieco, C., 2013. *The Reptiles of the Western Palearctic, Volume 2 Annotated Checklist and Distributional Atlas of the Snakes of Europe, North Africa, Middle East and Central Asia, with an Update to Volume 1*. Edizioni Belvedere.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313.
- Swofford, D.L., 2002. *PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic inference. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 407–514.
- Tamar, K., Carranza, S., in den Bosch, H., Sindaco, R., Moravec, J., Meiri, S., 2015. Hidden relationships and genetic diversity: Molecular phylogeny and phylogeography of the Levantine lizards of the genus *Phoenicolacerta* (Squamata: Lacertidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 91, 8697.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Uetz, P., Holerik, J., 2016. *The Reptile Database* <<http://www.reptile-database.org/>> (accessed January 17, 2016).
- Yang, Z., 2006. *Computational Molecular Evolution*. Oxford University Press.
- Yang, Z., 2015. The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Curr. Zool.* 61, 854–865.
- Yang, Z., Rannala, B., 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 9264–9269.
- Yang, Z., Rannala, B., 2014. Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Mol. Biol. Evol.* 31, 3125–3135.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A., 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29, 2869–2876.



## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ

### Orcid ORcode



### 1. Προσωπικές πληροφορίες

Όνοματεπώνυμο: Νικόλαος Ψόνης

E-mail: [nikos.psonis@gmail.com](mailto:nikos.psonis@gmail.com)

### 2. Εκπαίδευση

2017: **Διδακτορικός Τίτλος**, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων.

2012: **Μεταπτυχιακός Τίτλος Ειδικευσης**, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων.

2010: **Πτυχίο Βιολογίας**, Τμήμα Βιολογίας Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση Βιολογικών Πόρων.

### 3. Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

a. **Psonis N.**, Vardinoyannis K., Mylonas M. & Poulakakis N. (2015) *Evaluation of taxonomy of Helix cincta (Muller, 1774) and Helix nucula (Mousson, 1854); insights using mitochondrial DNA sequence data*. Journal of Natural History 49:5-8, 383-392.

b. **Psonis N.**, Vardinoyannis K., Mylonas M. & Poulakakis N. (2015) *Unraveling the evolutionary history of the genus Chilostoma Fitzinger, 1833 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) in Greece*. Molecular Phylogenetics and Evolution 91, 210-225.

c. **Psonis N.**, Lymberakis P., Poursanidis D. and Poulakakis N. (2016) *Contribution to the study of Acanthodactylus (Sauria: Lacertidae) mtDNA diversity focusing on the A. boskianus species group*. Mitochondrion 30, 78-94.

d. Hedman H.D., Kapsalas G., Karameta E., **Psonis N.**, Poulakakis N., Foufopoulos J. and Pafilis P. (2016) *First record of Podarcis peloponnesiacus (Bibron & Bory, 1833) from outside the Peloponnese*. Herpetozoa 29 (3/4).

e. **Psonis N.**, Antoniou A., Kukushkin V.O., Jablonski D., Petrov B., Crnobrnja – Isailović J., Gherghel I., Sotiropoulos K., Lymberakis P. & Poulakakis N. (2017) *Hidden diversity in the Podarcis tauricus (Sauria, Lacertidae) species subgroup in the light of multilocus phylogeny and species delimitation*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 106, 6-17.

### Υπό συγγραφή

f. **Psonis N.**, Rigal F., Parmakelis A., Vardinoyannis K., Mylonas M., Triantis K. & Poulakakis N. *Scaling of Taxonomic, Phylogenetic and Functional Diversity with Area: land snails in the Aegean Sea*.

g. **Psonis N.**, Antoniou A., Karameta E., Kotsakiozi P., Darriba D., Kozlov A., Stamatakis A., Poursanidis D., Kukushkin V.O., Jablonski D., Crnobrnja – Isailović J., Gherghel I., Lymberakis P. & Poulakakis N. *Genomic phylogeography and species distribution modelling of the Podarcis tauricus (Sauria: Lacertidae) species subgroup*.