

Διδακτορική διατριβή
Αντωνίου Αγλαΐα

Διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας του
Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus* Pallas, 1778)
στη Βαλκανική



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας
Ηράκλειο 2008

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΑΓΛΑΪΑ

ΘΕΜΑ

Διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας του
Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus* Pallas, 1778)
στη Βαλκανική

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
2008

PhD THESIS

Antoniou Aglaia

**Unraveling the evolutionary history of European hare
(*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in Balkans**

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
2008**

*στους γονείς μου
Λεωνίδα και Μάτα*

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ι. Παπαματθαϊάκης (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ι. Παπαματθαϊάκης (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ε. Ζούρος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Α. Μαγουλάς (Ερευνητής Α' ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Εξεταστική Επιτροπή:

Ι. Παπαματθαϊάκης (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ε. Ζούρος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Α. Μαγουλάς (Ερευνητής Α' ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Γ. Κωτούλας (Ερευνητής Α' ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Μ. Μυλωνάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

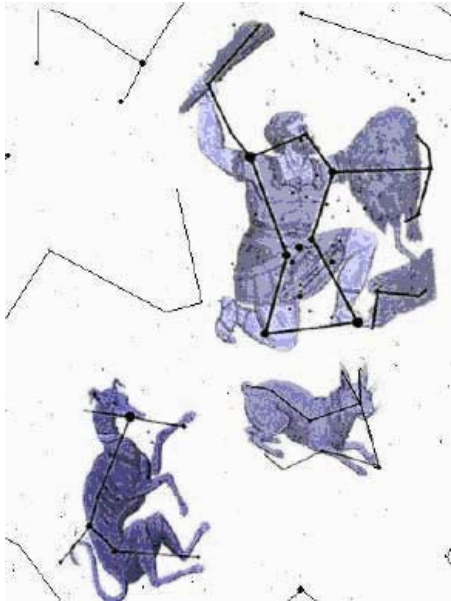
Μ. Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ι. Καρακάσης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Κ. Λύκα (Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

“μεσ’ το κλειστό δωμάτιο υπάρχουν όλα
αν έχεις μάτια να τα δεις
αν έχεις χέρια να τα αγγίξεις
μπορείς να βρεις κλειδί να ξεκλειδώσεις τη σιωπή τους
αρκεί να πας ολάνοιχτος
γυρεύοντάς τα”
Λένα Παππά-Χάρης & Γιάνος Κατσιμίχας

Ο Μύθος του Λαγού και του Ωρίωνα



Αν κάποιος βράδυ του χειμώνα με ξαστεριά κοιτάξει κανείς τον ουρανό, θα δει να δεσπόζει ο αστερισμός του Ωρίωνα, του μεγάλου αυτού κυνηγού για τον οποίο πολλοί μύθοι έχουν ειπωθεί. Κάτω από τα πόδια του Ωρίωνα βρίσκεται ένας μικρός αστερισμός, η παρουσία του οποίου συνήθως περνά απαρατήρητη. Ο αστερισμός αυτός καλείται Lepus, ο λαγός. Φαίνεται λοιπόν πως Ωρίωνας, ως λάτρης του κυνηγιού, αρέσκονταν στο κυνήγι του λαγού. Όταν κατάφερε να τον εντοπίσει άρχισε να τον κυνηγά στέλνοντας ξοπίσω του και τα δύο του σκυλιά, τον Μεγάλο (**Canis Major**) και τον Μικρό (**Canis Minor**). Ο λαγός κυνηγημένος από τον Ωρίωνα έτρεξε πάνω σε έναν λόφο με τα σκυλιά να τον καταδιώκουν. Στο κυνήγι του αυτό, ο Ωρίωνας αντάμωσε τις Πλειάδες, τις οποίες και ερωτεύτηκε με την πρώτη ματιά. Οι Πλειάδες όμως δεν ανταποκρίθηκαν στον έρωτά του και έτσι ένα

άλλο είδος κυνηγιού αρχίνησε. Οι Πλειάδες βρήκαν καταφύγιο στους ώμους του Ταύρου (Δία) με τον οποίο ο Ωρίωνας ήρθε αντιμέτωπος. Σήμερα, ο Ταύρος και ο Ωρίωνας αν και ισορροπούν στον ουρανό, είναι πάντα σε ετοιμότητα για μάχη. Ο λαγός παρατηρώντας όλα αυτά, επέλεξε για καταφύγιό του σημείο ακριβώς κάτω από τα πόδια του κυνηγού. Η απόφασή του αυτή τον καθιστά ασφαλή, αφού ο Ωρίωνας έχει πάντα στραμμένη την προσοχή του στον Ταύρο με τον οποίο ετοιμάζεται να δώσει μάχη, ενώ τα σκυλιά του αναλώνουν όλο τους τον χρόνο ικετεύοντας τον κυνηγό για φαγητό με αποτέλεσμα να μην είναι σε θέση να παρατηρήσουν τον μικρό λαγό που κρύβεται ακριβώς από κάτω (**Copyright © 1997 Kathy A. Miles and Charles F. Peters II**).

Υπάρχουν αρκετές ερμηνείες για τη θέση του λαγού (Lepus) στην ιστορία αυτή. Μια από αυτές είναι ότι αυτά που έχουν αξία συνήθως βρίσκονται σε πολύ προσιτά σημεία, βρίσκονται σχεδόν δίπλα μας, με τους περισσότερους να μην φάχνουν σε μια τόσο προφανή τοποθεσία. Η απλότητα, η αλήθεια και η ομορφιά που κυνηγάμε τόσο πολύ και που δύσκολα βρίσκουμε ίσως να έχει το καταφύγιό της μπροστά στα μάτια μας ενώ εμείς είμαστε πολύ απασχολημένοι για να τη δούμε. Και όμως είναι πολύ ειρωνικό να κυνηγά κανείς κάτι για όλη του τη ζωή και τελικά στο δρόμο να παρασύρεται από όλα αυτά που του συμβαίνουν στην πορεία και να μην μπορεί να δει πια τον σκοπό για τον οποίο ξεκίνησε το κυνήγι του αυτό.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Η έναρξη, η πορεία και η ολοκλήρωσή της δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν χωρίς την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη, την υπομονή και την αγάπη ανθρώπων που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της προσωπικής και ερευνητικής μου ζωής, τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς.

Το εναρκτήριο λάκτισμα της παρούσας μελέτης αποτέλεσε το μεράκι και η έμπνευση του ερευνητή και φίλου Γιώργου Κωτούλα. Γιώργο σε ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη σου, τις ατέλειωτες συζητήσεις μας και για όλες τις στιγμές που περάσαμε μαζί αυτά τα χρόνια ελπίζοντας να έχουμε την ευκαιρία να περάσουμε πολλές ακόμα μαζί. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αρμόζουν στον ερευνητή και διευθυντή του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής Αντώνη Μαγουλά, ο οποίος με καθοδήγησε και με στήριξε σε όλες τις στιγμές της διδακτορικής μου διατριβής ενώ πάντα έσκυβε πάνω μου με ένα αίσθημα ευαισθησίας και κατανόησης. Η συνεργασία μου μαζί τους ήταν περισσότερο ουσιαστική και καθόλου τυπική, έχοντας το ρόλο του δασκάλου με όλη τη σημασία της λέξεως. Σας ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη, την κατανόηση και τη γνώση που μου παρείχαν όλο αυτό τον καιρό.

Για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, είχα την τύχη και την χαρά να έχω ως επιβλέποντα τον καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη, χωρίς τη συμβολή του οποίου δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίησή της. Σας ευχαριστώ θερμά που μου δώσατε την ευκαιρία αυτή.

Η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη συμβολή του καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Ελευθέριου Ζούρο, διακεκριμένο επιστήμονα στον χώρο της πληθυσμιακής γενετικής με τον οποίο είχα την τιμή να συνεργαστώ.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής (τους καθηγητές Μυλωνά Μ., Κεντούρη Μ., τον αναπληρωτή καθηγητή και συντονιστή του Μεταπτυχιακού προγράμματος Καρακάση Ι. και την επίκουρη καθηγήτρια Λύκα, Κ.), που με τις καλοπροαίρετες παρατηρήσεις τους συνέβαλαν στη διόρθωση και βελτίωση του παρόντος κειμένου. Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στην κ. Χαρά Ζαφειροπούλου-Σφακιανάκη και την Ελευθερία Λαρεντζάκη που αποτελούν την ψυχή της γραμματειακής υποστήριξης του τμήματος Βιολογίας, καθώς και την κ. Βάνα Μακράκη, η οποία αν και δεν αποτελεί πλέον επίσημο μέλος, η συμβολή της οποίας υπήρξε πολύ σημαντική. Η συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια υπήρξε άψογη και πολλές φορές η καλή τους θέληση μετέτρεπε το ανέφικτο σε εφικτό. Σημαντικό ρόλο διαδραμάτισαν και τα μέλη της βιβλιοθήκης του Πανεπιστημίου Κρήτης αφού χάρη στη βοήθεια και στην άψογη συνεργασία τους επιτεύχθηκε η αναζήτηση

πολλών και σημαντικών επιστημονικών άρθρων, που με βοήθησαν στην κατανόηση και την ερμηνεία των δικών μου αποτελεσμάτων και γι' αυτό τους ευχαριστώ.

Πρόκειται για μία μελέτη που θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς την βοήθεια των Κυνηγετικών Συλλόγων, καθώς και κυνηγών ολόκληρης της Ελλάδας που συνέλλεξαν δείγματα όλα αυτά τα χρόνια δείχνοντας εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου. Ελπίζω μέσω της μελέτης αυτής να έγινε αντιληπτή η σημαντικότητα της μεταξύ μας συνεργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον πρώην πρόεδρο του 1^{ου} Κυνηγετικού Συλλόγου Ηρακλείου κ. Μανώλη Φραγκιαδουλάκη για την άψογη συνεργασία μας και την βοήθεια που πρόσφερε απλόχερα, όχι μόνο στη συλλογή δειγμάτων, αλλά και στη συλλογή πολύτιμων πληροφοριών για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Η παρούσα διατριβή δεν θα απέβαινε ενδιαφέρουσα στον ίδιο βαθμό χωρίς τα δείγματα λαγών από περιοχές της βορειοανατολικής Ελλάδας τα οποία συλλέχθηκαν με τη βοήθεια και την επιμονή του δασολόγου Πέτρου Πλατή της Στ' Κυνηγετικής Ομοσπονδίας Μακεδονίας-Θράκης επί σειρά ετών. Πέτρο, ο κόσμος της επιστήμης της βιολογίας θα κέρδιζε πολλά αν ο κάθε ερευνητής είχε στη διάθεσή του τόσο αφοσιωμένα άτομα όσο εσύ. Θερμά ευχαριστώ το Τμήμα Θήρας του Υπουργείου Εσωτερικών της Κύπρου για τα πολυάριθμα δείγματα που παρείχαν χωρίς ενδοιασμό.

Η παρούσα μελέτη θα ήταν ελλιπής χωρίς τη βοήθεια των φίλων και κυνηγών Μανώλη Παπαδημητράκη και Μανώλη Κοσκινά, η αγάπη των οποίων για το κυνήγι τους ώθησε να αφιερώνουν πολύ από το χρόνο τους στο κυνήγι της γνώσης για το λαγό. Η προθυμία και το ενδιαφέρον όλων των κυνηγών που βοήθησαν στη συλλογή των δειγμάτων, τα ονόματα των οποίων είναι πολλά για να αναφερθούν στα πλαίσια του προλόγου αυτού, αποτέλεσαν κρίσιμο σημείο για την πορεία της μελέτης αυτής και τους ευχαριστώ θερμά.

Η διεκπεραίωση της μελέτης αυτής περιβλήθηκε από το φιλικό και ευχάριστο κλίμα που δημιουργούν τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής και Μοριακής Βιοτεχνολογίας. Στέλιο, Κατερίνα, Βάσω, Τερέζα, Κατερίνα, Σπύρο, Βικτωρία, Εμμανουέλλα, Jon, Jaque και Παναγιώτη σας ευχαριστώ για την ανοχή και την αντοχή σας και για την όμορφη και ζεστή ατμόσφαιρα του εργαστηρίου που με έκανε να αισθανθώ πολύ όμορφα από την πρώτη κιόλας στιγμή που αποτέλεσα μέλος του. Ιδιαίτερη μνεία αρμόζει στην ψυχή του εργαστηρίου, στην Μαρία Καμπακλή. Μαράκι μου σε ευχαριστώ για την άψογη οργάνωσή σου, την πολύτιμη βοήθειά σου και ιδιαίτερα για το υπέροχο χαμόγελό σου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους ερευνητές του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε Δρ. Τσιγγενόπουλο Κώστα και Δρ. Έλενα Σαροπούλου για την συνεργασία μας και την βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τους ζητήθηκε. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στους Stuart Baird (CBGP), Paulo Celio Alves, Nuno Ferrand (CIBIO) και Frank Suchentrunk (Res.I.W.E) για την πολύτιμη βοήθεια τους σε διάφορα θέματα που αφορούσαν στο

θεωρητικό υπόβαθρο της πληθυσμιακής γενετικής, την οικολογία και συμπεριφορά του ζώου που μελέτησα και την παροχή δειγμάτων.

Για το επίπονο όμως έργο μιας διδακτορικής διατριβής απαραίτητη κρίνεται όχι μόνο η ηρεμία αλλά και η ευφορία της ψυχής και του μυαλού, που για αυτήν ευθύνονται οι καλοί φίλοι και συνάδελφοι Κωνσταντίνος Μυλωνάς, Κώστας Τριάντης, Άρης Παρμακέλης, Λευτέρης Πινάκης, Πέτρος Λυμπεράκης, Μανώλης Νικολουδάκης, Μαριάννα Γιαννουλάκη, Θάνος Νταϊλιάνης, Γιολάντα Κουλούρη και Νίκος Νικολιουδάκης. Ευχαριστώ για όλα, ίσως να μην έχετε καταλάβει πόσο πολύτιμοι και απαραίτητοι ήσασταν για μένα.

Πώς όμως μπορείς να εκφράσεις τις ευχαριστίες σου σε κάποιον που αποτέλεσε και αποτελεί αιτία για την οποία δεν άφησα την απογοήτευση να με καταβάλει στις δύσκολες στιγμές της διδακτορικής μου διατριβής και να με αποτρέψει από την επίτευξη των στόχων μου. Κάποιον που μου επιτρέπει να ονειρεύομαι, που με στηρίζει σε κάθε μου βήμα προσφέροντάς μου απλόχερα την ανεκτίμητη αγάπη του και την απέραντη αγκαλιά του. Νίκο σε ευχαριστώ για όλα σε επιστημονικό και κυρίως σε προσωπικό επίπεδο...να ξέρεις ότι χωρίς εσένα στο πλευρό μου τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχαν πραγματοποιηθεί με τόσο όμορφο τρόπο και ότι μέσα από όλη αυτήν την πορεία διαπίστωσα για μια ακόμη φορά το πόσο τυχερή στάθηκα με εσένα να αποτελείς αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής μου και μελλοντικό σύζυγό μου.

Αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής μου και της μέχρι σήμερα πορείας μου αποτελούν τα άτομα της οικογένειάς μου Λεωνίδα, Μάτα και Ελίνα, στους οποίους οφείλω τα πάντα. Η κατανόησή τους όλα αυτά τα χρόνια και η ολοκληρωτική τους αγάπη, η στήριξη και τα εφόδια που μου παρείχαν ελπίζω να ευώδοσαν και να με έκαναν έναν καλύτερο άνθρωπο. Δυστυχώς δεν πρόλαβα να ανταποδώσω λίγη από την ευτυχία και την ευγνωμοσύνη μου στον υπέροχο πατέρα μου, ο οποίος δεν βρίσκεται στον επίγειο τούτο κόσμο αλλά μέσα στην καρδιά μου. Μαλούλα μου σε ευχαριστώ για όλα όσα είσαι και για όλα όσα έχεις κάνει για μένα με έναν τόσο γλυκό τρόπο. Σε ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη σου και για τον τρόπο ζωής που μου έδειξες πως μπορώ να ζήσω. Αβέφι μου να ξέρεις πως στάθηκες στο πλάι μου με έναν ξεχωριστό και μοναδικό τρόπο και πως πήρα από εσένα θάρρος και αισιοδοξία ... σε ευχαριστώ.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αφιερωμένη από τα μύχια της ψυχής και της καρδιάς μου σε αυτούς μου με έκαναν ότι είμαι σήμερα...στους γονείς μου Λεωνίδα και Μάτα.

Περίληψη	5
Summary.....	7
Κεφάλαιο I: Ο κόσμος των λαγόμορφων	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Γενικά στοιχεία για τα Λαγόμορφα	9
1.2 Οι προγονικές μορφές των λαγόμορφων και η υπόθεση των Glires	10
1.2.1 Ενδείξεις από το αρχείο των απολιθωμάτων και τη μορφολογία.....	11
1.2.2 Ενδείξεις από τις αναλύσεις μοριακών δεικτών.....	12
1.2.3 Χρόνος διαφοροποίησης των λαγόμορφων από τα τρωκτικά.....	13
1.3 Οικογένειες Λαγομόρφων.....	14
1.3.1 Οικογένεια Ochotonidae	14
1.3.2 Οικογένεια Leporidae.....	15
1.3.2.1 Φυλογένεση και εξελικτική προέλευση της οικογένειας Leporidae	17
<i>Διαφοροποίηση της οικογένειας Leporidae</i>	<i>19</i>
1.4 Το γένος <i>Lepus</i>	20
1.5 Το είδος <i>Lepus europaeus</i> Pallas 1778.....	23
<i>Πληθυσμοί λαγού κατά τους ιστορικούς χρόνους.....</i>	<i>24</i>
<i>Μορφολογικά χαρακτηριστικά</i>	<i>24</i>
<i>Κατανομή.....</i>	<i>25</i>
<i>Μετατοπίσεις πληθυσμών του είδους στην Ευρώπη</i>	<i>26</i>
<i>Οικολογικές παράμετροι</i>	<i>28</i>
<i>Συμπεριφορά.....</i>	<i>29</i>
<i>Αναπαραγωγή</i>	<i>29</i>
<i>Βιωσιμότητα</i>	<i>30</i>
2. Μεταναστευτικές οδοί εποίκησης της Ευρώπης κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους	31
<i>Οι Παγετώδεις περίοδοι και η επίδρασή τους στα Ευρωπαϊκά είδη</i>	<i>32</i>
<i>Γνωστά μεταναστευτικά πρότυπα της Ευρώπης</i>	<i>34</i>
<i>Ζώνες υβριδισμού</i>	<i>34</i>
<i>Γενετικοί δείκτες για τη μελέτη εξέλιξης των πληθυσμών στο Πλειστόκαινο</i>	<i>36</i>
3. Τα Λαγόμορφα της Ευρώπης.....	37
3.1 Μελέτες γενετικής διαφοροποίησης των λαγών της Ευρώπης.....	38
3.1.1 Αναλύσεις βάσει πρωτεϊνών τόπων και RFLPs του mtDNA	39
3.1.2 Αναλύσεις αλληλουχιών γενετικού υλικού (DNA)	48
3.1.3. Αναλύσεις Μικροδορυφορικών αλληλουχιών.....	52
3.1.4 Συμπεράσματα επί των γενετικών μελετών του είδους <i>L. europaeus</i>	55
4. Στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής	57
Κεφάλαιο II: Ιδιαιτερότητες πληθυσμών του είδους στην Κρήτη	59
1. Ενδείξεις φθινοπωρινής αναπαραγωγής σε πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού της Κρήτης	59
1.1 Γενικά στοιχεία για την αναπαραγωγή των λαγών	59
1.2 Υλικά και Μέθοδοι	64
<i>Περιοχή Μελέτης</i>	<i>64</i>
<i>Κυνηγετική Περίοδος και συλλογή δεδομένων.....</i>	<i>65</i>

	<i>Ανάλυση Δεδομένων</i>	66
1.3	Αποτελέσματα	68
1.4	Συζήτηση	72
Κεφάλαιο III: Φυλογεωγραφία του Ευρωπαϊκού λαού στη Βαλκανική 79		
1.	Το Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) ως μοριακός δείκτης	79
	<i>Γενικά στοιχεία</i>	79
	<i>Δομή του μιτοχονδριακού DNA</i>	80
	<i>Οι δύο μη κωδικές περιοχές του mtDNA</i>	81
1.1	Η περιοχή ελέγχου του mtDNA (D-loop) ως φυλογενετικός δείκτης	81
2.	Υλικά και Μέθοδοι	83
2.1	Συλλογή δειγμάτων	83
2.2	Εργαστηριακές αναλύσεις	85
2.2.1	Εξαγωγή και ποσοτικοποίηση ολικού γενωμικού DNA	85
2.2.2	Πολλαπλασιασμός τμήματος της περιοχής ελέγχου (mtDNA)	86
2.2.3	Προσδιορισμός της αλληλουχίας της D-loop	87
2.3	Φυλογενετικές Αναλύσεις	87
2.3.1	Στοιχισή των αλληλουχιών	87
2.3.2	Έλεγχος ομοπλασίας	88
2.3.3	Εκτίμηση αριθμού απλοτύπων και νουκλεοτιδικής ποικιλότητας	89
2.3.4	Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων	89
2.3.5	Απομόνωση λόγω απόστασης (Isolation by distance)	90
2.3.6	Γεωγραφικά πρότυπα γενετικής διαφοροποίησης	91
2.3.7	Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης	92
2.3.8	Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης	93
2.3.9	Έλεγχος ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού	93
3.	Αποτελέσματα	97
3.1	Περιγραφικά στοιχεία των αλληλουχιών που παράχθηκαν	97
	<i>Αριθμός απλοτύπων</i>	97
	<i>Ανάλυση κορεσμού</i>	97
3.2	Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων	98
3.3	Απομόνωση λόγω απόστασης (Isolation by distance)	100
3.4	Γεωγραφικά πρότυπα γενετικής διαφοροποίησης (Barriers)	101
3.5	Φυλογενετικές αναλύσεις	105
3.6	Περιγραφή της τοπολογίας των φυλογενετικών δένδρων	107
3.7	Έλεγχος ομοιογένειας εξελικτικού ρυθμού	111
4	Συζήτηση	113
4.1	Γενικά στοιχεία	113
	<i>Αριθμός πολυμορφικών θέσεων</i>	113
	<i>Αριθμός απλοτύπων</i>	113
	<i>Γενετικές αποστάσεις για την περιοχή ελέγχου</i>	114
4.2	Απομόνωση λόγω απόστασης	116
4.3	Γεωγραφικά πρότυπα γενετικής διαφοροποίησης	117

4.4	Τοπολογία φυλογενετικών δέντρων και ταξινομικές αναθεωρήσεις.....	119
4.5	Ιστορική Βιογεωγραφία-Φυλογεωγραφικό σενάριο.....	122
	<i>Ζώνη επαφής</i>	128
	<i>Εποίκιση των νησιών του Αιγαίου από τον Ευρωπαϊκό λαγό</i>	130
4.6	Ενδείξεις μετατοπίσεων πληθυσμών, διείσδυσης γονιδιώματος και διαχειριστικές πρακτικές	132
	<i>Διείσδυση γονιδιώματος (Introgression)</i>	132
	<i>Μετατοπίσεις πληθυσμών</i>	132
	<i>Διαχειριστικές πρακτικές - ορισμός Σημαντικών Εξελικτικών Μονάδων (ESUs)</i> . 133	
Κεφάλαιο IV: Πληθυσμιακή δομή του Ευρωπαϊκού λαγού στη		
Βαλκανική..... 137		
1.	Οι Μικροδορυφορικές αλληλουχίες ως γενετικός δείκτης	137
1.1	Τι είναι οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες.....	138
	<i>Πλεονεκτήματα χρήσης μικροδορυφορικών γενετικών τόπων</i>	139
	<i>Μειονεκτήματα χρήσης μικροδορυφορικών γενετικών τόπων</i>	139
	<i>Γενικά συμπεράσματα ως προς τη χρήση μικροδορυφορικών τόπων</i>	141
1.2	Γενετική του τοπίου (Landscape Genetics)	141
1.3	Μέθοδοι αντιστοίχισης (Assignment Methods)	143
1.4	Σκοπός της χρήσης μικροδορυφορικών αλληλουχιών στην μελέτη.....	144
2.	Υλικά και Μέθοδοι	146
2.1	Συλλογή δειγμάτων.....	146
2.2	Εργαστηριακές αναλύσεις	146
	2.2.1 <i>Εξαγωγή και ποσοτικοποίηση ολικού γενωμικού DNA</i>	147
	2.2.2 <i>Πολλαπλασιασμός των μικροδορυφορικών αλληλουχιών</i>	147
	2.2.3 <i>Προσδιορισμός των γονοτύπων των υπό μελέτη ατόμων</i>	149
2.3	Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	150
	2.3.1 <i>Προϋποθέσεις των μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν</i>	151
	2.3.2 <i>Καθορισμός πληθυσμιακών μονάδων</i>	152
	<i>Structure</i>	152
	<i>Geneland</i>	153
	2.3.3 <i>Βασικές αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής</i>	155
	2.3.4 <i>Εντοπισμός των γενετικών ορίων βάσει αλληλικών συχνοτήτων</i>	156
	2.3.5 <i>Εκτίμηση παρουσίας υβριδίων στη ζώνη επαφής</i>	157
3.	Αποτελέσματα	159
3.1	Περιγραφικά στοιχεία των υπό μελέτη μικροδορυφορικών τόπων	159
3.2	Ορισμός πληθυσμιακών μονάδων	160
	<i>Geneland</i>	160
	<i>Structure</i>	161
3.3	Πληθυσμιακή διαφοροποίηση	164
3.4	Προσδιορισμός γενετικών ορίων βάσει αλληλικών συχνοτήτων	169
3.5	Παρουσία πιθανών υβριδίων στη ζώνη επαφής του mtDNA.....	170
4.	Συζήτηση	175

4.1	Γενικά χαρακτηριστικά των μικροδορυφορικών τύπων.....	175
	<i>Αριθμός αλληλομόρφων και ισορροπία Hardy-Weinberg</i>	<i>175</i>
	<i>Ανισορροπία Σύνδεσης</i>	<i>175</i>
4.2	Σύγκριση αποτελεσμάτων των προγραμμάτων STRUCTURE και GENELAND.....	176
4.3	Πληθυσμιακή διαφοροποίηση	179
4.4	Γενετικά Όρια	180
4.5	Παρουσία υβριδίων στη ζώνη επαφής του mtDNA	181
4.6	Ζώνη επαφής βάσει mtDNA και μικροδορυφορικών τύπων	183
4.7	Σύγκριση με μελέτες του είδους βάσει μικροδορυφορικών τύπων	185
4.8	Γενικά συμπεράσματα	187
4.9	Προοπτικές	189
	Παράρτημα I	192
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	197

Περίληψη

Ο Ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*), αν και αποτελεί κυρίαρχο στοιχείο της πανίδας των ανοικτών εκτάσεων με ιδιαίτερη οικονομική σημασία, έχει ελάχιστα μελετηθεί ως προς τη βιολογία του, όπου η φυλογεωγραφική και πληθυσμιακή του δομή του παραμένουν, στο μεγαλύτερο τμήμα τους, άγνωστες. Η έλλειψη ολοκληρωμένων μελετών του είδους, ιδιαίτερα στο χώρο της Βαλκανικής χερσονήσου, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μια τέτοια προσπάθεια ενέχει ορισμένες από τις πιο σημαντικές προκλήσεις στο χώρο της θεωρητικής πληθυσμιακής γενετικής, καθιστούν τη μελέτη Ευρωπαϊκού λαγού εξαιρετικής σημασίας με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον. Ο Ευρωπαϊκός λαγός, αποτελεί ένα είδος με συνεχή κατανομή που συναντάται σε ποικίλα ενδιαιτήματα, καλύπτοντας τους πόλους της ενδιαιτηματικής ποικιλότητας. Ως είδος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ικανότητα διασποράς με έντονη φιλοπατρική συμπεριφορά (κυρίως από τα θηλυκά άτομα), στοιχεία που συνιστούν μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της πληθυσμιακής δομής ενός είδους. Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αποκάλυψη της εξελικτικής ιστορίας του Ευρωπαϊκού λαγού στην περιοχή της Βαλκανικής χερσονήσου και της Κύπρου και ο καθορισμός της μικρο- και μακρογεωγραφικής του δομής, ενώ παράλληλα προσεγγίστηκαν ερωτήματα που αφορούν στην αποτελεσματικότητα της υπάρχουσας μεθοδολογίας ανάλυσης πληθυσμών με συνεχή κατανομή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε συνδυασμένη πληροφορία που προήλθε από διάφορους γενετικούς δείκτες, οι οποίοι συνίσταται σε 10 πυρηνικούς μικροδορυφορικούς τόπους και σε τμήμα της περιοχής ελέγχου (D-loop) του μιτοχονδριακού DNA. Η ανάλυση των παραπάνω γενετικών δεδομένων, λαμβάνοντας υπόψη τα γενικότερα προβλήματα καθορισμού πληθυσμιακών μονάδων, υπέδειξε ότι τα υπό μελέτη άτομα χαρακτηρίζονται από σημαντική ποικιλότητα και έντονη δομή με υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας, γεγονός που αντιτίθεται στην πλειοψηφία των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για το είδος. Οι παραγόμενες φυλογενετικές σχέσεις σε συνδυασμό με τα παλαιογεωγραφικά, παλαιοκλιματικά και παλαιοντολογικά δεδομένα της περιοχής επέτρεψαν τη διατύπωση ενός πιθανού φυλογεωγραφικού σεναρίου που αφορά στον τρόπο με το οποίο το είδος εποίκισε την Ευρώπη κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου. Βάσει αυτού, ο Ευρωπαϊκός λαγός εποίκισε τη Βαλκανική από το προγονικό απόθεμα του Καυκάσου, ακολουθώντας δύο διαφορετικές οδούς διασποράς (βόρεια και νότια της Μαύρης Θάλασσας), δίνοντας γένεση στους δύο βασικούς φυλογενετικούς κλάδους («ανατολικό» και «δυτικό») που παρατηρούμε σήμερα στον χώρο της Βαλκανικής. Παράλληλα, κατέστη για πρώτη φορά δυνατός ο καθορισμός του χωροταξικού προτύπου συνύπαρξης των δύο διαφοροποιημένων κλάδων στην περιοχή της βορειοανατολικής Ελλάδας. Τέλος όσον αφορά στην ανάλυση των δεδομένων που σχετίζονται με την αναπαραγωγή του είδους στην Κρήτη, διαπιστώθηκε ότι οι πληθυσμοί του νησιού εμφανίζουν ιδιαιτερότητες, παρουσιάζοντας ισχυρές ενδείξεις

συνεχούς αναπαραγωγής, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί και στη γενετική τους διακριτότητα. Συμπερασματικά, η πολύπλευρη μελέτη των πληθυσμών λαγού της Βαλκανικής, επέτρεψε τον καθορισμό των κυριότερων παραμέτρων που συνέβαλλαν στο παρόν πρότυπο της διαφοροποίησης του είδους.

Λέξεις κλειδιά: Ευρωπαϊκός λαγός, φυλογεωγραφία, πληθυσμιακή γενετική, αναπαραγωγή, Βαλκάνια

Summary

Although the European hare (*Lepus europaeus*) constitutes a main faunal element of open areas with a great socio-economic importance, little is known regarding the species biology, whereas its phylogeographic and population structure remain largely unknown. The study of European hare is interesting since it encompasses some of the most challenging principles in the field of theoretical population genetics. The species is continuously distributed in a variety of habitats occurring at the opposite extreme edges of the habitat variability, while it is characterized by high potential for dispersal and philopatry (females mostly), behavioral mechanisms that can play an important role in shaping the population structure of a species. The present study focuses on the European hare populations distributed in the Balkan peninsula and Cyprus. In an attempt to unravel the evolutionary history of the species and to determine its micro and macro-geographical genetic structure, we combined information acquired from distinct genetic markers, namely 10 nuclear microsatellite loci and partial control region (D-loop) sequences of mitochondrial DNA. Furthermore, we tried to assess the efficacy of current methodology in population genetics. Considering the problems encountered when defining populations and in contrast to what is currently known regarding the species genetic structure, hares of Balkans and Cyprus exhibited high variability and a remarkable genetic structure. The produced phylogenetic relationships coupled with paleogeographic, paleoclimatic and paleontological data allowed us to speculate a phylogeographic hypothesis according to which the species colonized Balkans during Pleistocene. Upon the phylogeographic scenario, an ancestral stock of the European hare inhabited areas of Caucasus where it probably diverged. During the middle and upper Pleistocene, ancestral populations of the species reached Europe following two distinct dispersal routes (north and south coastline of Black Sea) giving rise to the two phylogenetic clades (“eastern” and “western”) that are present today in Balkans. We also reported for the first time the spatial distribution of those highly divergent groups in the area of northeastern Greece where they occur in sympatry. Furthermore, information regarding the reproductive characteristics of Cretan populations revealed their discernible features, indicating a continuous reproduction of hares throughout the year, fact that could also be attributed to their genetic distinctiveness. Conclusively, the multi-dimensional study of European hare populations enabled the definition of the main features responsible for the pattern of diversity observed today in Balkans.

Keywords: European hare, phylogeography, population genetics, reproduction, Balkans

Κεφάλαιο Ι

Ο κόσμος των λαγόμορφων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τα Λαγόμορφα

Η τάξη των Λαγόμορφων περιλαμβάνει όλους εκείνους τους οργανισμούς που έχουν τη μορφή λαγού. Στην αρχαία ελληνική γλώσσα ο λαγός (λαγώς) είναι αυτός που διαθέτει χαλαρά/μαλακά αυτιά (Wiktionary: <http://el.wiktionary.org>). Αν και η ονομασία τους δεν προσδιορίζει διαγνωστικό χαρακτηριστικό της τάξης αυτής, ωστόσο είναι ενδεικτική της ομοιότητας που υπάρχει μεταξύ των αρτίγονων ειδών. Αποτελούν μια αρκετά διακριτή ομάδα, ενώ σπάνια υπάρχει αμφιβολία για το κατά πόσο ένας οργανισμός ανήκει ή όχι σε αυτήν (Wood 1957). Εξαιτίας της παρουσίας δύο ζευγών κοπτήρων στην άνω γνάθο, τα λαγόμορφα καλούνται και διπλόδοντα. Ο οδοντικός τους τύπος περιλαμβάνει 2/1 κοπτήρες, 0/0 κυνόδοντες, 3/2 προγόμφιους και 2-3/3 γομφίους, έχοντας συνολικά 26 ή 28 δόντια (Lawlor 1979, DeBlase & Martin 1981). Είναι χερσόβια, σκαπτικά, φυτοφάγα θηλαστικά, τα οποία μετακινούνται κυρίως με πηδήματα. Περνούν όλη τους τη ζωή πάνω από το έδαφος, με εξαίρεση ορισμένα είδη τα οποία δημιουργούν και ζουν μέσα σε λαγούμια (semifossorial) (DeBlase & Martin 1981) και η κοινωνική τους δομή ποικίλλει από ένα διάσπαρτο σύστημα (π.χ *Lepus*) έως ένα ιεραρχικό σύστημα (dominance hierarchies) όπως παρατηρείται στο Ευρωπαϊκό κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*) (Eisenberg 1966).

Τα λαγόμορφα έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά στην οικολογία και στην ταξινομική τους, ωστόσο δεδομένα που σχετίζονται τόσο με την εξελικτική τους ιστορία όσο και με τις παλαιοντολογικές τους καταγραφές είναι λιγιστά (Dawson 1958, Hibbard 1963, Dawson 1981, Myers & MacInnes 1981). Η τάξη των λαγόμορφων περιλαμβάνει δύο αρτίγονες οικογένειες, την Ochotonidae (πίκες ή ποντικολαγοί) και την Leporidae (κουνέλια και λαγοί). Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες μελέτες, η οικογένεια Leporidae αποτελείται από 11 αρτίγονα γένη, 7 από τα οποία είναι μονοτυπικά. Εντός της οικογένειας Leporidae έχουν αναγνωριστεί συνολικά 60 είδη (Hoffmann & Smith 2005 από Robinson & Matthee 2005), αριθμός που βάσει παλαιότερων αναφορών έφτανε μόλις τα 53 καταγεγραμμένα είδη (Angermann *et al.* 1990). Στην οικογένεια Ochotonidae ο αριθμός των ειδών φτάνει τα 30 (από τα 25 που ίσχυε παλαιότερα Angermann *et al.* 1990) (Robinson & Matthee 2005). Το γένος *Lepus* (~30 είδη) και το γένος *Sylvilagus* (~13 είδη) αποτελούν τα δύο γένη με τη μεγαλύτερη αφθονία ειδών του κλάδου αυτού (για παράδειγμα το *Pronolagus* περιλαμβάνει μόνο 3 είδη). Η χαμηλή ποικιλότητα που χαρακτηρίζει την τάξη αυτή έρχεται σε αντίθεση με την υψηλή, λόγω ακτινωτής εξέλιξης, ποικιλότητα των τρωκτικών με τα οποία τα λαγόμορφα

έχουν παραδοσιακά αποτελέσει αδελφή ομάδα στην ομαδοποίηση των Glires (Li *et al.* 1987, Novacek *et al.* 1988, Novacek 1990, 1993, Meng *et al.* 1994).

Τρέφονται κυρίως με μικρά ποώδη φυτά, αλλά και με θάμνους (DeBlase & Martin 1981) ενώ κάτω από αντίξοες συνθήκες κάποια είδη γίνονται σαρκοφάγα. Η **κοπροφαγία** (η επανάληψη της διαδικασίας της πέψης των κοπράνων) αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της συμπεριφοράς και των δύο οικογενειών της τάξης αυτής (Watson & Taylor 1955). Τα λαγόμορφα παράγουν δύο τύπους περιττωμάτων: α) τα μαλακά και υγρά, τα οποία τρώγονται και β) τα σκληρά και ινώδη, τα οποία αποβάλλονται. Αυτή η συνήθεια επιτρέπει στο ζώο να απορροφά τη μέγιστη δυνατή θρεπτική αξία των ινωδών φυτικών τροφών που καταναλώνει (πρωτεΐνες, βιταμίνες κυρίως της Β ομάδας και άλλους μεταβολίτες), καθώς και ορισμένων βιταμινών, που παράγονται από τα βακτήρια του εντέρου (τυφλό) (Hansen & Flinders 1969, Lawlor 1979, DeBlase & Martin 1981).

Τα λαγόμορφα κατανέμονται σε όλες τις χερσαίες περιοχές του πλανήτη με εξαίρεση κάποιες περιοχές στη Νότια Αμερική, τη Μαδαγασκάρη, τις Δ Ινδίες και στα περισσότερα νησιά της ΝΑ Ασίας, ενώ έχουν εισαχθεί από τον άνθρωπο σε περιοχές της Αυστραλίας, της Νέας Ζηλανδίας, της Ιάβας, καθώς και σε πολλά ωκεάνια νησιά (DeBlase & Martin 1981).

1.2 Οι προγονικές μορφές των λαγόμορφων και η υπόθεση των Glires

Τα Λαγόμορφα και τα Τρωκτικά αποτελούν δύο τάξεις πλακουντοφόρων θηλαστικών μικρού μεγέθους, που ομαδοποιούνται βάσει ομοιοτήτων στη μορφολογία του κρανίου και στην εμβρυακή τους μεμβράνη, αλλά κυρίως βάσει των ευμεγεθών και συνεχώς αναπτυσσόμενων κοπτήρων τους, δημιουργώντας τον κλάδο (υπέρταξη) των Glires (Dawson 1958, Douzery & Huchon 2004).

Η ταξινομική ομάδα των Glires προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Λινναίο το 1758, ενώ συνεχίζει ακόμα και σήμερα να αποτελεί σημείο έντονης διχογνωμίας, μετά από ουσιαστικά αιώνες επιχειρηματολογίας (Douzery & Huchon 2004). Επακόλουθο αυτού ήταν στις πρώτες μελέτες ταξινομικής, τα λαγόμορφα να συμπεριλαμβάνονται στην ομάδα των τρωκτικών. Η πρώτη προσπάθεια αναγωγής αυτών σε διακριτή ομάδα έγινε από τον Piger, ο οποίος τα διαχώρισε εντάσσοντάς τα σε μια από τις οκτώ οικογένειες τρωκτικών με το όνομα Διπλόδοντα, τα οποία στη συνέχεια ο Waterhouse (1842) ανήγαγε σε επίπεδο υπόταξης. Το 1855 ο Brandt υποδιαίρεσε τα τρωκτικά σε τέσσερις υποτάξεις: τα Λαγόμορφα, τα Σκιουρόμορφα, τα Μυόμορφα και τα Ιστρικόμορφα, ενώ μεταγενέστεροι μελετητές προσπάθησαν, βασιζόμενοι στα διαγνωστικά χαρακτηριστικά των λαγόμορφων και εστιάζοντας κυρίως στην παρουσία των δύο άνω κοπτήρων, να διασπάσουν την έως τότε ομάδα των τρωκτικών στα δύο, δηλαδή στα Διπλόδοντα (Λαγόμορφα) και στα Απλόδοντα (Σκιουρόμορφα, Μυόμορφα και Ιστρικόμορφα) (Wood 1957).

Ο Tullberg (1899) στην ανασκόπησή του για τα τρωκτικά, αν και εμφανώς εντυπωσιασμένος από τις διαφορές μεταξύ των Διπλόδοντων και των Απλόδοντων, θεώρησε ότι αυτές οι δύο ομάδες πρέπει να παραμείνουν ενωμένες εξαιτίας των εμβρυολογικών τους ομοιοτήτων, οι οποίες αργότερα αποδείχτηκαν από τον Hartman (1925) ως υπερεκτιμημένες. Σύμφωνα με τον τελευταίο, η απουσία αξιοσημείωτων ομοιοτήτων στο πρότυπο της οδοντοστοιχίας τους καθώς και οι έντονες διαφορές στις μεθόδους μάσησης, αποτελούν ενδείξεις διαφορετικής προέλευσης των δύο αυτών ομάδων.

Ο πρώτος επίσημος διαχωρισμός των λαγόμορφων από τα τρωκτικά πραγματοποιήθηκε από τον Gidley (1912). Σύμφωνα με τη μελέτη του, τα λαγόμορφα και τα τρωκτικά, αποτελούν δύο πολύ παλιές τάξεις θηλαστικών χωρίς καμία ιδιαίτερη σχέση μεταξύ τους, ενώ η ομάδα που παρουσιάζει τις περισσότερες ομοιότητες με τα λαγόμορφα είναι αυτή των αρτιοδάκτυλων, άποψη η οποία σταδιακά έγινε ευρύτερα αποδεκτή.

Στη συνέχεια ο Simpson (1945) ενώ αποδέχεται τον ταξικό διαχωρισμό, διατηρεί ωστόσο την ομαδοποίηση των δύο αυτών τάξεων με την προσφώνηση Glires, ως απόρροια περισσότερο άγνοιας παρά γνώσης, άποψη με την οποία συμφώνησαν πολλοί μετέπειτα συγγραφείς (Wood 1957). Σύμφωνα με τον Wood (1957), δεν υπάρχει κάποια εμπειριστατωμένη επιχειρηματολογία, ώστε να θεωρήσουμε ότι τα λαγόμορφα και τα τρωκτικά έχουν κοινή καταγωγή. Οι πρωτόγονες μορφές τρωκτικών και λαγόμορφων, χαρακτηρίζονται από λιγότερες ομοιότητες από ότι οι πιο πρόσφατες μορφές. Το γεγονός αυτό, καθιστά ως μοναδικά μεταξύ τους ενοποιητικά στοιχεία τους μασητήριους κοπήρες καθώς και τα χαρακτηριστικά εκείνα που φέρουν ως αρχέγονες ομάδες θηλαστικών. Οι δύο αυτές εξελικτικές γραμμές είναι ανεξάρτητες από το Παλαιόκαινο, χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις μεγαλύτερης συσχέτισης αυτών τότε από ότι σήμερα (Wood 1957).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν πολυάριθμες εναλλακτικές προτάσεις ως προς τις συγγενικές τάξεις των λαγόμορφων, οι οποίες όμως τυγχάνουν μικρής υποστήριξης μιας και η κάθε μια από αυτές εγείρει πολύ περισσότερες δυσκολίες από όσες ξεπερνά (Wood 1957).

1.2.1 Ενδείξεις από το αρχείο των απολιθωμάτων και τη μορφολογία

Βάσει μορφολογικών χαρακτήρων, τα λαγόμορφα έχουν ποικιλοτρόπως θεωρηθεί ότι σχετίζονται με αρκετές ομάδες θηλαστικών όπως τα Triconodonta (ομάδα απολιθωμένων θηλαστικών του Μεσοζωικού), τα Μαρσιποφόρα, τα Αρτιοδάκτυλα, τα Κονδύλαρθρα (απολιθωμένα οπληφόρα), τα Πρωτεύοντα, τα Εντομοφάγα, τα Macroscelidea και τα Scandentia (ανασκόπηση από τους Wood 1957 και Li *et al.* 1987). Παρόλα αυτά, η υπόθεση των Glires δεν έχει απορριφθεί ποτέ, αφού καμία από τις εναλλακτικές υποθέσεις δεν είναι επαρκώς επιστημονικά αποδεκτή. Αντιθέτως, η ομαδοποίηση αυτή, που ενώνει τα

Λαγόμορφα με τα Τρωκτικά ως αδελφές ομάδες, υποστηρίζεται σε μεγάλο βαθμό βάσει μορφολογικών δεδομένων (Simpson 1945, Novacek 1992, Liu & Miyamoto 1999).

Τέλος, σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων, οι πιο πρόσφατες προγονικές μορφές λαγόμορφων χρονολογούνται στο ανώτερο Ηώκαινο, όπου έχουμε την εμφάνιση του γένους *Mytonolagus* στη Βόρεια Αμερική καθώς και των γενών *Shamlagus* και *Gobiolagus* στη Μογγολία, τα οποία προκάλεσαν μεγάλη διαμάχη όσον αφορά στην ταξινόμησή τους σε επίπεδο οικογένειας (Wood 1957). Επιπρόσθετα, αντιπρόσωποι των δύο αρτίγωνων οικογενειών λαγόμορφων εντοπίζονται πίσω στο Ολιγόκαινο (34 εκ. χρ. πριν από σήμερα). Η κατανομή τους φαίνεται να είναι ως επί το πλείστον Ολαρκτική όπως και σήμερα. Αν και η μεταξύ τους διαφοροποίηση ήταν σαφέστατα μικρότερη από αυτήν που παρατηρείται σήμερα, ωστόσο αποτελούσαν και τότε διακριτές ομάδες, ενώ προβληματισμό όσον αφορά στη συστηματική τους σε επίπεδο οικογένειας, προκάλεσαν μόνο ένα με δύο γένη (Burke 1936, Wood 1940, Bohlin 1942).

1.2.2 Ενδείξεις από τις αναλύσεις μοριακών δεικτών

Οι μέχρι σήμερα δημοσιευμένες φυλογενετικές μελέτες δεν έχουν ξεκαθαρίσει πλήρως την εικόνα όσον αφορά στην ομαδοποίηση των Glires. Αιτίες αυτής της ασάφειας, αποτελούν τόσο η ελλιπής αντιπροσώπευση των τάξεων της ομάδας αυτής όσο και οι γενετικοί δείκτες και η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την ανάλυσή τους.

Ενώ ορισμένα τμήματα του πυρηνικού DNA (αμινοξικές αλληλουχίες α - και β -hemoglobins, myoglobin, lens a-crystallin A, fibrinopeptides A and B, cytochrome *c*, and ribonuclease) υποδεικνύουν μια σύνθετη ομάδα αποτελούμενη από Πρωτεύοντα, Λαγόμορφα και Τρωκτικά (Miyamoto & Goodman 1986), άλλα πυρηνικά γονίδια (pepsinogen C: Narita *et al.* 2001, IRBP: DeBry & Sagel 2001, Stanhope *et al.* 1992, vWF-von Willebrand Factor: Huchon *et al.* 2002, ϵ -globin και GHR: Waddell & Shelley 2003) ενισχύουν την υπόθεση μονοφυλετικής προέλευσης των Glires.

Αντιθέτως, δεδομένα μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), χρησιμοποιώντας ως αντιπρόσωπο της ομάδας των λαγόμορφων το κουνέλι, τοποθετούν τα Λαγόμορφα πιο κοντά στα Περισοδάκτυλα (Perissodactyla), τα Cetartiodactyla (φάλαινες και αγελάδες) και τα Σαρκοφάγα (Carnivora), παρά στα Πρωτεύοντα (Primates). Επιπρόσθετα, δεδομένα που προκύπτουν από αναλύσεις μεταφορικού RNA (tRNA) υποστηρίζουν την παραπάνω τοπολογία ενώ προσθέτουν σε αυτήν και τους σκαντζόχοιρους (Εντομοφάγα). Σε καμία ωστόσο από τις δύο παραπάνω αναλύσεις δεν απορρίπτεται η ύπαρξη της ομάδας των Glires (Waddell *et al.* 1999).

Σύμφωνα με τις πρώτες μελέτες πολυγονιδιακής ανάλυσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, τα τρωκτικά ενδέχεται να αποτελούν παραφυλετική ομάδα, η οποία δεν σχετίζεται με τα λαγόμορφα (π.χ. Graur *et al.* 1991, 1996, D'Erchia *et al.* 1996). Μετέπειτα

μελέτες ωστόσο υποστηρίζουν τη στενή σχέση μεταξύ των τρωκτικών και των λαγόμορφων, υποδεικνύοντας σαφέστατα τη μονοφυλετικότητα των Glires (Landry 1999, Luckett & Hartenberger 1993, Meng *et al.* 1994, Wallau *et al.* 2000).

Παράλληλα με τις μελέτες που προαναφέρθηκαν, υπήρξαν πολλές αμφισβητήσεις ως προς τα συμπεράσματα που εξάγονται από τα μοριακά δεδομένα, όσον αφορά στην παραφυλετικότητα της ομάδας των Glires. Οι αμφιβολίες αυτές βασίζονται στον περιορισμένο αριθμό των τάξεων που αναλύθηκαν, στη χρήση υπεραπλουστευμένων μοντέλων εξέλιξης, τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν τη φυλογένεση που ανακτάται ακόμα και κάτω από το κριτήριο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ML) (Pupko *et al.* 2002), στα προβλήματα καθορισμού της ρίζας των φυλογενετικών δέντρων και στα προβλήματα που παρουσιάζονται εξαιτίας του φαινομένου της έλξης των κλάδων μεγάλου μήκους (π.χ. Philippe & Douzery 1994, Adachi & Hasegawa 1996, Philippe 1997, Sullivan & Swofford 1997, Halanych 1998, Lin *et al.* 2002, Reyes *et al.* 2004).

Μελέτες πυρηνικού DNA, στις οποίες περιλαμβάνεται εκτεταμένος αριθμός αντιπροσώπων της ομάδας των Glires, καθώς και των υπόλοιπων τάξεων των πλακουντοφόρων, επιβεβαιώνουν ότι τα τρωκτικά αποτελούν αδελφή ομάδα των λαγόμορφων (Schmitz *et al.* 2000, Murphy *et al.* 2001a, b, Arnason *et al.* 2002, Huchon *et al.* 2002).

Στη μελέτη τους οι Reyes *et al.* (2004) αναλύοντας μεταξύ άλλων το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ενός ακόμα λαγόμορφου της οικογένειας Ochotonidae (*Ochotona princeps*) χρησιμοποίησαν αντιπροσωπευτικά δείγματα τόσο της τάξης των λαγόμορφων όσο και αυτής των τρωκτικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, υποστηρίζεται, αν και με μέτρια εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability), η μονοφυλετικότητα τόσο των τρωκτικών όσο και της ομάδας των Glires που τα περιλαμβάνει. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης, η ομάδα των Glires αποτελεί αδελφή ομάδα αυτής των Πρωτευόντων. Η συσχέτιση αυτή εμφανίζεται για πρώτη φορά με τη χρήση μιτοχονδριακών γονιδίων, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της αξιοπιστίας τόσο αυτών όσο και των πυρηνικών γονιδίων στην διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων σε επίπεδο τάξης αλλά και οικογένειας όταν α) στις αναλύσεις συμπεριλαμβάνονται αντιπροσωπευτικά τάξα, β) λαμβάνεται υπόψη η αμεροληψία της σύνθεσης αυτής και γ) χρησιμοποιούνται ισχυρές μέθοδοι στην κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων (Μπεύζιανή Συμπερασματολογία) (Reyes *et al.* 2004).

1.2.3 Χρόνος διαφοροποίησης των λαγόμορφων από τα τρωκτικά

Το χρονικό πλαίσιο στον οποίο διαφοροποιήθηκαν οι αρτίγονες τάξεις πλακουντοφόρων αποτελεί σημείο έντονης διαμάχης. Σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους η διαφοροποίηση αυτή άρχισε στο Παλαιόκαινο, 65-55 εκ. χρόνια πριν από σήμερα (π.χ. Alroy 1999). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών που βασίζονται σε μοριακά δεδομένα

υποστηρίζουν ότι τα πλακουντοφόρα είχαν ήδη διαφοροποιηθεί στο Κρητιδικό (π.χ Bininda-Emonds *et al.* 2007), αν και σε αρκετές από αυτές τις εργασίες, οι ημερομηνίες αποκλίνουν σημαντικά, αφού βασίζονται σε μικρό αριθμό σημείων αναφοράς για τη βαθμονόμηση των μοριακών ρολογιών (calibration points) και χρησιμοποιούν διαφορετικούς τρόπους εκτίμησης των χρόνων απόκλισης [μέθοδοι γενετικών αποστάσεων και Μπεϋζιανή προσέγγιση (Thorne *et al.* 1998)].

Οι Kumar & Hedges (1998) βάσει δεδομένων 119 πυρηνικών γονιδίων, χρονολογούν τη διαφοροποίηση των λαγόμορφων από τον φυλογενετικό κλάδο που περιλαμβάνει τον άνθρωπο στα $90,8 \pm 2$ εκ. χρόνια πριν από σήμερα, ενώ ο διαχωρισμός των τρωκτικών από τα λαγόμορφα σύμφωνα με τους Huchon *et al.* (2002) εκτιμάται στα $64,5$ ($57,3-73,3$) εκ. χρόνια πριν από σήμερα ακριβώς στο όριο Κρητιδικού-Τριτογενούς. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενδεικτικό ότι η διαφοροποίηση των τρωκτικών και των λαγόμορφων έλαβε χώρα στην αρχή του Τριτογενούς.

Ωστόσο οι χρόνοι αποκλίνουν σημαντικά από τους αντίστοιχους χρόνους που εκτίμησαν ο Bininda-Emonds και οι συνεργάτες του (2007), στη πληρέστερη ίσως μέχρι σήμερα μελέτη στα θηλαστικά, αφού στις αναλύσεις περιλαμβάνονται τόσο μοριακά όσο και μορφολογικά δεδομένα από το 99% των ειδών των θηλαστικών. Σύμφωνα λοιπόν με αυτούς, ο χρόνος απόκλισης των Glires από τα Πρωτεύοντα εκτιμάται στα $98,9 \pm 2,7$ εκ. χρ., ενώ για τα Λαγόμορφα, αν και η απόσχιση τους από τα Τρωκτικά έλαβε χώρα πριν από $91,8 \pm 1,3$ εκ. χρ., η διαφοροποίησή τους άρχισε πριν από $66,8 \pm 5,1$ εκ. χρ.

1.3 Οικογένειες Λαγομόρφων

Η τάξη των λαγόμορφων, όπως προαναφέρθηκε, περιλαμβάνει δύο αρτίγονες οικογένειες, την Ochotonidae και την Leporidae. Σύμφωνα με τον Dawson (1981) ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο οικογενειών λαγόμορφων έγινε πριν από 30-40 εκ. χρόνια. Νεότερες μελέτες, βασιζόμενες σε μοριακά δεδομένα ενισχύουν τα αποτελέσματα των παλαιοντολογικών δεδομένων, τοποθετώντας τον διαχωρισμό των δύο οικογενειών στα $37,5$ εκ. χρόνια πριν από σήμερα (Grillitsch *et al.* 1992), αν και οι Bininda-Emonds *et al.* (2007) υποστηρίζουν την απόσχιση αρκετά παλαιότερα στα 65 περίπου εκ. χρόνια πριν από σήμερα.

1.3.1 Οικογένεια Ochotonidae

Στην οικογένεια Ochotonidae ανήκουν τα μικρότερα σε μέγεθος λαγόμορφα που είναι γνωστά ως οι πίκες ή ποντικολαγοί. Αν και η οικογένεια αυτή κατά τη διάρκεια του Μειόκαινου περιλάμβανε αρκετά διαφοροποιημένα μέλη, ωστόσο σήμερα αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο αρτίγονο γένος (*Ochotona*), στο οποίο έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα 30 περίπου είδη. Μορφολογικά στις πίκες τα πίσω άκρα είναι ελάχιστα μεγαλύτερα από τα μπροστινά, τα αυτιά τους είναι σχετικά κοντά και στρογγυλεμένα ενώ η ουρά τους δεν είναι

εμφανής εξωτερικά (DeBlase & Martin 1981, Όντριας 1996). Απαντώνται με ασυνεχή εξάπλωση σε περιοχές της κεντρικής και Βόρειας Ασίας και της Βόρειας Αμερικής (Όντριας 1996).

1.3.2 Οικογένεια Leporidae

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι λαγοί και τα κουνέλια, ενώ κύριο χαρακτηριστικό της αποτελεί ο μεγάλος αριθμός ειδών που περιλαμβάνει (11 αρτίγονα γένη με περίπου 60 είδη, Hoffmann & Smith 2005 από Robinson & Matthee 2005). Σύμφωνα με τους Dice (1929) και Simpson (1945), η οικογένεια Leporidae υποδιαιρείται σε δύο υποοικογένειες: την Paleolaginae, στην οποία ανήκουν τα γένη *Pentalagus*, *Pronolagus* και *Romerolagus* και την Leporinae, η οποία περιλαμβάνει όλα τα υπόλοιπα γένη (Wilson & Reeder 1993). Ο διαχωρισμός αυτός ωστόσο δέχεται αμφισβήτηση από πολλούς μελετητές της ομάδας (π.χ. Ellerman *et al.* 1953).

Σε αντίθεση με τις πίκες, στους λαγούς και τα κουνέλια τα πίσω άκρα είναι κατά πολύ μεγαλύτερα από τα μπροστινά, τα εξωτερικά τμήματα των αυτιών είναι πολύ μακριά, ενώ η ουρά τους είναι κοντή αλλά εμφανής εξωτερικά (DeBlase & Martin 1981, Όντριας 1996). Η φυσική περιοχή κατανομής τους περιλαμβάνει την Ευρασία, τη Β. Αμερική, το βόρειο τμήμα της Ν. Αμερικής και την Αφρική (με εξαίρεση τη Μαγαδασκάρη) (που αντιστοιχούν στις βιογεωγραφικές ζώνες της Ολαρκτικής, της Αιθιοπίας, της βόρειας Νεοτροπικής και της Ανατολής) (DeBlase & Martin 1981).

Αν και ανήκουν στην ίδια οικογένεια, οι λαγοί και τα κουνέλια έχουν αναπτύξει αρκετά διαφορετικούς μηχανισμούς, όσον αφορά στον βιολογικό τους κύκλο. Μια από τις βασικότερες διαφορές τους έγκειται στο γεγονός ότι τα μικρά των κουνελιών κατά τη γέννησή τους δεν βλέπουν, ούτε είναι σε θέση να κινηθούν από μόνα τους και να απομακρυνθούν από τη φωλιά και την φροντίδα της μητέρας τους. Αντιθέτως, τα νεογνά των λαγών γεννιούνται με τρίχωμα, έχουν όραση και μπορούν να κινηθούν ανεξάρτητα σχεδόν μόνα τους (DeBlase & Martin 1981).

Οι λαγοί διαθέτουν τα μεγαλύτερα αυτιά και τα μακρύτερα πόδια στην τάξη των λαγόμορφων, στοιχεία που σχετίζονται με τον έλεγχο της θερμοκρασίας και την ικανότητά τους για τρέξιμο. Επιπρόσθετα, το κρανίο τους είναι πιο ελαφρύ από αυτό των κουνελιών. Τα αρσενικά άτομα είναι μικρότερα από τα θηλυκά, το αντίθετο δηλαδή από ότι παρατηρείται συνήθως στα θηλαστικά. Το βάρος τους κυμαίνεται από 2Kg (οι αντιπρόσωποι του Ισημερινού) έως 5Kg (αντιπρόσωποι των βόρειων περιοχών) (Flux & Angermann 1990).

Ζουν κυρίως σε ανοικτές εκτάσεις, καταλαμβάνοντας ποικίλα ενδιαιτήματα (αρκτική τούνδρα, στέπες, γεωργικά λιβάδια, τροπικές σαβάνες και ερήμους) σε βόρειες, εύκρατες και τροπικές περιοχές, από το επίπεδο της στάθμης της θάλασσας έως τα 5000 μέτρα. Το εύρος χωροκράτειας τους (home range) κυμαίνεται από 10 έως 300 εκτάρια (ha). Αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις χωροκρατικής συμπεριφοράς, ωστόσο παρατηρείται ιεραρχία η οποία

επιρεάζει την πρόσβαση στην τροφή (Monaghan & Metcalfe 1985). Σε σύγκριση με το Ευρωπαϊκό αγριοκούνελο, η πληθυσμιακή πυκνότητα είναι συνήθως πολύ χαμηλότερη και πιο ομοιογενώς κατανεμημένη, φτάνοντας κατά μέσο όρο το ένα άτομο ανά 5-20 ha, πέφτοντας, ωστόσο, στο 1 άτομο/km² ή ακόμα χαμηλότερα για τον ορεσίβιο και τον αρκτικό λαγό στο μεγαλύτερο τμήμα κατανομής τους. Μια πολύ καλά γνωστή εξαίρεση αποτελεί το είδος *Lepus americanus* (snowshoe hare) που χαρακτηρίζεται από 10ετή κύκλο αφθονίας και πυκνότητες που κυμαίνονται από 0,1 λαγούς έως 11-23 λαγούς ανά ha στο ζενίθ του 10ετή κύκλου (Keith & Windberg 1978). Είναι κυρίως νυκτόβιοι οργανισμοί, οι πληθυσμοί των οποίων εμφανίζουν μεγάλες κυκλικές διακυμάνσεις (Keith 1963). Η υψηλή μεταναστευτική ικανότητα των λαγών, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της νύχτας, με κύριο στόχο την εύρεση της τροφής δίνει κάποιες φορές λανθασμένη εντύπωση υψηλής πυκνότητας. Οι λαγοί φαίνονται ήσυχα, μοναχικά ζώα, ωστόσο οι μηχανισμοί συμπεριφοράς που τους χαρακτηρίζουν πρέπει να είναι αρκετά πολύπλοκοι ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς ότι είναι σε θέση να ρυθμίζουν την πληθυσμιακή τους πυκνότητα σε επίπεδα που είναι πολύ πιο χαμηλά από τη φέρουσα ικανότητα του περιβάλλοντος (Flux & Angermann 1990). Συνήθως γεννούν από 1 έως 6 μικρά, αν και στους λαγούς των βόρειων περιοχών έχουν παρατηρηθεί πολλές φορές ακόμα και 8 μικρά. Αντίθετα στις περιοχές του Ισημερινού γεννούν 1-2 μικρά, έχοντας όμως μια εκπληκτική συνεχή αναπαραγωγή καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, χωρίς να αποκλίνουν από τη μέση ετήσια παραγωγή που φτάνει περίπου τα 10 μικρά ανά θηλυκό άτομο (Flux 1981).

Οι αντιπρόσωποι της οικογένειας αυτής αποτελούσαν κύρια πηγή τροφής του ανθρώπου, παρά το γεγονός ότι άλλοι ζωικοί οργανισμοί όπως τα μαμούθ, τα άλογα και τα μεγαλόσωμα οπληφόρα (ελάφια, βουβάλια ή γαζέλες) παρείχαν περισσότερη τροφή σε σχέση με την κυνηγετική προσπάθεια. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από παρατηρήσεις οστών λαγών, τα οποία βρέθηκαν μαζί με άλλα ζωικά υπολείμματα σε διάφορες θέσεις ανασκαφών, που θεωρείται ότι καταλαμβάνονταν από προϊστορικούς ανθρώπους. Οι παλιότερες ενδείξεις έχουν καταγραφεί στην Gotta San Bernardino της Βορειοανατολικής Ιταλίας και χρονολογούνται στο ανώτερο και μέσο Πλειστόκαινο (156.000-108.000 χρόνια πριν από σήμερα) (Fiore *et al.* 2004). Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο το κατά πόσο τα οστά αυτά είχαν χρησιμοποιηθεί από τους ανθρώπους ή είχαν μεταφερθεί στις σπηλιές αυτές από άλλα σαρκοφάγα ζώα. Σύμφωνα με τους Suchentrunk *et al.* (2006), οι καταγραφές των οστών αποδεικνύουν ότι η σύλληψη των λαγών, των τρωκτικών (μαρμότες), καθώς και άλλων σαρκοφάγων είχαν ως επιπλέον στόχο την απόκτηση του δέρματός τους και τη μετέπειτα χρήση του από τους προϊστορικούς ανθρώπους.

Μεταγενέστερης ηλικίας οστά λαγόμορφων ανακαλύφθηκαν επίσης και σε Παλαιολιθικές θέσεις της κεντρικής Ευρώπης (ανώτερη Παλαιολιθική περίοδος Gravettian: 26.000-21.000 χρόνια πριν από σήμερα) (Musil 1994 cf Hockett & Haws 2002).

1.3.2.1 Φυλογένεση και εξελικτική προέλευση της οικογένειας Leporidae

Έχοντας κατά νου την συντηρητική τάση που εμφανίζουν οι μορφολογικοί χαρακτήρες των λαγόμορφων, δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι οι διακρίσεις μεταξύ των ειδών έχουν γίνει ως επί το πλείστον βάσει μοριακών μελετών, οι οποίες οδήγησαν με τη σειρά τους στην αύξηση του αριθμού των ειδών που έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα. Παρά την κοινή παρουσία πολλών ειδών της οικογένειας Leporidae και τη σημαντικότητά τους ως είδη που είτε θηρεύονται είτε προκαλούν βλαβερές επιπτώσεις στην οικονομία ορισμένων περιοχών, έχουν αναλογικά προκαλέσει μικρό επιστημονικό ενδιαφέρον και ιδιαίτερα όσον αφορά στην εξέλιξή τους. Στην πραγματικότητα, δεν έχει υπάρξει ακόμα συναίνεση όσον αφορά στις αδελφές σχέσεις μεταξύ των 11 γενών της οικογένειας, χωρίς να αναφερθούμε σε ερωτήματα που σχετίζονται με τη συστηματική γενών, που διαθέτουν έναν μεγάλο αριθμό ειδών, όπως το γένος *Lepus* (λαγοί) και το γένος *Sylvilagus* (cottontails) (Robinson & Matthee 2005).

Όσον αφορά στην κατανομή των ειδών της οικογένειας αυτής, η ευρέως διαδεδομένη παρουσία του πολυπληθούς σε είδη γένους *Lepus* έρχεται σε αντίθεση με τα περισσότερα από τα υπόλοιπα γένη της οικογένειας, τα οποία είναι μονοτυπικά (*Brachylagus*, *Pentalagus*, *Caprolagus*, *Bunolagus*, *Poelagus*, *Romerolagus* και *Oryctolagus*). Εξαιρέση αποτελούν τα γένη *Nesolagus* (2 είδη), *Sylvilagus* (17 είδη) και *Pronolagus* (4 είδη). Αρκετά από τα προαναφερθέντα γένη είναι στενοενδημικά, γεγονός που οδήγησε στην την αναγνώρισή τους ως κινδυνεύοντα ή ευάλωτα στις κατηγορίες της Παγκόσμιας Ένωσης Προστασίας της Φύσης (IUCN), (World Conservation Union ή International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) (<http://www.redlist.org>, Chapman *et al.* 1990).

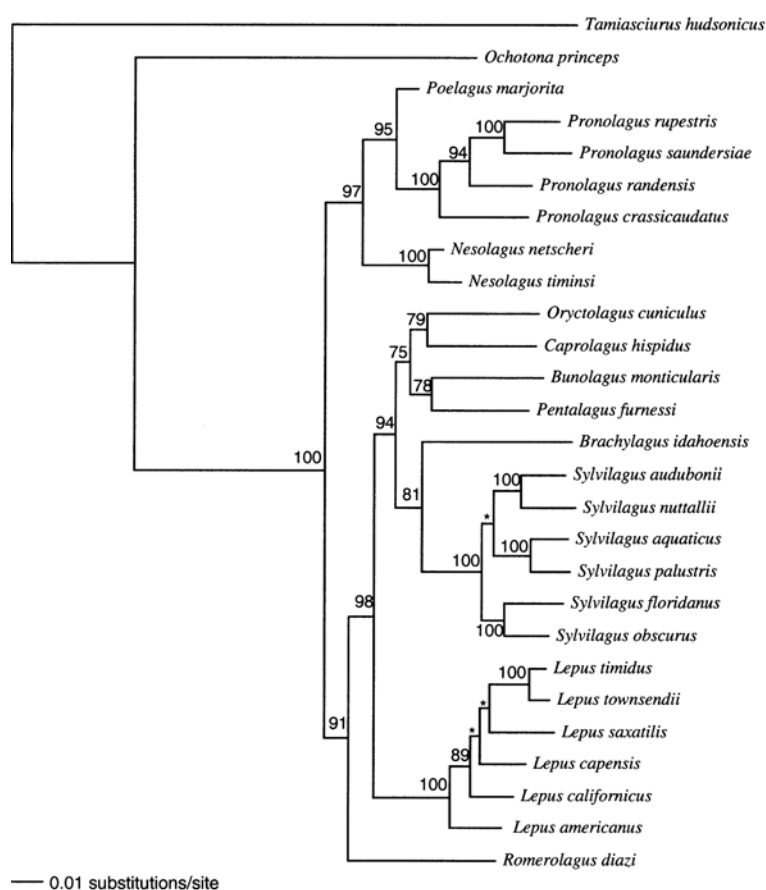
Μέχρι σήμερα, η κατασκευή ενός αξιόπιστου φυλογεντικού δέντρου για την οικογένεια των Leporidae μέσω α) μορφολογικών χαρακτήρων (Corbet 1983 και αναφορές που υπάρχουν εντός της μελέτης, Averianov 1999), β) κυτταρογενετικών δεδομένων (Robinson *et al.* 2002 και αναφορές μέσα σε αυτήν) και γ) μιτοχονδριακών αλληλουχιών (Halanych & Robinson 1999, Yamada *et al.* 2002) έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα δύσκολο εγχείρημα. Η αδυναμία καθορισμού των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών της οικογένειας οφείλεται εν μέρει στη σύγκλιση που παρουσιάζουν οι μορφολογικοί χαρακτήρες, στους αυταπομορφικούς χαρακτήρες των κυτταρογενετικών δεδομένων και στην εκτεταμένη ομοπλασία των μιτοχονδριακών αλληλουχιών. Συμπερασματικά και στα χρόνια που ακολούθησαν από την ανασκόπηση της τάξης από τον Dawson το 1981, η πρόοδος που έχει παρατηρηθεί σχετικά με τις εξελικτικές σχέσεις των μελών της οικογένειας είναι μικρή.

Σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων, η οικογένεια Leporidae χαρακτηρίζεται από ένα συντηρητικό εξελικτικό παρελθόν με σταδιακές αλλαγές κατά την περίοδο του Τριτογενούς, οι οποίες ακολουθήθηκαν από επικείμενη διαφοροποίηση. Σύμφωνα με τις παλαιοντολογικές καταγραφές η οικογένεια Leporidae εξελίχθηκε είτε στην Ασία είτε στη Βόρειο Αμερική, χωρίς ωστόσο να είναι εφικτή η αποσαφήνιση της προέλευσής τους,

δεδομένου ότι απουσιάζουν σημαντικά απολιθώματα από την εποχή του Ηωκαίνου (Dawson 1981). Παρόλα αυτά, η υπόθεση της προέλευσης της οικογένειας Leporidae από τη Βόρεια Αμερική θεωρείται η πιο πιθανή, γεγονός που υποστηρίζεται και από την πρόσφατη ανακάλυψη δύο νέων απολιθωμάτων, των οποίων η ηλικία είναι κατά περίπου 5 εκ. χρ. μεγαλύτερη από την ηλικία των παλαιότερων Ευρασιατικών απολιθωμάτων (White 1991, Voorhies & Timperley 1997).

Η ταυτόχρονη ανάλυση ενός συνόλου διαφορετικού τύπου δεδομένων (π.χ. διαφορετικά γονίδια) ως μια μεγάλη μήτρα δεδομένων (supermatrix analysis ή ανάλυση υπερμήτρας) βασίζεται σε ατομικούς χαρακτήρες (πρωτογενή δεδομένα) και η συνεισφορά του κάθε χαρακτήρα είναι εύκολα προσβάσιμη και επομένως στη διαθεσιμότητα του κάθε ερευνητή. Συγκριτικά με αναλύσεις που βασίζονται σε ένα και μόνο γονίδιο, η συνδυασμένη μοριακή ανάλυση είναι λιγότερο ευαίσθητη σε ασάφειες στην τοπολογία ενός δέντρου, οι οποίες θα μπορούσαν να οφείλονται στην ανομοιογένεια του εξελικτικού ρυθμού μεταξύ των γονιδίων ή στην ελλιπή δειγματοληψία των τάξεων. Πρόσφατα, η μετα-ανάλυση 5483 χαρακτήρων από 5 πυρηνικά και 2 μιτοχονδριακά τμήματα γονιδίων της μελέτης των Matthee *et al.* (2004) (υπερμήτρα μοριακών δεδομένων) από 27 αντιπροσωπευτικά τάξα των 11 γενών της οικογένειας Leporidae ομαδοποίησε τα αρτίγονα γένη της οικογένειας αυτής σε δύο εξελικτικούς κλάδους (Robinson & Matthee 2005) (**Εικόνα 1**). Ο πρώτος κλάδος περιλαμβάνει τα Αφρικανικά *Poelagus* και *Pronolagus* ως αδελφά γένη (σχέση η οποία προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Elletman *et al.* 1953), με το Ασιατικό *Nesolagus* να βρίσκεται στη βάση αυτού του κλάδου. Ο δεύτερος κλάδος περιλαμβάνει τα γένη *Romerolagus* (Κεντρική Αμερική), *Lepus* (κοσμοπολίτικο), *Sylvilagus* (Βόρεια και Νότια Αμερική), *Brachylagus* (Βόρεια Αμερική), *Pentalagus* (Ασία), *Bunolagus* (Αφρική), *Caprolagus* (Ασία) και *Oryctolagus* (Ευρώπη).

Στον δεύτερο αυτό κλάδο το γένος της Κεντρικής Αμερικής (*Romerolagus*) αποκλίνει πρώτα από όλα, ενώ τα γένη του Νέου Κόσμου *Brachylagus* και *Sylvilagus* αποτελούν αδελφές ομάδες, που σχετίζονται με τον υποκλάδο που περιλαμβάνει τα γένη *Pentalagus*, *Bunolagus*, *Caprolagus* και *Oryctolagus*, η μονοφυλετικότητα του οποίου υποστηρίζεται στατιστικά. Εντός του τελευταίου υποκλάδου, τα γένη *Oryctolagus*+*Caprolagus* και *Bunolagus*+*Pentalagus* αποτελούν αδελφά τάξα. Αντιθέτως, οι ακριβείς εξελικτικές σχέσεις μεταξύ αυτών δεν ήταν δυνατό να ξεκαθαριστούν με τη χρήση δεδομένων μόνο πυρηνικού ή μόνο μιτοχονδριακού DNA. Ωστόσο, ένα από τα πιο εντυπωσιακά ευρήματα της μελέτης των Matthee *et al.* (2004) ήταν ότι, σε αντίθεση με τα συμπεράσματα που βασίζονται σε αναλύσεις μορφολογικών δεδομένων (Angermann *et al.* 1990, Averianov 1999), το γένος *Lepus* δεν αποτελεί μια πρόσφατη εξελικτικά φυλογενετική γραμμή. Η παλαιότητά του



Εικόνα 1.

Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας (ML) το οποίο παράχθηκε από την ανάλυση υπερ-μήτρας δεδομένων η οποία βασίζεται σε αλληλουχίες πυρηνικού DNA (ιντρόνια) και μιτοχονδριακού DNA (δύο γονίδια) από τη μελέτη των Matthee *et al.* (2004). Σε κάθε κόμβο παρουσιάζονται οι τιμές στατιστικής υποστήριξης (100 επαναλήψεις). Τα μήκη των κλάδων είναι ανάλογα του αριθμού των υποκαταστάσεων.

* είναι ενδεικτικό στατιστικών τιμών υποστήριξης <70%.

φαίνεται τόσο από τη θέση του στο φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας (ML), όπου εμφανίζεται στην βάση του δεύτερου κλάδου, όσο και από μεγάλο μήκος του εσωτερικού κλάδου που οδηγεί στα αρτίγωνα τάξα του γένους *Lepus*. Ουσιαστικά αυτό που διαπιστώνεται είναι ότι η διάσπαση του γένους ήταν αδιαμφισβήτητα ταχύτατη, με τη δημιουργία σύμπλοκων ειδών στην Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική, τα οποία χαρακτηρίζονται από πολλά συγγενικά και πρόσφατα διαφοροποιημένα τάξα.

Διαφοροποίηση της οικογένειας Leporidae

Όσον αφορά στο χρόνο διαφοροποίησης της οικογένειας Leporidae, μελέτες παλαιότερων ετών την τοποθετούν στο μέσο με ανώτερο Πλειστόκαινο (Hibbard 1963, Dawson 1981, Chapman & Flux 1990). Αν και σύμφωνα με τον Hibbard (1963) οι κλάδοι που οδήγησαν στα γένη της οικογένειας Leporidae διαφοροποιήθηκαν κατά το Πλειστόκαινο (λιγότερο από 2 εκατ. χρόνια πριν από σήμερα), ωστόσο η διαφοροποίηση του γένους *Oryctolagus* θα πρέπει να έλαβε χώρα πολύ παλαιότερα, αφού και τα πρώτα αναγνωρίσιμα απολιθώματα του γένους εκτιμώνται στα 6-6,5 εκατ. χρόνια πριν από σήμερα (Lopez-Martinez 1977). Επιπλέον, οι Biju-Duval *et al.* (1991) βασισμένοι στην ανάλυση περιοριστικών θέσεων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) χρονολογούν τον κοινό πρόγονο των γενών *Sylvilagus*, *Lepus* και *Oryctolagus* στα 6-8 εκατ. χρόνια. Αντίθετα, η μελέτη των Halanych & Robinson (1999) βασισμένη στη μικρή υπομονάδα του μιτοχονδριακού ριβοσώματος (12S rDNA) παρουσιάζει μια ακόμα παλιότερη χρονολογία (12,2 με 16,3 εκ.

χρόνια πριν από σήμερα), ενώ η ανάλυση ισοενζυμικών συστημάτων, εκτιμά τη διαφοροποίηση μεταξύ των γενών *Lepus* και *Oryctolagus* στα 3,65 εκ. χρόνια πριν από σήμερα, (Grillitsch *et al.* 1992).

Οι Matthee *et al.* (2004) διατυπώνοντας την πιο πρόσφατη και καλύτερα μέχρι σήμερα υποστηριγμένη υπόθεση, απέδωσαν τη σημερινή γεωγραφική κατανομή της οικογένειας σε εννέα τουλάχιστον γεγονότα διασποράς και πέντε φαινόμενα βικαριανισμού. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, ο πρόγονος της οικογένειας εντοπιζόταν είτε στην Ασία είτε στην Ασία και τη Βόρειο Αμερική, με αποτέλεσμα η πρώτη δια-ηπειρωτική ανταλλαγή να πραγματοποιήθηκε μεταξύ των δύο αυτών ηπείρων πριν από τουλάχιστον 14 ($\pm 1,47$) εκατομμύρια χρόνια, χρονολογία που υποστηρίζεται από τις εκτιμήσεις διαφόρων γεωλογικών και περιβαλλοντικών αλλαγών (επικοινωνία Ασίας-Β. Αμερικής μέσω του Βερίγγειου πορθμού περίπου στα 15 εκ. χρόνια πριν από σήμερα, Zachos *et al.* 2001). Στη συνέχεια ο Ασιατικός πρόγονος έδωσε γένεση στα αρτίγονα Αφρικανικά γένη *Poelagus* και *Pronolagus* πριν από περίπου 11,3 ($\pm 1,53$) εκ. χρόνια, ενώ το απόθεμα της Βορείου Αμερικής έδωσε γένεση σε δύο διαφοροποιημένες φυλογενετικές γραμμές που σήμερα αντιπροσωπεύονται από τα γένη *Romerolagus* και *Lepus*, *Sylvilagus*, *Brachylagus*, *Pentalagus*, *Caprolagus*, *Bunolagus*, *Oryctolagus* πριν από 12,77 ($\pm 1,34$) εκ. χρόνια. Επικείμενες δια-ηπειρωτικές ανταλλαγές και βικαριανιστικά γεγονότα οδήγησαν στην παραμονή των γενών *Sylvilagus* και *Brachylagus* στη Βόρειο Αμερική και στην εγκαθίδρυση των *Pentalagus*, *Caprolagus*, *Bunolagus* και *Oryctolagus* στην Ασία (11,8-10,28 εκατ. χρόνια πριν από σήμερα). Μετέπειτα υποθέσεις για φαινόμενα διασποράς ή βικαριανισμού δεν είναι ξεκάθαρες, ενώ το μόνο που μπορεί να ειπωθεί είναι ότι η Αφρικανική ήπειρος εποίκιστηκε δύο τουλάχιστον φορές. Το τελευταίο κύμα διασποράς από τη Βόρειο Αμερική στην Ασία έγινε πολύ πιο πρόσφατα και αντιπροσωπεύτηκε από ένα και μόνο γένος, το γένος *Lepus* (Matthee *et al.* 2004).

1.4 Το γένος *Lepus*

Το γένος *Lepus* εξαπλώνεται τόσο στον Παλαιό όσο και στον Νέο Κόσμο και είναι αρκετά πολύπλοκο, όσον αφορά στην ταξινομική του, αφού τα είδη που αναγνωρίζονται μέσα σε αυτό ποικίλλουν από 12 έως πάνω από 30, ανάλογα με την ταξινομική κλείδα που χρησιμοποιείται. Εξαιρουμένων κάποιων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σε περιορισμένες γεωγραφικά περιοχές (Robinson 1982, Dixon *et al.* 1983, Schneider & Leirpoldt 1983), οι σχέσεις μεταξύ των λαγών του γένους *Lepus* παραμένουν αρκετά ασαφείς, αφού δεν υπάρχει κάποια γενικότερη ομοφωνία, όσον αφορά στην εγκυρότητα αρκετών ειδών αυτής της ομάδας. Μια από τις μεγαλύτερες δυσκολίες στη μελέτη τους αποτελεί το γεγονός ότι ως είδη που εμφανίζουν ευρεία κατανομή, παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη ενδοειδική ποικιλότητα (απομακρυσμένοι γεωγραφικά πληθυσμοί) από ότι διαειδική. Αυτό

έχει ως αποτέλεσμα, αρκετές από τις τοπικές μορφές να έχουν περιγραφεί ως νέα είδη (Flux & Flux 1983). Δεδομένης αυτής της αβέβαιης ταξινομικής είναι αρκετά δύσκολο να καθοριστούν τα εξελικτικά μονοπάτια που ακολούθησε το γένος *Lepus*, όπως και οι πρόγονοί του. Επιπρόσθετα, οι φυσικές αλλαγές στο εύρος κατανομής των ειδών του γένους ως επακόλουθο των Παγετωδών περιόδων, η πρόσφατη επέκταση της γεωργίας και οι μη καταγεγραμμένες μετατοπίσεις ατόμων από τους κυνηγούς τα τελευταία 3.000 χρόνια έχουν συμβάλει στην ακόμα μεγαλύτερη πολυπλοκότητα της εικόνας τους. Το γεγονός αυτό ενισχύεται ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς ότι οι νέο-εισαγόμενοι αυτοί πληθυσμοί μπορούν να διαφοροποιούνται ως προς το μέγεθος του σώματός τους (σύμφωνα με τον κανόνα του Bergmann) μέσα σε 100 χρόνια (Flux 1967) και ως προς στο χρώμα του τριχώματός τους σε μόλις 40 χρόνια (Bergengren 1969).

Όλα τα είδη του γένους αυτού διαθέτουν $2n = 48$ χρωμοσώματα (Robinson *et al.* 1983 και αναφορές εντός αυτής, Azzaroli Pucetti *et al.* 1996, Gonzalez & Cervantes 1996, Lorenzo *et al.* 2003) και διαφέρουν ελάχιστα ως προς την ποσότητα της περικεντρομερικής ετεροχρωματίνης. Αυτή η καρυοτυπική σταθερότητα, θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την ιστορία και την πρόσφατη ακτινωτή εξέλιξη των ειδών των κύριων εξελικτικών κλάδων του γένους, την σταθερότητα του γονιδιώματος και την υψηλή ικανότητα του είδους για διασπορά (γονιδιακή ροή) (Robinson & Matthee 2005). Ωστόσο, αρκετές είναι οι περιπτώσεις εκείνες, όπου τα αποτελέσματα μελέτης αλληλουχιών mtDNA θέτουν υπό αμφισβήτηση την υπάρχουσα ταξινομική (Halanych & Robinson 1999, Pierpaoli *et al.* 1999, Wu *et al.* 2000, Koh *et al.* 2001, Kryger 2002, Yamada *et al.* 2002, Alves *et al.* 2003, Kryger *et al.* 2004, Yu 2004).

Διάφορες μελέτες τοποθετούν την εμφάνιση των κύριων κλάδων εντός του γένους *Lepus* στα 6-3 εκατ. χρόνια πριν από σήμερα (Pérez-Suarez *et al.* 1994, Pierpaoli *et al.* 1999, Kryger 2002, Yamada *et al.* 2002, Matthee *et al.* 2004), οδηγώντας στην ανάπτυξη των γενεαλογικών γραμμών του γένους στις περιοχές της Βορείου Αμερικής, της Ευρώπης, της Ασίας και της Αφρικής. Η ειδογένεση σε τοπική κλίμακα είναι αναμφισβήτητα πιο πρόσφατη (π.χ. <0,8 εκ. χρόνια πριν από σήμερα για τα είδη *L. timidus*, *L. corsicanus* της Ευρώπης Pierpaoli *et al.* 1999). Η αξιοσημείωτη γεωγραφική κατανομή των λαγών πιθανώς διευκολύνθηκε από την εμφάνιση σειράς μοναδικών χαρακτήρων και ιδιαίτερα αυτών της γέννησης νεογνών με ιδιότητες που τα καθιστούν ανεξάρτητα (γεννιούνται με ανοιχτά μάτια και ικανότητα μετακίνησης), της αύξησης του μεγέθους του σώματος και της ανάπτυξης πίσω άκρων, τα οποία είναι κατάλληλα προσαρμοσμένα για γρήγορο τρέξιμο και διαβίωση σε ανοικτά ενδιαιτήματα. Η διαφοροποίηση αυτή ήταν τόσο σύντομη ώστε να επιτραπεί η παραγωγή γόνιμων υβριδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών του γένους, όπως αυτή μεταξύ του Ευρωπαϊκού και του ορεσίβιου λαγού (Gustavsson 1971).

Σύμφωνα με τον Hibbard (1963) το γένος *Lepus* προέκυψε από το προγονικό απόθεμα των γενών *Sylvilagus* και *Oryctolagus*. Είναι γεγονός ότι τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων των Matthee *et al.* (2004) έρχονται σε συμφωνία με μια τέτοιου είδους δήλωση και παράλληλα προσθέτουν ότι η διαφοροποίηση του γένους αυτού πραγματοποιήθηκε πριν από την ανάπτυξη του κλάδου *Sylvilagus/Oryctolagus*. Πιο συγκεκριμένα, το γένος *Lepus* θεωρείται ότι προήλθε από τη Β. Αμερική, ενώ σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του μοριακού ρολογιού, η διαφοροποίησή του έγινε περίπου 11,8 εκ. χρόνια πριν από σήμερα. Η υπόθεση που έχει διατυπωθεί συνίσταται στο ότι η ακτινωτή διάσπαση του γένους συνέπεσε με τη δημιουργία των εύκρατων λιβαδιών (~7-5 εκ. χρόνια πριν από σήμερα) και διευκολύνθηκε από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του γένους, (Corbet & Hill 1986, Yamada *et al.* 2002).

Στη μελέτη τους οι Alves *et al.* (2003) ανέλυσαν 17 είδη του γένους βάσει τμήματος της αλληλουχίας του κυτοχρώματος *b* (mtDNA) και του εξονίου του γονιδίου της τρανσφερίνης (πυρηνικό DNA). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, αρκετά είδη δεν είναι μονοφυλετικά. Επιπλέον, ενώ κάποια Ευρωπαϊκά είδη μπορούν να διακριθούν βάσει του mtDNA, είναι αδύνατο να διαχωριστούν βάσει των πυρηνικών τμημάτων του γονιδιώματος, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση της μεταξύ των ειδών διείσδυσης του γονιδιώματος (introgression) (Thulin *et al.* 1997, Alves *et al.* 2003). Υπάρχουν επομένως σημαντικές ενδείξεις των στενών σχέσεων που διέπουν αρκετά Ευρωπαϊκά είδη και κυρίως του ότι η γενετική τους ακεραιότητα εξαρτάται σε έναν μεγάλο βαθμό από διαφορές στη συμπεριφορά τους, καθώς και στις οικολογικές τους προτιμήσεις, μηχανισμοί οι οποίοι δημιουργούν ένα είδος απομόνωσης (Robinson & Matthee 2005).

Αν και η μονοφυλετικότητα των 11 αρτίγων γενών της οικογένειας Leporidae είναι αδιαμφισβήτητη, η συστηματική των λαγόμορφων αντιμετωπίζει μεγάλα προβλήματα με τα πολυτυπικά γένη της οικογένειας Leporidae και ιδιαίτερα με το γένος *Lepus*. Τα περισσότερα από αυτά οφείλονται αφενός στην εκτεταμένη ενδοειδική ποικιλότητα, που παρατηρείται στα είδη του γένους με μεγάλο εύρος κατανομής και αφετέρου στην ανεπάρκεια των φυλογενετικών αναλύσεων των μοριακών δεδομένων. Τα σημερινά δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η αρχική διασπορά της οικογένειας έγινε από τη Βόρειο Αμερική προς την Ασία (Matthee *et al.* 2004). Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών της Νοτίου Αφρικής παραμένουν αδιευκρίνιστες, αν και τα είδη αυτά έχουν διαφοροποιηθεί αρκετά νωρίς στην εξελικτική ιστορία της οικογένειας. Τέλος, βάσει των φυλογενετικών αναλύσεων, το είδος *L. timidus* συνδέεται εξελικτικά με τα πιο πρόσφατα ανερχόμενα Ευρασιατικά τάξα, και τα είδη της Κίνας είναι πολύ συγγενικά με αυτό (Yu 2004). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται ακόμα περισσότερο από παρατηρήσεις για την ιστορική (φυσική) κατανομή του είδους *L. europaeus*, η οποία εκτεινόταν ανατολικά μόνο μέχρι τα Ουράλια Όρη (Corbet & Hill 1986), ενώ η επακόλουθη προς ανατολή επέκτασή του είναι πρόσφατη και σχετίζεται με

μετατοπίσεις και με τη διάνοιξη των υπερσιβηρικών σιδηροδρομικών γραμμών (Thenius 1980).

Σύμφωνα με τους Matthee *et al.* (2004) η δια-ηπειρωτική διασπορά του κοινού προγόνου των Ευρωπαϊκών, Αφρικανικών και Ασιατικών λαγών έγινε πριν από 5 εκ. χρόνια, ξεκινώντας από τη Βόρεια Αμερική μέσω του Βερίγγειου πορθμού προς την Ευρασία, δίνοντας γένεση σε μια γενεαλογική γραμμή που περιλαμβάνει τα αρτίγονα Νοτιοαφρικανικά είδη (*L. saxatilis* και *L. capensis*). Πιθανό είναι επίσης το γεγονός να πραγματοποιήθηκε και μια ακόμα «εισβολή» από τα αποθέματα της Βορείου Αμερικής στα 3 εκ. χρόνια πριν από σήμερα (Matthee *et al.* 2004). Η εισβολή αυτή έδωσε γένεση στα είδη *L. timidus*, του οποίου η σημερινή κατανομή καλύπτει το μεγαλύτερο τμήμα της Ευρασιατικής περιοχής και *L. europaeus* στις πεδινές περιοχές της Ευρώπης. Οι διαδοχικές Παγετώδεις και Μεσοπαγετώδεις περιόδους και η επακόλουθη επέκταση των πληθυσμών (με επακόλουθη απομόνωση μικρών τμημάτων τους) υποβοήθησε την αλλοπάτρια ειδογένεση στις περιοχές των «καταφυγίων» της νότιας Ιβηρικής χερσονήσου, της Ιταλίας και της Βαλκανικής (Hewitt 1996, Pierpaoli *et al.* 1999) και πιθανώς και άλλων περιοχών της Ευρώπης και της Ασίας. Οι μετακινήσεις αυτές είχαν ως αποτέλεσμα την ομαδοποίηση των πιο στενά συγγενικών ειδών εντός του *L. europaeus* και του *L. timidus sensu lato*. Στη συνέχεια φαίνεται πολύ πιθανή η υπόθεση μιας πιο πρόσφατης δευτερογενούς μετακίνησης από την Ευρασία μέσω του Βερίγγειου πορθμού προς τη Βόρεια Αμερική, στην οποία εμπλέκεται το είδος *L. timidus* περίπου στα 1,98 εκ. χρόνια πριν από σήμερα η οποία έδωσε γένεση στα είδη: *L. arcticus* (Γροιλανδία), *L. othus* (Αλάσκα) και *L. townsendii* (Καναδάς, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής).

Ενώ λοιπόν, η γνώση μας γύρω από την εξέλιξη των λαγόμορφων έχει αυξηθεί σημαντικά με τη χρήση μοριακών δεδομένων, ωστόσο απαιτούνται πολλά ακόμα να γίνουν για την πλήρη κατανόησή αυτής. Λαμβάνοντας υπόψη τις δυσκολίες που εμπεριέχονται στην αποκόμιση αντιπροσωπευτικών γεωγραφικά δειγμάτων από τις διάφορες περιοχές, ίσως οι μεγαλύτερες επιδιώξεις μπορούν να αναμένονται από την ανάλυση μουσειακών δειγμάτων από όλο τον κόσμο (Robinson & Matthee 2005).

1.5 Το είδος *Lepus europaeus* Pallas 1778

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

Τα παλαιότερα αξιόπιστα ευρήματα του είδους χρονολογούνται από το κατώτερο έως το μέσο Πλειστόκαινο στην περιοχή του Καυκάσου (Averianov & Baryschnikov 1992, cf. Averianov *et al.* 2003). Κατά τη διάρκεια του ανώτερου Πλειστοκαίνου, ο Ευρωπαϊκός λαγός είχε ήδη εξαπλωθεί σε εκτεταμένες γεωγραφικές περιοχές (Ben Slimen *et al.* 2005). Τα

απολιθώματα που έχουν βρεθεί στην Ιβηρική χερσόνησο μέχρι το μέσο Πλειστόκαινο (1-0,5 εκ. χρόνια πριν από σήμερα) αφορούν μόνο απολιθώματα του είδους *L. granatensis*, υποδεικνύοντας την σχετικά πρόσφατη εισβολή του *L. europaeus* στην περιοχή της Ιβηρικής χερσονήσου από περιοχές της κεντρικής Ευρώπης μέσω των Πυρηναίων (Lopez-Martinez 1977).

Πληθυσμοί λαγού κατά τους ιστορικούς χρόνους

Διάφορα οστά, που ανήκουν στο είδος του Ευρωπαϊκού λαγού, ανακαλύφθηκαν μεταξύ άλλων υπολειμμάτων τροφής σε αρχαιολογικές θέσεις σε περιοχές της κεντρικής (πρώιμη εποχή του Χαλκού) και της Βορειοανατολικής (εποχή του Σιδήρου) Ανατολίας (Howell-Meurs 2001). Τέτοιου είδους ευρήματα αποτελούν ενδείξεις ότι οι λαγοί αποτέλεσαν βασικό και διαχρονικό στοιχείο, που συνέβαλε στην επιβίωση και την οικονομία των ανθρώπων από τους προϊστορικούς χρόνους έως σήμερα (Suchentrunk *et al.* 2006).

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Είναι ένα ζώο με μέσο βάρος 3,8 Kg (3-5 Kg) και σχετικά ομοιόμορφη εμφάνιση. Το τρίχωμά του είναι μακρύ και σγουρό στην περιοχή της ράχης, με καφέ-κίτρινο χρώμα στο στήθος και πλευρικά, το οποίο γίνεται σκουρότερο στην περιοχή της ράχης ενώ ασπρίζει στην περιοχή της κοιλιάς. Η ουρά τους είναι μεγάλη και εμφανής, μαύρη στην κορυφή και άσπρη στην κάτω μεριά της. Οι άκρες των αυτιών τους διαθέτουν τριγωνικό μαύρου χρώματος κομμάτι στην πίσω πλευρά τους, που έρχεται σε αντίθεση με το απαλότερο γκριζό χρωματισμό του υπόλοιπου αυτιού τους (Flux & Angermann 1990).

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

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

Κατανομή

Η φυσική κατανομή του Ευρωπαϊκού λαγού καλύπτει το μεγαλύτερο τμήμα της Ευρώπης (**Εικόνα 2**). Ωστόσο, εξαιτίας της σημαντικότητάς του ως θηρεύσιμο είδος (game animal), έχουν παρατηρηθεί επιτυχημένες εισαγωγές πληθυσμών του σε περιοχές της ανατολικής Σιβηρίας, του Καναδά, σε βορειοανατολικές περιοχές των Η.Π.Α., στο μεγαλύτερο τμήμα της Νότιας Αμερικής, στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Μικροί πληθυσμοί επίσης έχουν εισαχθεί σε αρκετά νησιά της Βόρειας Θάλασσας, στα νησιά Barbados, Réunion καθώς και στα νησιά Falkland (Flux & Angermann 1990). Στις περιοχές εκείνες, όπου ο Ευρωπαϊκός λαγός αποτελεί μοναδικό αντιπρόσωπο του γένους (Χιλή, Αργεντινή, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία), τα ενδιαιτήματα στα οποία ζει ποικίλλουν σημαντικά (Flux & Angermann 1990).

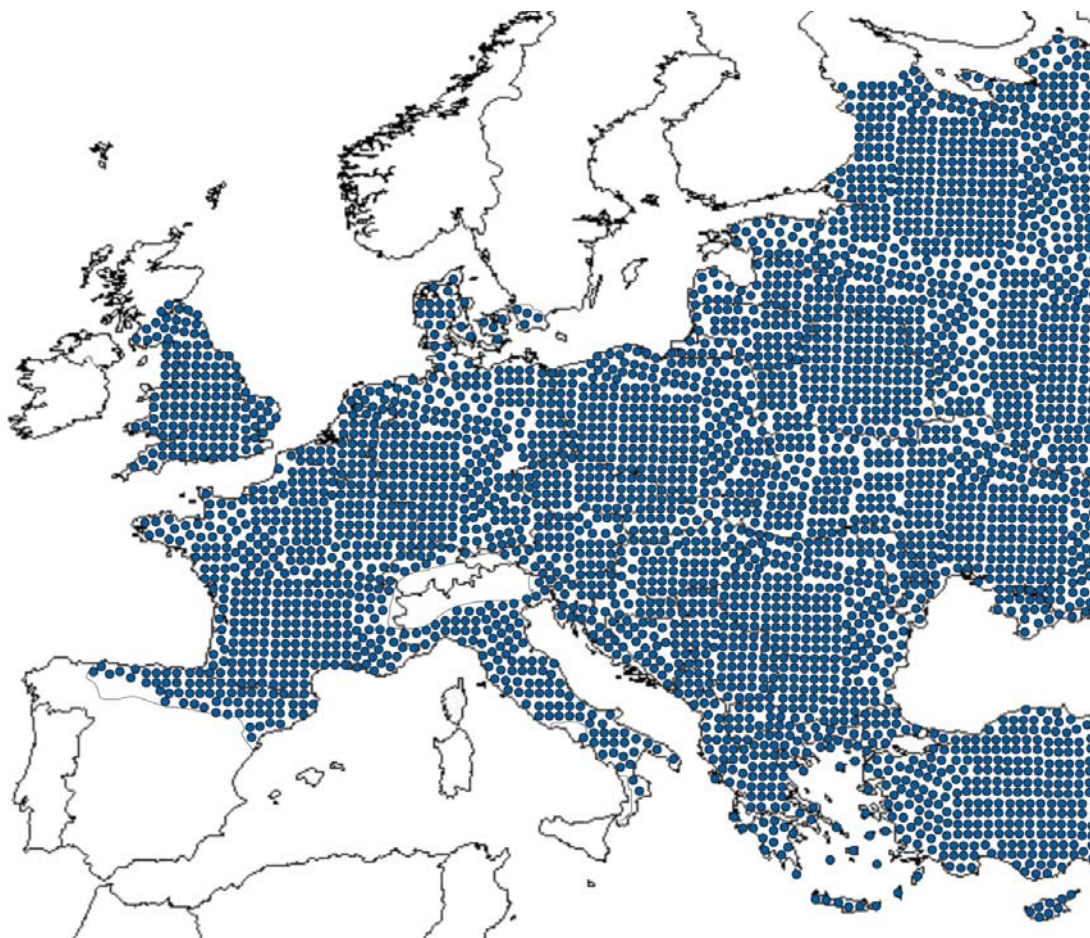
Ο Ευρωπαϊκός λαγός είναι το μοναδικό είδος λαγού που υπάρχει στα Βαλκάνια και τη Μικρά Ασία και αποτελεί κύριο στοιχείο της πανίδας των ανοικτών δασικών και αγροτικών περιοχών, φτάνοντας σε υψόμετρο άνω των 1500m (Mitchell-Jones *et al.* 1999). Στην Ελλάδα, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 1**, έχουν περιγραφεί έως σήμερα εννέα υποείδη του *L. europaeus*. Ο καθορισμός τους έγινε βάσει διαφόρων μορφολογικών χαρακτήρων, όπως το χρώμα του τριχώματός τους, το μέγεθος του σώματός τους, διαφόρων εξωτερικών μετρήσεων, καθώς και χαρακτηριστικών του κρανίου και των δοντιών τους (Hilzheimer 1906, 1908, Miller 1912, De Beaux 1929, Chaworth-Musters 1932, Von Wettstein 1943, Zimmermann *et al.* 1953, Ondrias 1965, Kattinger 1972, De Beaufort 1991).

Ωστόσο οι περιγραφές των υποειδών αυτών είναι αρκετά γενικές και ακαθόριστες, ενώ επιπλέον απουσιάζουν περιεκτικές μελέτες προσδιορισμού της εξελικτικής θέσης των λαγών αυτών, της ταξινομικής τους κατάστασης και του πιθανού εύρους κατανομής τους (Suchentrunk *et al.* 2003).

Μετατοπίσεις πληθυσμών του είδους στην Ευρώπη

Στην Ευρώπη έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μετατοπίσεις πληθυσμών, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του προηγούμενου αιώνα με κύρια κατεύθυνση από χώρες της Ανατολικής προς χώρες της Δυτικής Ευρώπης. Στόχος των μετατοπίσεων αυτών ήταν η αύξηση του αριθμού των ατόμων των τοπικών αποθεμάτων ή απλώς η αύξηση της κυνηγετικής κάρπωσης λίγο μετά τις απελευθερώσεις. Η απελευθέρωση μεγάλου αριθμού λαγών από τους σταθμούς εκτροφής πιθανόν να οδήγησε στην απώλεια πολλών τοπικών μορφών στη Γαλλία, τη Δανία και την Ιταλία (Flux & Angermann 1990).

Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα, υπάρχουν ενδείξεις μετατοπίσεων πληθυσμών κατά τη διάρκεια των ιστορικών χρόνων, γεγονός που δεν μπορεί να αποκλειστεί και για τους προϊστορικούς χρόνους. Αρχαίες μετατοπίσεις ίσως να πραγματοποιήθηκαν με στόχο το



Εικόνα 2: Χάρτης κατανομής του είδους *Lepus europaeus* (Mitchell-Jones *et al.* 1999).

κυνήγι σε περιοχές από τις οποίες οι λαγοί απουσίαζαν και οι οποίες εποίκιστηκαν από νέους έποικους και/ή από ναυτικούς της εποχής ή να σχετίζονται με μύθους και θρησκευτικές πεποιθήσεις της εποχής. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι οι λαγοί υπήρξαν ανέκαθεν σύμβολο γονιμότητας, θα μπορούσε να αποτελεί έναν ακόμα λόγο για τον οποίο οι αρχαίοι πληθυσμοί του ανθρώπου μετέφεραν μαζί τους λαγούς στις μεταναστευτικές τους δραστηριότητες. Για παράδειγμα, κάποιοι μεσολιθικοί πληθυσμοί ή ίσως οι Κέλτες, ήταν αυτοί που μετέφεραν λαγούς στα Βρετανικά νησιά πριν από τους Ρωμαίους, οι οποίοι τους εξέτρεφαν στα λεγόμενα “*Ieroqaria*” (Blaxter 1975). Άλλωστε, το ιστορικό εισαγωγής του Ευρωπαϊκού λαγού στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία κατά το δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα, υποδηλώνει ότι η μεταφορά ζωντανών λαγών μέσα στα πλοία για μεγάλες αποστάσεις και επομένως για μεγάλο χρονικό διάστημα, δεν αντιμετωπίζει ιδιαίτερες δυσκολίες (Flux 1990).

Οι πληθυσμοί του είδους που απαντώνται στη Βρετανία, δεν είναι βέβαιο αν εποίκησαν φυσικά την περιοχή μέσω της χερσαίας σύνδεσής της με την σημερινή βορειοδυτική Ευρώπη (μέχρι πριν από 8.000 χρόνια πριν από σήμερα) (cf. e.g. (Jones & Keen 1993)) ή μεταφέρθηκαν εκεί αργότερα. Το είδος αυτό απουσίαζε επίσης και από τις περιοχές της νότιας Σουηδίας, όπου εισήχθη από τον άνθρωπο κατά τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Από τα παραπάνω είναι πολύ πιθανό ο Ευρωπαϊκός λαγός να μην εποίκησε την βόρεια ηπειρωτική Ευρώπη παρά μόνο μετά την άνοδο της στάθμης της θάλασσας, γεγονός το οποίο απομόνωσε σχεδόν ταυτόχρονα τη νότια Σκανδιναβία και τη Βρετανία (εξαιτίας της εισχώρησης της Βόρειας θάλασσας) από την υπόλοιπη Ευρώπη (Suchentrunk *et al.* 2006).

Στην περιοχή της Μεσογείου, πληθυσμοί Ευρωπαϊκού λαγού παρουσιάζονται τόσο σε νησιά, τα οποία συνδέονταν στο παρελθόν με γέφυρες ξηράς με τις γειτονικές ως προς αυτά ηπειρωτικές περιοχές (κατά το Πλειστόκαινο), όσο και σε νησιά που δεν συνδέονταν (τουλάχιστον μετά την περίοδο εμφάνισης του είδους στην περιοχή). Απουσιάζουν από διάφορα νησιά της Μεσογείου, όπως η Σαρδηνία, η Σικελία, οι Βαλεαρίδες και η Μάλτα, ενώ εντοπίζονται σε πολλά νησιά του Αιγαίου, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζουν τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου, τα οποία συνδέονταν κατά τη διάρκεια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου μέσω γέφυρας ξηράς με τις γειτονικές ακτές της Ανατολίας, όταν η στάθμη της θάλασσας κατέβηκε κατά 120m. Συμπερασματικά, οι πληθυσμοί λαγού που παρατηρούνται στα νησιά αυτά (π.χ. Χίος, Λέσβος) είναι πολύ πιθανό να προήλθαν από πληθυσμούς της Ανατολίας, με την εποίκηση να έχει γίνει πριν από 15.000-10.000 χρόνια. Αντιθέτως, οι πληθυσμοί λαγού των νησιών, τα οποία δεν συνδέονταν μέσω Πλειστοκαινικών γεφυρών ξηράς με τις εγγύτερες προς αυτά ηπειρωτικές περιοχές, όπως η Κύπρος, η Κρήτη και η Ρόδος, φαίνεται να εισήχθησαν σε αυτά από τον άνθρωπο κατά τους αρχαίους χρόνους ή ακόμα πιο πρόσφατα (Suchentrunk *et al.* 2006).

Μέχρι σήμερα, η ανάλυση μοριακών δεικτών έχει βοηθήσει, σε αρκετές περιπτώσεις, στην αναγνώριση τέτοιων φαινομένων μετατόπισης πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα, τα

πρώτα αποτελέσματα της ανάλυσης τμήματος της περιοχής ελέγχου (D-loop) του mtDNA (Stamatis *et al.* υποβληθέντα δεδομένα από Suchentrunk *et al.* 2006) επιβεβαιώνουν την προηγούμενη μελέτη των Kasapidis *et al.* (2005) και την υπόθεση αυτών ότι οι λαγοί της Κύπρου χαρακτηρίζονται από απλοτύπους που εντοπίζονται στην περιοχή της Ανατολίας. Αναλυτικότερα, οι απλότυποι της Κύπρου συνδέονται εξελικτικά με τους λαγούς της κεντρικής Ανατολίας και όχι με αυτούς των ακτών της. Έκπληξη προκαλεί επίσης το γεγονός ότι οι λαγοί της Χίου, η οποία κατά το ανώτερο Πλειστόκαινο συνδεόταν με τις δυτικές ακτές της Ανατολίας, έχει απλότυπους οι οποίοι μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί μόνο σε λαγούς της νοτιοανατολικής Ανατολίας (περιοχή Saliurfa) (Suchentrunk *et al.* 2006).

Επιπρόσθετα, η αποκλειστική παρουσία «ανατολικών» απλοτύπων σε λαγούς της Ρόδου αποτελεί ένδειξη εισαγωγής ατόμων από την περιοχή της Ανατολίας, αφού βάσει της παλαιογεωγραφίας της περιοχής, η Ρόδος είχε ήδη απομονωθεί από την Ανατολία από το τέλος του Πλειοκαίνου, αρχές Πλειστοκαίνου (Dermitzakis 1990). Όσον αφορά την Κρήτη, η εύρεση στο νησί μόνο Ευρωπαϊκών απλοτύπων, και η απομόνωσή της πριν από περίπου 5-5,5 εκ. χρόνια (Dermitzakis & Papanikolaou 1981), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι πληθυσμοί του νησιού προέκυψαν από εισαγωγή ατόμων λαγού από περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας (Kasapidis *et al.* 2005, Suchentrunk *et al.* 2006).

Μετατοπίσεις πληθυσμών του Ευρωπαϊκού λαγού έχουν επίσης παρατηρηθεί σε διάφορες περιοχές της Ιταλίας, με βάση αποτελέσματα από την ανάλυση τμήματος αλληλουχιών της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA (Pierpaoli *et al.* 1999). Τα άτομα που εισήχθησαν στις περιοχές αυτές είχαν όμοιους ή πολύ συγγενικούς απλότυπους με αυτούς των ατόμων της κεντρικής και ανατολικής Ευρώπης. Επιπλέον, στη μελέτη των Mamuris *et al.* (2001) ήταν δυνατός ο διαχωρισμός αυτόχθονων πληθυσμών λαγού της Ελλάδας από εκτρεφόμενα άτομα λαγού, βάσει του μιτοχονδριακού τους DNA. Η παρουσία ωστόσο των ίδιων απλοτύπων σε δύο διαφορετικούς σταθμούς εκτροφής, είναι ενδεικτική της ανακύκλωσης των εισαγόμενων αναπαραγωγικών γραμμών στην Ελλάδα.

Τέλος, οι Stamatis *et al.* (2007) χρησιμοποιώντας το ίδιο διαγνωστικό σύστημα με αυτό των Mamuris *et al.* (2001) ήταν σε θέση να εντοπίσουν την προέλευση των απελευθερωμένων εκτρεφόμενων ατόμων λαγού, ενώ έδειξαν για πρώτη φορά ότι κάποια άτομα που προέρχονται από απελευθέρωση είχαν επιβιώσει τουλάχιστον για ένα αναπαραγωγικό κύκλο και είχαν κληροδοτήσει το γονιδίωμά τους στην επόμενη γενιά.

Οικολογικές παράμετροι

Οι λαγοί του υπό μελέτη είδους ζουν από το επίπεδο της θάλασσας έως και σε αρκετά μεγάλο υψόμετρο (άνω των 1500m στις Άλπεις και ακόμα μεγαλύτερο στα Πυρηναία) (Macdonald & Barret 1995). Οι τροφικές τους συνήθειες ποικίλλουν και εξαρτώνται από τον τύπο του περιβάλλοντος στο οποίο διαβιούν. Στην Ευρώπη, η διατροφή

τους συνίσταται κατά 90% από ποώδη φυτά, 5,5% από ξυλώδη φυτά, 2,2% από ρίζες σπαρτών, 1,7% από σπόρους των σπαρτών και 0,5% από φυτά δασικών περιοχών (Zorner 1977). Το εύρος της χωροκράτειάς τους ποικίλλει από 38ha (16-78 ha) στην Αγγλία (Tapper & Barnes 1986) έως 53ha στη Νέα Ζηλανδία (Parkes 1989) και 330ha στην Πολωνία (Pielowski 1972). Σύμφωνα με μελέτες που βασίζονται σε ραδιοπομπούς, το εύρος της χωροκράτειας του Ευρωπαϊκού λαγού κυμαίνεται από 200 έως 340ha (Homolka 1985). Η πληθυσμιακή πυκνότητα του είδους στην Ολλανδία φτάνει κατά μέσο όρο τα 0,25 άτομα/ha με τη μέγιστη τιμή της να παρατηρείται στους μεγάλους ανοιχτούς χώρους και να φτάνει τα 2,4 άτομα/ha (Broekhuizen 1976). Στην Πολωνία, οι πιο πυκνοκατοικημένες από τους λαγούς περιοχές φτάνουν τα 0,5 άτομα/ha (24-31 άτομα/ha, Wasilewski 1991), ενώ οι υπόλοιπες τα 0,1-0,3 άτομα/ha (Pielowski 1976). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, η πυκνότητα φτάνει τον 1 λαγό ανά 2-4ha (Macdonald & Barret 1995), ενώ στη Γαλλία τα 23-71 άτομα/100ha (Pepin 1987) και στη Βόρειο Ιταλία τα 38-53 άτομα/100ha (Meriggi & Verrì 1990). Οι μεγαλύτερη τιμή έχει παρατηρηθεί σε ένα νησί της Δανίας, η έκταση του οποίου είναι 100ha όπου η πυκνότητά τους φτάνει τους 3,4 λαγούς/ha (Abildgård *et al.* 1972). Όσον αφορά τον Ελλαδικό χώρο οι τιμές αυτές είναι πολύ χαμηλότερες. Μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας, είναι ενδεικτικές ότι η πληθυσμιακή πυκνότητα των λαγών της περιοχής δεν ξεπερνά τα 5 άτομα/100ha με μέσο όρο τα 2 άτομα/100ha (Sfougaris *et al.* μη δημοσιευμένα δεδομένα).

Συμπεριφορά

Είναι ζώο μοναχικό και κυρίως νυκτόβιο. Έχει μεγάλη δυνατότητα ημερήσιας μετακίνησης, αφού μπορεί να διανύσει μια απόσταση 15Km προκειμένου να βρει τροφή (Flux 1967). Σε περιοχές μεγάλου γεωγραφικού πλάτους, η τροφοληψία, που είναι μια διαδικασία που καλύπτει περίπου το 1/3 της ζωής του, αρχίζει αργά το απόγευμα ή τη νύχτα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά τη διάρκεια συλλογής της τροφής τους, τα ζώα δημιουργούν μικρές ομάδες. Αυτό τους δίνει το πλεονέκτημα μικρότερης κατανάλωσης χρόνου ανά άτομο στην προσπάθεια προστασίας από τους θηρευτές τους (Macdonald & Barret 1995). Επιπρόσθετα, ο λαγός πριν την είσοδό του στην κρυψώνα του όπου θα παραμείνει κατά τη διάρκεια της ημέρας, επαναλαμβάνει τις διαδρομές που έκανε κατά τη διάρκεια της νύχτας, έτσι ώστε να μπερδέψει τους θηρευτές του (Flux 1981).

Αναπαραγωγή

Ο Ευρωπαϊκός λαγός αναπαράγεται σχεδόν ολόκληρο το χρόνο, αν και για τους περισσότερους, η αναπαραγωγική περίοδος θεωρείται ότι αρχίζει το χειμερινό ηλιοστάσιο. Η αναπαραγωγική συμπεριφορά του είδους κορυφώνεται κατά την περίοδο της άνοιξης (Mad March hares) με συνήθη την εικόνα συνάθροισης περίπου 12 αρσενικών λαγών γύρω από ένα

θηλυκό άτομο που βρίσκεται σε οίστρο (Schneider 1978, Macdonald & Barret 1995). Η επικοινωνία μεταξύ των ατόμων γίνεται με κραυγές σε κατάσταση καταπόνησης, ενώ μια ιδιαίτερη οσμή παράγεται στην έξοδο του πεπτικού συστήματος, στη βουβωνική χώρα (πιο έντονη στα θηλυκά άτομα) και στους σιελογόνους (submandibular) αδένες, που δίνει τη χαρακτηριστική οσμή των λαγών (Macdonald & Barret 1995).

Γεννούν 6-10 μικρά με διάρκεια κυοφορίας περίπου 41-42 ημέρες (Flux & Angermann 1990, Macdonald & Barret 1995). Τα νεογνά γεννιούνται πάνω στο έδαφος με πλήρες τρίχωμα και με ανοιχτά μάτια (Macdonald & Barret 1995). Το ζώο αποκτά το μέγεθος του ενήλικου ατόμου στην ηλικία των 5 μηνών, με τα αρσενικά άτομα να ωριμάζουν αναπαραγωγικά από τον 6^ο μήνα της ζωής τους, ενώ τα θηλυκά άτομα από τον 7^ο-8^ο μήνα. Περισσότερα στοιχεία για τον αναπαραγωγικό κύκλο του είδους παρατίθενται σε επόμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο II).

Βιωσιμότητα

Το μέγιστο όριο ηλικίας που έχει παρατηρηθεί φτάνει τα 13 χρόνια (Flux & Angermann 1990, Macdonald & Barret 1995). Ωστόσο α) η έντονη θνησιμότητα των νεογνών από τους θηρευτές και ιδιαίτερα από τις αλεπούδες (οι οποίες αντικαθίστανται από τις ζουρίδες για την περιοχή της Κρήτης), β) οι πολυάριθμοι γεωργικοί κίνδυνοι (γεωργικά μηχανήματα, φυτοφάρμακα, εντατικοποίηση της γεωργίας, εγκατάλειψη της μικτής γεωργίας και δημιουργία μονοκαλλιεργειών), γ) η απώλεια της ποικιλότητας των ενδιαιτημάτων στις αγροτικές περιοχές, δ) η παράνομη θανάτωση των λαγών (φαινόμενο πολύ έντονο στην Κρήτη), ε) ο εμβολιασμός κατά της λύσσας και η επακόλουθη αύξηση των πληθυσμών των αλεπούδων, στ) τα ατυχήματα στους δρόμους από τα διερχόμενα οχήματα και ζ) οι ασθένειες (κοκκιδίαση, αιμορραγική νόσος (EBHS) και yersiniosis) έχουν τόσο άμεσες όσο και έμμεσες επιδράσεις στη βιωσιμότητα των λαγών (Macdonald & Barret 1995, Marboutin & Peroux 1995, Edwards *et al.* 2000). Αντιθέτως, το κυνήγι δεν συμπεριλαμβάνεται στις αιτίες μείωσης του πληθυσμού, εφόσον αποτελεί δραστηριότητα που διέπεται από κανονισμούς με σκοπό την προσέγγιση της μέγιστης αειφορικής κάρπωσης χωρίς να θέτουν τους πληθυσμούς σε κίνδυνο.

Ο Ευρωπαϊκός λαγός αποτελεί ίσως το πιο σημαντικό θηρεύσιμο είδος της Ευρώπης με τον αριθμό θηρευθέντων ατόμων να φτάνει τα 5 εκατομμύρια ανά έτος. Αν και δεν θεωρείται ότι απειλείται, η μείωση που παρατηρείται στους πληθυσμούς του είδους στην Ευρώπη προκαλεί έντονη ανησυχία. Η σοβαρότερη απειλή για το είδος είναι η ολική απώλεια τοπικών πληθυσμών, όπως αυτοί της Γαλλίας και της Δανίας, εξαιτίας κυρίως των μαζικών εισαγωγών από την Ουγγαρία και την Ανατολική Ευρώπη. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η κατάσταση πολλών τοπικών πληθυσμών και υποειδών χρήζει εκτεταμένης και εμπειριστατωμένης έρευνας (Flux & Angermann 1990).

2. Μεταναστευτικές οδοί εποίκισης της Ευρώπης κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους

Παλαιοκλιματολογικά δεδομένα μαρτυρούν σημαντικές κλιματικές μεταβολές του πλανήτη μας, που χαρακτηρίζονται από περιοδικές Παγετώδεις περιόδους (με περίοδο 41 και 100 χιλιάδων χρόνων), οι οποίες γίνονται σφοδρότερες τα τελευταία 2,4 εκ. χρόνια (Τεταρτογενές). Οι έντονες αυτές κλιματικές αλλαγές είχαν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των κατανομών των ειδών τόσο στην Ευρώπη, όσο και στη Βόρειο Αμερική, όπως καταγράφεται άλλωστε και στο αρχείο των απολιθωμάτων. Σύμφωνα με τις έως σήμερα γνώσεις μας, αρκετά είδη εξαφανίστηκαν από μεγάλα τμήματα του εύρους κατανομής τους, άλλα εποίκισαν νέες περιοχές, ενώ κάποια επιβίωσαν σε περιοχές καταφύγια και στη συνέχεια επέκτειναν ξανά την κατανομή τους. Τέτοιου είδους γεγονότα επαναλήφθηκαν αρκετές φορές στη διάρκεια του γεωλογικού χρόνου. Είναι προφανές ότι αυτές οι έντονες κλιματικές μεταβολές εκδηλώθηκαν με εντελώς διαφορετικό τρόπο στα διάφορα μέρη του πλανήτη και αυτό εξαιτίας της ποικιλίας στη γεωμορφολογία των χερσαίων εκτάσεων, των ωκεάνιων ρευμάτων, αλλά και του γεωγραφικού πλάτους. Παράλληλα κάθε είδος οργανισμού αποκρίθηκε με διαφορετικό τρόπο στις κλιματικές μεταβολές και οι αλλαγές στο εύρος κατανομής του επηρεάστηκαν από την γεωγραφία και το κλίμα των περιοχών, στις οποίες διαβιούσε κατά τις περιόδους αυτές (Hewitt 2000).

Συνεπώς, το συνεχώς μεταβαλλόμενο κλίμα του πλανήτη μας έχει άμεση επίδραση στους οργανισμούς που ζουν πάνω σε αυτόν με όλες τις διαδικασίες που προαναφέρθηκαν να ενέχουν γενετικές αλλαγές (Hewitt 1993). Η προσαρμογή και επομένως η αναπαραγωγική επιβίωση επιτυγχάνεται μέσω της φυσικής επιλογής γονοτύπων, οι οποίοι δημιουργούνται από τις δυνάμεις της μεταλλαγής και του ανασυνδυασμού και διαχέονται (εξαπλώνονται στο χώρο) μέσω της γονιδιακής ροής. Τα μέσα μετανάστευσης (διασποράς) ενός οργανισμού, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η γονιδιακή ροή και επιτρέπεται η προσέγγιση νέων περιοχών κατάλληλων για την επιβίωσή του, είναι στο μεγαλύτερο τμήμα τους γενετικά προκαθορισμένα και συνάμα προϊόν σημαντικής πορείας της εξέλιξης από την αρχαία έως τη σύγχρονη εποχή. Σε περίπτωση αποτυχίας των διαδικασιών που προαναφέρθηκαν, ο πληθυσμός πεθαίνει με αποτέλεσμα να χάνονται μαζί και οι μοναδικοί απλότυποι, που αυτός φέρει, μεταβάλλοντας έτσι τη γενετική δομή και δυναμική των τοπικών μεταπληθυσμών και του είδους συνολικά. Οι τομείς της γενετικής και της παλαιοκλιματολογίας έχουν σημειώσει αλματώδη πρόοδο τα τελευταία χρόνια, παρέχοντας μεγάλο όγκο πληροφοριών όσον αφορά στη γενετική δομή των πληθυσμών και των ειδών, καθώς και των λεπτομερών προτύπων του κλίματος για περιόδους του παρελθόντος. Ο συνδυασμός των δύο αυτών επιστημονικών τομέων, συνεισφέρει στην καλύτερη γνώση των επιδράσεων των κλιματικών αλλαγών στην εξέλιξη των οργανισμών, ιδιαίτερα κατά τα τελευταία 3 εκατομμύρια χρόνια (Hewitt & Nichols 2005).

Οι Παγετώδεις περίοδοι και η επίδρασή τους στα Ευρωπαϊκά είδη

Η Ευρώπη συνιστά μια ιδιαίτερη βιογεωγραφικά περιοχή. Αποτελεί ουσιαστικά μια μεγάλη χερσόνησο με κατεύθυνση από ανατολή προς δύση που συνδέεται με την Ασία. Στο νότιο τμήμα της, η Μεσόγειος θάλασσα συνιστά ένα ισχυρό φράγμα, που μειώνει την πιθανότητα της εκ του νότου αντικατάστασης των οργανισμών κατά τα διάρκεια των κρύων περιόδων, ενώ η από ανατολή προς δύση κατεύθυνση των κύριων ορεινών όγκων των Άλπεων και των Πυρηναίων δρα ως φράγμα στην προς τον βορρά επέκταση των ειδών κατά τη διάρκεια των θερμών περιόδων (Taberlet *et al.* 1998).

Αρκετά από τα καταφύγια της Ευρώπης εντοπίζονται στους ορεινούς όγκους των νότιων περιοχών της, η συνεισφορά των οποίων ενδέχεται να ήταν εξίσου σημαντική τόσο κατά τη διάρκεια των θερμών, όσο και κατά τη διάρκεια των ψυχρών περιόδων στη μακρόχρονη παρουσία των ειδών στην Ευρώπη (Bennett *et al.* 1991). Η σημαντικότητά τους γίνεται ιδιαίτερα αντιληπτή αν αναλογιστούμε ότι η εξαφάνιση ενός είδους από τα καταφύγια του νότου κατά τη διάρκεια των θερμών περιόδων θα μπορούσε να αποβεί μοιραία και να οδηγήσει στην ολοκληρωτική εξαφάνιση της ομάδας αυτής στην επόμενη ψυχρή περίοδο (Taberlet *et al.* 1998).

Το αρχείο των απολιθωμάτων αποκαλύπτει ότι στο αποκορύφωμα της τελευταίας Παγετώδους περιόδου, πριν από περίπου 20.000 χρόνια, τα περισσότερα εύκρατα είδη που σήμερα κατανέμονται στην βόρεια και κεντρική Ευρώπη, επιβίωσαν σε καταφύγια της νότιας Ευρώπης κοντά στη Μεσόγειο θάλασσα. Καθώς το κλίμα γινόταν ολοένα και πιο θερμό και οι πάγοι οπισθοχώρησαν, τα είδη αυτά άρχισαν να εποικούν τις βορειότερες περιοχές. Η εποίκηση αυτή έγινε με γρήγορους ρυθμούς, κυρίως από τους πληθυσμούς εκείνους που επιβίωσαν στα βορειότερα όρια των καταφυγίων και ιδιαίτερα από τα άτομα εκείνα που είχαν την ικανότητα να μετακινούνται, διανύοντας μεγάλες αποστάσεις (Hewitt 1989, 1993). Ένα τέτοιο πρότυπο επέκτασης (λεπτόκυρτη διασπορά με πολλαπλά φαινόμενα ιδρυτή) έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αλληλομόρφων και την ομοιογένεια περιοχών μεγάλης έκτασης (Ibrahim *et al.* 1996). Επακόλουθο ενός τέτοιου προτύπου διασποράς είναι η δυσκολία που αντιμετωπίζουν οι πληθυσμοί που βρίσκονται πίσω από το μέτωπο της μεταναστευτικής αυτής ομάδας να προωθηθούν. Έτσι η διάχυση των γονιδιωμάτων τους πραγματοποιείται με πολύ πιο αργούς ρυθμούς, με εξαίρεση τις περιπτώσεις εκείνες που χαρακτηρίζονται από κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα ως προς μια σημαντική μεταβολή του περιβάλλοντος (Hewitt 2001).

Στο συνεχώς μεταβαλλόμενο κλίμα των τελευταίων 2 εκατομμυρίων χρόνων (Πλειστόκαινο), οι ρόλοι των πληθυσμών ενός είδους ως μέτωπο εποίκησης ή τελικό τμήμα αυτού έχουν αναστραφεί πολλές φορές. Στις περιπτώσεις εκείνες, όπου η μετατόπιση του εύρους ενός είδους είναι μεγάλης κλίμακας, η κατανομή του είδους παύει να είναι συνεχής

ιδιαίτερα σε περιοχές μεγάλης έκτασης (όπως παρατηρούμε σε κάποια βόρεια είδη). Αντιθέτως, η μικρής κλίμακας μετακίνηση των ατόμων σε κύματα (μετακινήσεις φάλαγγας) έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της ακεραιότητας του είδους, καθώς επίσης και της γενετικής του ποικιλότητας (Hewitt 2000).

Η επαγόμενη από τους Παγετώνες μεταβολή του εύρους κατανομής των οργανισμών, είχε ως αποτέλεσμα η βόρεια Ευρώπη να χαρακτηρίζεται από λιγότερη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με τη νότια Ευρώπη, όσον αφορά στον αριθμό των ειδών, τις ενδοειδικές υποδιαιρέσεις και την αλληλική ποικιλότητα (“southern richness to northern purity” Hewitt 1999).

Αυτός ο πλούτος των νότιων περιοχών σε αντίθεση με τις βορειότερες είναι ένδειξη της ύπαρξης καταφυγίων στις περιοχές αυτές και της συσσώρευσης ποικιλότητας κατά τη διάρκεια πολλών περιόδων. Η τάχιστα εποίκιση μετά το τέλος της κάθε Παγετώδους περιόδου είναι πιθανώς υπεύθυνη για την μειωμένη ποικιλότητα των βορειότερων περιοχών (Hewitt 1989, 1996), ενώ οι χρόνοι απόκλισης των φυλογενετικών γραμμών στις περιοχές των καταφυγίων μαρτυρούν ότι κάποια είδη παρέμειναν εκεί καθόλη τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου (Hewitt 1999). Παράλληλα, αρκετοί ήταν οι οργανισμοί εκείνοι που αν και οι πληθυσμοί τους επιβίωσαν στα καταφύγια της νότιας Ευρώπης (Ιβηρική, Ιταλία, Ελλάδα και Τουρκία), δεν επεκτάθηκαν πέρα από αυτά την περίοδο του Ολόκαινου (αφού βορειότεροι ως προς αυτούς πληθυσμοί το έκαναν αυτό πρώτοι) (Hewitt 2001).

Συμπερασματικά, οι νότιες χερσόνησοι της Ιβηρικής, της Ιταλίας, των Βαλκανίων και της Ελλάδας υπήρξαν διακριτά καταφύγια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου για έναν μεγάλο αριθμό ειδών. Αρκετές είναι επίσης οι μελέτες εκείνες που φέρουν την Τουρκία να χαρακτηρίζεται από την παρουσία διακριτών γονοτύπων, γεγονός ενδεικτικό του ότι η περιοχή αυτή αποτέλεσε καταφύγιο για έναν μεγάλο αριθμό ειδών. Επιπλέον, άλλες μελέτες παρέχουν ένδειξη ύπαρξης διακριτών γονιδιωμάτων σε ακόμα πιο ανατολικές περιοχές όπως αυτές της Μαύρης Θάλασσας και της Κασπίας. Για την εξαγωγή, ωστόσο, ασφαλών συμπερασμάτων κρίνεται απαραίτητη η εκτεταμένη μελέτη των περιοχών αυτών (Hewitt 1999).

Τα καταφύγια των νότιων περιοχών έχουν συμβάλει το κάθε ένα με τον δικό του ξεχωριστό τρόπο στην μετά τους Παγετώνες εποίκιση της Ευρώπης. Σε πολλές περιπτώσεις, οι Άλπεις αποτέλεσαν πρωταρχικό εμπόδιο στην προς το βορρά επέκταση των Ιταλικών γονιδιωμάτων με αποτέλεσμα η Βόρεια Ευρώπη να εποίκιστηκε από τα υπόλοιπα καταφύγια. Αντιθέτως το φράγμα που πρόβαλλαν τα Πυρηναία δεν ήταν τόσο μεγάλης κλίμακας. Το γεγονός ότι τα Πυρηναία δεν φαίνεται να αποτέλεσαν τόσο μεγάλο εμπόδιο πιθανόν να οφείλεται και στο γεγονός ότι η εποίκιση από την Βαλκανική χερσόνησο πρόσθεσε ένα ακόμα εμπόδιο στην επέκταση των Ιταλικών γονιδιωμάτων, πριν αυτά καταφέρουν να φτάσουν στην περιοχή των Πυρηναίων. Η γενικότερη εικόνα παρουσιάζει ως κύρια πηγή του

μεγαλύτερου αριθμού ειδών της βόρειας Ευρώπης, τα καταφύγια της Βαλκανικής. Εξαίρεση σε αυτό αποτελούν οι περιπτώσεις εκείνες, όπου η εισβολή ειδών από ανατολικότερες περιοχές όπως τα νότια Καρπάθια, η Μαύρη Θάλασσα, ο Καύκασος ή η Κασπία είχε ως αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό των Ελληνικών και Τουρκικών αποθεμάτων (Hewitt 1999).

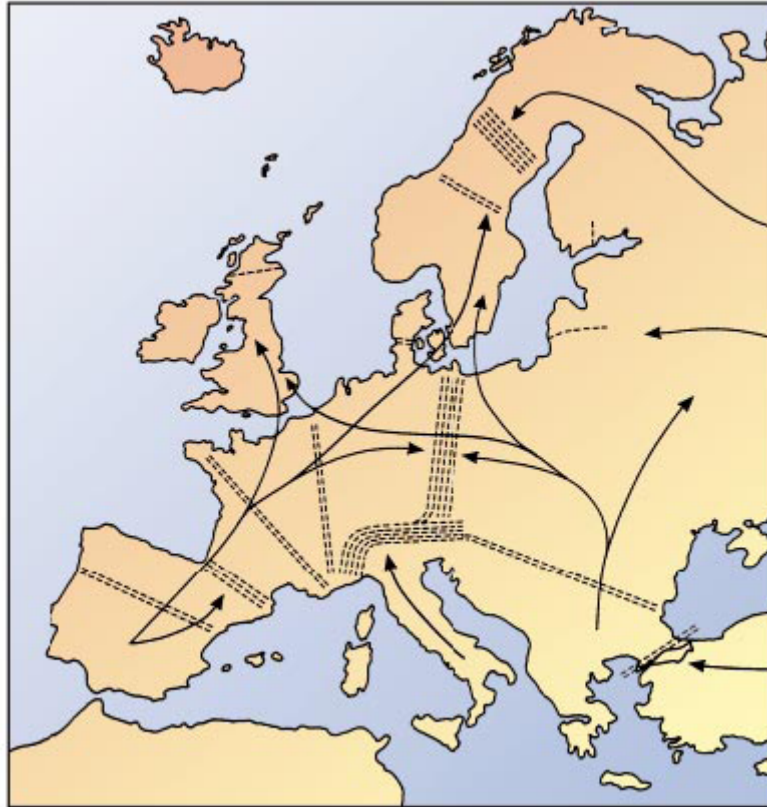
Γνωστά μεταναστευτικά πρότυπα της Ευρώπης

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί τρία μεταναστευτικά πρότυπα για την μετά τους Παγετώνες περίοδο. Ωστόσο τα πρότυπα αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά όλων των ειδών και επομένως υπάρχουν είδη, που οι μεταναστευτικοί τους δρόμοι διαφέρουν από αυτούς που γνωρίζουμε έως τώρα (Hewitt 1996).

Σύμφωνα με το πρώτο πρότυπο που βασίζεται στον τρόπο εποίκησης της ακρίδας, το μεγαλύτερο τμήμα της Ευρώπης εποικήθηκε από τα καταφύγια της Βαλκανικής χερσονήσου, ενώ οι πληθυσμοί της Ιβηρικής και της Ιταλικής χερσονήσου δεν μπόρεσαν να εξαπλωθούν βορειότερα εξαιτίας των φυσικών εμποδίων που συνάντησαν (Πυρηναία και Άλπεις αντίστοιχα). Σύμφωνα με το δεύτερο πρότυπο (πρότυπο του σκαντζόχοιρου) τρεις ομάδες γονιδιωμάτων αποτέλεσαν πηγή για το μεγαλύτερο τμήμα της Ευρώπης, οι οποίες ξεκίνησαν προς το βορρά από τα καταφύγια της Ιβηρικής, της Ιταλικής και της Βαλκανικής χερσονήσου. Η επέκταση των Ιταλικών αποθεμάτων πέρα από τις Άλπεις θα μπορούσε να οφείλεται στον πιο αργό μεταναστευτικό ρυθμό των αποθεμάτων των Βαλκανίων. Τέλος, το τρίτο πρότυπο εποίκησης, η εποίκηση της αρκούδας, ξεκίνησε από την Ιβηρική χερσόνησο και τα δυτικά Βαλκάνια (Hewitt 1999). Η μελέτη ωστόσο ενός μεγαλύτερου αριθμού ειδών είναι πολύ πιθανό να έχει ως αποτέλεσμα την περιγραφή και άλλων προτύπων ή ακόμα και τον συνδυασμό των ήδη υπαρχόντων, εμπλουτίζοντας τις έως σήμερα γνώσεις μας για τα μεταναστευτικά μονοπάτια της Ευρώπης και την ιδιαιτερότητα των περιοχών που αποτέλεσαν καταφύγια κατά τη διάρκεια των Παγετώνων (Hewitt 1999).

Ζώνες υβριδισμού

Ένα από τα βασικά αποτελέσματα των μεταναστεύσεων ήταν η δημιουργία ζωνών υβριδισμού στα σημεία συνάντησης των επεκτεινόμενων οργανισμών (γονιδιωμάτων). Στην Ευρώπη έχουν αναγνωριστεί πολλές ζώνες υβριδισμού, που εντοπίζονται από τα Πυρηναία έως τη Μαύρη Θάλασσα (**Εικόνα 3**). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι εντός των περιοχών της Ιβηρικής, της Ιταλικής και της Βαλκανικής χερσονήσου, υπάρχουν ενδείξεις τοπικών διαφοροποιημένων μορφών, ζωνών υβριδισμού και υποειδών, η μελέτη των οποίων θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση των διαδικασιών εκείνων που έλαβαν χώρα εντός των καταφυγίων της νότιας Ευρώπης (Hewitt 1999).



Εικόνα 3: Ήδη γνωστές ζώνες υβριδισμού της Ευρώπης (Hewitt 2000)

Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα είναι αρκετά ξεκάθαρο ότι οι ζώνες υβριδισμού των Άλπεων, καθώς και αυτή κατά μήκος των Πυρηναίων δεν υπήρχαν στις περιοχές αυτές κατά τη διάρκεια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου, αλλά δημιουργήθηκαν τα τελευταία 9.000 χρόνια (Hewitt 1985). Σύμφωνα με τον Remington (1968) η αδιευκρίνιστη εικόνα των ζωνών υβριδισμού στα Ουράλια Όρη και την κεντρική Ευρώπη οφείλεται στις ανθρώπινες δραστηριότητες (εντατική καλλιέργεια στις περιοχές αυτές). Υπό το φως των πιο πρόσφατων ενδείξεων οι περισσότερες από τις ζώνες υβριδισμού που προαναφέρθηκαν είναι αρκετά παλαιές, ενώ κάποιες από αυτές είναι στενές (Hewitt 1993). Η κάθε ζώνη υβριδισμού ακολουθεί ουσιαστικά το δικό της μονοπάτι, το οποίο είναι αποτέλεσμα των αρμοστικών οικολογικών θώκων που εμπεριέχει, των διαθέσιμων ενδαιτημάτων που φέρει και των κλιματολογικών μεταβολών που επέβαλαν τις αλλαγές στο εύρος των οργανισμών. Η ομαδοποίηση των ζωνών υβριδισμού οφείλεται στις ομοιότητες των καταφυγίων, στον ρυθμό με τον οποίο το κλίμα έγινε θερμότερο, καθώς και στα φράγματα επέκτασης των οργανισμών (Hewitt 1999).

Αναλογιζόμενοι τις επαναλαμβανόμενες Παγετώδεις περιόδους του Πλειστοκαίνου, και τις έντονες κλιματικές μεταβολές καθόλη τη διάρκεια του Τεταρτογενούς, συμπεραίνεται ότι τα Ευρωπαϊκά είδη έχουν υπομείνει αρκετές συρρικνώσεις και επεκτάσεις εντός και εκτός

των καταφυγίων του νότου. Σε ορισμένες εξαιρετικά αντίξοες περιόδους κάποια είδη θα μπορούσαν να εξαφανιστούν από μερικά ή ακόμα και από όλα τα καταφύγια της Ιβηρικής, της Ιταλίας και των Βαλκανίων. Στην περίπτωση αυτή, η Ευρώπη θα εποίκίζονταν από τα πιο απομακρυσμένα καταφύγια, όπως αυτά της Τουρκίας, της Μέσης Ανατολής και πιθανά της περιοχής της Κασπίας ή της Αφρικής (Hewitt 1999).

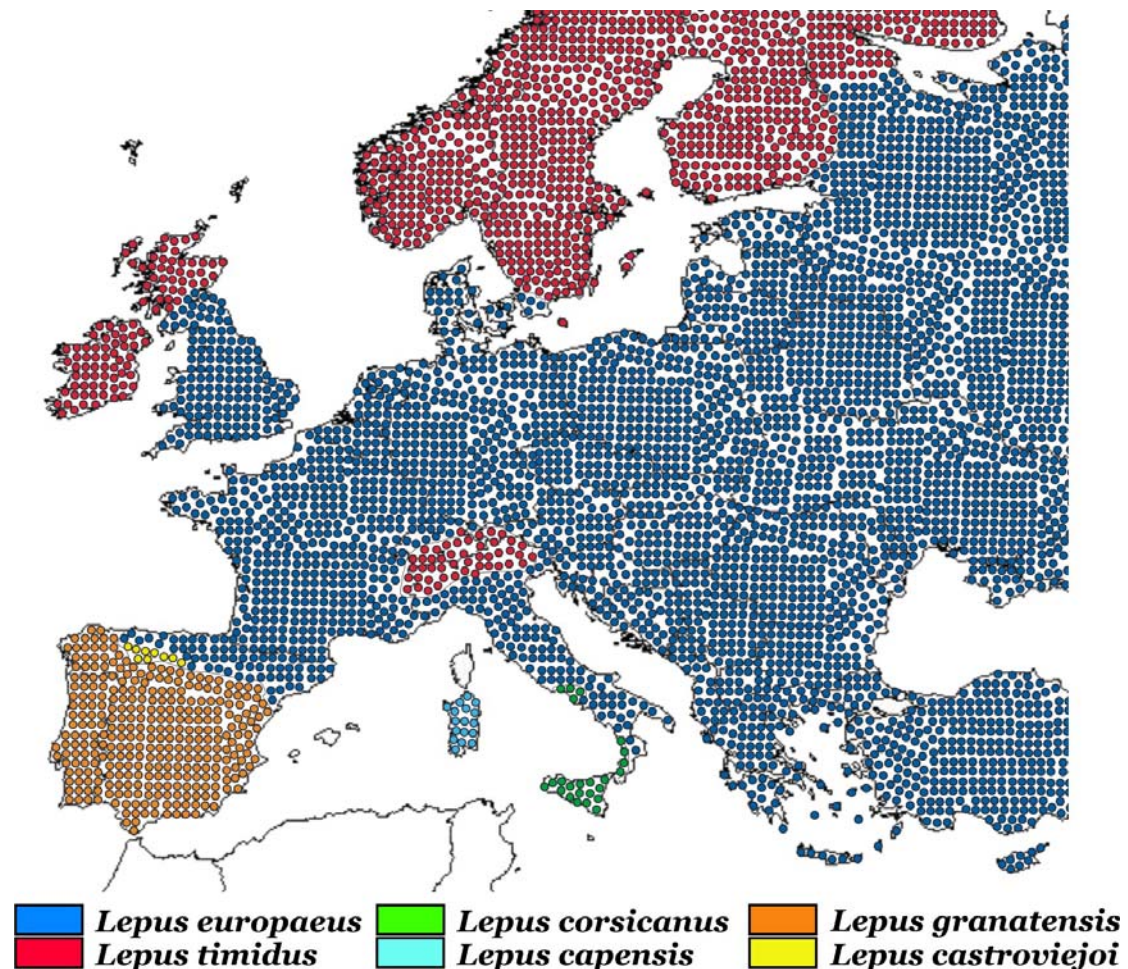
Γενετικοί δείκτες για τη μελέτη εξέλιξης των πληθυσμών στο Πλειστόκαινο

Η χρήση του mtDNA ως μοριακού δείκτη αποτέλεσε την κύρια αιτία προόδου στον τομέα της φυλογεωγραφίας (Avise 2000). Δεδομένου ότι το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται (στη συντριπτική πλειοψηφία των ειδών) και κληρονομείται μητρικά επιτρέπει τη μελέτη των απλοτύπων των υπάρχοντων πληθυσμών στο χώρο και τον χρόνο (Hewitt 2000). Ο ρυθμός διαφοροποίησης των αλληλουχιών του mtDNA θεωρείται ιδανικός για φυλογενετικές μελέτες, δεδομένου ότι εξελίσσεται με αρκετά γρήγορο ρυθμό ώστε να αναδεικνύει την διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών από ολόκληρο το εύρος κατανομής του είδους στο οποίο ανήκουν, αλλά και αρκετά αργό ώστε στις περισσότερες των περιπτώσεων να μην παρατηρούνται φαινόμενα κορεσμού, εξαιτίας των επαναλαμβανόμενων μεταλλαγών, στη διάρκεια λίγων εκατομμυρίων χρόνων (περίοδος έντονης ειδογένεσης) (Hewitt 1996, Avise *et al.* 1998). Για παράδειγμα, η περιοχή ελέγχου του mtDNA (D-loop) χαρακτηρίζεται από γρήγορο εξελικτικό ρυθμό, γεγονός που την καθιστά πολύ χρήσιμο και ευρέως χρησιμοποιούμενο μοριακό εργαλείο στις ενδοειδικές φυλογενετικές μελέτες (Hewitt 2001).

Αλλα τμήματα του γονιδιώματος, όπως οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούν χρωμοσωμικά τμήματα DNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται α) από μεταλλακτικούς ρυθμούς οι οποίοι είναι κατά πολύ μεγαλύτεροι ($\times 100$) από αυτούς του mtDNA, β) από έναν μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων που διαφέρουν ως προς το μήκος και γ) από μεγάλη πληθυσμιακή ποικιλότητα. Ο συνδυασμός της υψηλής ποικιλότητας που χαρακτηρίζει τις περιοχές αυτές και ο μεγάλος αριθμός αυτών που είναι διασκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα, τις καθιστά πολύτιμα εργαλεία στις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής και στον καθορισμό των αλλαγών που πραγματοποιήθηκαν στα τέλη του Πλειστόκαινου και κατά τη διάρκεια του Ολόκαινου μέχρι σήμερα (Hewitt & Nichols 2005). Συνεπώς, σε μια προσπάθεια μελέτης της πληθυσμιακής δομής ενός είδους κατά τη διάρκεια του Πλειστόκαινου και του Ολόκαινου απαιτείται ο συνδυασμός και η ανάλυση διαφόρων μοριακών δεικτών, άλλων περισσότερο (μικροδορυφορικές αλληλουχίες) και άλλων λιγότερο (mtDNA) πολυμορφικών (Hewitt & Nichols 2005).

3. Τα Λαγόμορφα της Ευρώπης

Στην παρούσα μελέτη και για το χώρο της Ευρώπης ακολουθείται η συστηματική των λαγών του Άτλαντα των θηλαστικών της Ευρώπης (“The Atlas of European Mammals” by Mitchell-Jones *et al.* 1999), όπου αναγνωρίζονται μόνο αντιπρόσωποι της οικογένειας Leporidae και αριθμούν συνολικά επτά είδη λαγόμορφων. Έξι από αυτά ανήκουν στο γένος *Lepus* και ένα είδος στο γένος *Oryctolagus*. Η κατανομή των ειδών λαγού (*Lepus*) της Ευρώπης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4**. Αναλυτικότερα, στην Ευρώπη κατανέμονται τα είδη: α) *Lepus capensis* (cape hare) στην Σαρδηνία (εισήχθη από τον άνθρωπο), β) *L. castroviejoi* (broom hare) στα Κανταβρικά Όρη της Ιβηρικής χερσονήσου, γ) *L. granatensis* (Iberian hare) στο μεγαλύτερο τμήμα της ιβηρικής χερσονήσου δ) *L. corsicanus* (Corsican or



Εικόνα 4: Χάρτης κατανομής των ειδών του γένους *Lepus* στην Ευρώπη σύμφωνα με τους Mitchell-Jones *et al.* 1999.

Italian or Arpenin hare) αυτόχθον στην κεντρική και νότιο Ιταλία και τη Σικελία, ενώ πληθυσμοί του έχουν εισαχθεί στην Κορσική, ε) *L. timidus* στις Σκανδιναβικές χώρες, την Σκωτία, την Ιρλανδία και σε περιοχές της βόρειας Ιταλίας (Άλπεις) και στ) *L. europaeus* (European hare ή brown hare), το είδος που αποτελεί και αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, στα περισσότερα τμήματα της ηπειρωτικής Ευρώπης με εξαίρεση μεγάλα τμήματα της Ιβηρικής χερσονήσου και της νότιας Ιταλίας, τη Σικελία, τη Σαρδηνία, τη Μάλτα, καθώς και άλλα νησιά της Μεσογείου όπως και νησιά της Βόρειας και Βαλτικής θάλασσας και την Ισλανδία (Suchentrunk *et al.* 2006).

Ο Ευρωπαϊκός λαγός έχει εισαχθεί σε αρκετά νησιά της Μεσογείου και της Βαλτικής θάλασσας, καθώς επίσης και στην Ιρλανδία και τη Σουηδία. Η παρουσία του είδους αυτού στα Βρετανικά νησιά ίσως να οφείλεται στον άνθρωπο, ενώ διάφοροι πληθυσμοί του έχουν μετατοπιστεί κυρίως από χώρες της ανατολικής Ευρώπης σε χώρες όπως η Γαλλία, η Ιταλία, η Γερμανία, η Αυστρία και πολλές άλλες κατά τη διάρκεια προγραμμάτων εμπλουτισμού, (Suchentrunk *et al.* 2006). Φαινόμενα μετατοπίσεων έχουν παρατηρηθεί και στην Ελλάδα, όπου σύμφωνα με καταγραφές του Υπουργείου Γεωργίας και των Κυνηγετικών Συνομοσπονδιών, την τελευταία δεκαετία έχουν λάβει χώρα απελευθερώσεις εκτρεφόμενων απόμων, τα οποία έχουν εισαχθεί κατά κύριο λόγο από την Ιταλία, την πρώην Γιουγκοσλαβία και τη Βουλγαρία, (Mamuris *et al.* 2001).

3.1 Μελέτες γενετικής διαφοροποίησης των λαγών της Ευρώπης

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

Παρόλο που τα είδη της οικογένειας Leporidae και ιδιαίτερα το είδος *L. europaeus* είναι αρκετά διαδεδομένα στην Ευρώπη, οι μελέτες που σχετίζονται με την πληθυσμιακή τους γενετική είναι περιορισμένες, και οι οποίες αφορούν στη διαφοροποίηση που παρουσιάζουν τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνών όσο και σε επίπεδο DNA (Πίνακας 2). Οι πρώτες μελέτες διαφοροποίησης είχαν ως μοριακό διαγνωστικό εργαλείο διάφορα συστήματα πρωτεϊνών και ενζύμων (ισοένζυμα, αλλοένζυμα, πεπτιδάσες και άλλους πρωτεϊνικούς τόπους). Η ποικιλότητα αυτών σε βιοχημικό επίπεδο είναι χαρακτηριστική για όλα τα είδη της οικογένειας Leporidae που έχουν μελετηθεί και αποδίδεται στην ακτινωτή εξέλιξη της οικογένειας αυτής (Grillitsch *et al.* 1992). Αργότερα, η εισαγωγή νέων μοριακών εργαλείων στο χώρο της πληθυσμιακής γενετικής και φυλογένεσης προσέδωσε νέα στοιχεία όσον αφορά στη διαφοροποίηση και τον εξελικτικό τους ρυθμό. Μελέτες του mtDNA, κυρίως μέσω της

ανάλυσης πολυμορφισμού μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (mtDNA-RFLPs) είχε ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα ως προς τη διαφοροποίηση των πληθυσμών, σε επίπεδο που δεν μπορούσε να γίνει αντιληπτό με τη χρήση των προγενέστερων μεθοδολογιών. Τέλος, η ποικιλότητα των Ευρωπαϊκών ειδών που παρατηρείται τόσο στις αλληλουχίες τμημάτων του mtDNA όσο και στα αλληλόμορφα πυρηνικών γενετικών τόπων υψηλού εξελικτικού ρυθμού, όπως οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες, φαίνεται ότι είναι σε θέση να αποκαλύψει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα εξελικτικά μονοπάτια, τις μεταναστευτικές οδούς και επομένως την ιστορία των ειδών αυτών στη γηραιά ήπειρο.

Πίνακας 2: Μελέτες γενετικής διαφοροποίησης που έχουν πραγματοποιηθεί για την οικογένεια Leropidae στην Ευρώπη (*μελέτη λαγών της Τουρκίας).

Πρωτεΐνες	Αλλοένζυμα	Hartl <i>et al.</i> 1989, 1994, 1995, Grillitsch <i>et al.</i> 1992, Suchentrunk <i>et al.</i> 1998, 2000, 2001, 2003, 2005, Vapa <i>et al.</i> 2002, Sert <i>et al.</i> 2005*
	Πεπτιδάσες	Alves & Ferrand 1999, Alves <i>et al.</i> 2000, 2003
	Άλλοι τόποι	Bonhomme <i>et al.</i> 1986, Hartl 1987, 1991, Hartl & Ferrand 1993, Hartl <i>et al.</i> 1990, 1992, 1993, Markowski <i>et al.</i> 1990
MtDNA	RFLPs	Pérez-Suarez <i>et al.</i> 1994, Thulin <i>et al.</i> 1997, Branco <i>et al.</i> 2000, Mamuris <i>et al.</i> 2001, Melo-Ferreira <i>et al.</i> 2005, Suchentrunk <i>et al.</i> 2005
	Αλληλουχίες γονιδίων	Pérez-Suarez <i>et al.</i> 1994, Pierpaoli <i>et al.</i> 1999, 2003, Thulin & Tegelstrom 2002, Alves <i>et al.</i> 2003, Kasapidis <i>et al.</i> 2005, Fickel <i>et al.</i> 2005, Thulin <i>et al.</i> 2006b, Melo-Ferreira <i>et al.</i> 2007
nDNA	RAPDs	Mamuris <i>et al.</i> 2002
	Μικροδορυφορικές αλληλουχίες	Andersson <i>et al.</i> 1999, Fickel <i>et al.</i> 1999, Fredsted <i>et al.</i> 2006, Fickel <i>et al.</i> 2005, Estonba <i>et al.</i> 2006, Thulin <i>et al.</i> 2006a

3.1.1 Αναλύσεις βάσει πρωτεϊνών τόπων και RFLPs του mtDNA

Η Ιβηρική χερσόνησος, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτέλεσε καταφύγιο για έναν μεγάλο αριθμό ειδών, συμπεριλαμβανομένων και διαφόρων λαγόμορφων, κατά τη διάρκεια των Παγετωδών περιόδων. Στη μελέτη τους οι Pérez-Suarez *et al.* (1994) προσπαθώντας να διαλευκάνουν τις φυλογενετικές σχέσεις των λαγών της νοτιοδυτικής Ευρώπης (*L. castroviejoi*, *L. granatensis* και *L. europaeus*) και ενός υπό-είδους των βορειοδυτικών παραλίων της Αφρικής (*L. capensis schlumbergeri*) χρησιμοποίησαν περιοριστικά ένζυμα για την πέψη του mtDNA των υπό μελέτη ατόμων. Η ανάλυση των δεδομένων υπέδειξε ότι κάποια άτομα του είδους *L. europaeus* παρουσιάζουν μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα με άτομα ενός διαφορετικού είδους (κάποιοι απλότυποι με το είδος *L. castroviejoi* και ένας με το είδος *L. granatensis*) παρά με άτομα του ίδιου είδους, γεγονός το

οποίο θα μπορούσε κατά τους συγγραφείς να ερμηνευθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι η διείσδυση (introgression) mtDNA από το είδος *L. castroviejo* ή το *L. granatensis* στο *L. europaeus*, ενώ ο δεύτερος υποθέτει την διατήρηση αρχέγονου πολυμορφισμού που έχει ως αποτέλεσμα το είδος *L. europaeus* να παρουσιάζει δύο φυλογενετικές γραμμές mtDNA οι οποίες είναι παλαιότερες από το διαχωρισμό των ειδών *L. castroviejo* και *L. granatensis*. Η πρώτη θεωρία (introgression) προϋποθέτει τον υβριδισμό μεταξύ των ειδών, γεγονός που σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων θα μπορούσε να λάβει χώρα το τελευταίο 1 εκ. χρόνια. Η διαφοροποίηση των απλοτύπων του Ευρωπαϊκού λαγού με τους συγγενικούς σε αυτούς απλοτύπους των ειδών της Ιβηρικής, είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την αναμενόμενη βάσει της υπόθεσης της διείσδυσης του γονιδιώματος από τα δύο ενδημικά είδη. Το γεγονός αυτό, οδήγησε τους συγγραφείς στην απόρριψη της πρώτης υπόθεσης και την αποδοχή της δεύτερης υπόθεσης, δηλαδή της διατήρησης του αρχέγονου πολυμορφισμού ως πιο πιθανή (Pérez-Suarez *et al.* 1994). Θεωρητικά, η υψηλή ενδοειδική ποικιλότητα θα μπορούσε να διατηρηθεί στην περίπτωση που ο πληθυσμός αυτός θα ήταν αρκετά μεγάλος. Ωστόσο, τα πρώτα δεδομένα ισοενζυμικών συστημάτων του Ευρωπαϊκού λαγού της Ιβηρικής χερσονήσου δεν ενισχύουν την υπόθεση αυτή, αφού και τα επίπεδα της ποικιλότητας των πληθυσμών της Ισπανίας δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλά (Bonhomme *et al.* 1986). Αντιθέτως, μετέπειτα μελέτη των Alves & Ferrand (1999) σε άτομα των ειδών *L. granatensis* και *L. europaeus* (από πληθυσμούς της Αυστρίας, Γαλλίας και βορειοανατολικής Ισπανίας) με τη χρήση 12 πρωτεϊνικών τόπων, έδειξε ότι οι λαγοί της Ιβηρικής χαρακτηρίζονται από υψηλή ποικιλότητα. Η μειωμένη μεταξύ των δειγματοληπτικών περιοχών γενετική διαφοροποίηση ήταν ενδεικτική της μηδαμινής επίδρασης των γεωγραφικών αποστάσεων στην κατανομή της γενετικής ποικιλότητας και του υψηλού βαθμού γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών. Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών *L. granatensis* και *L. europaeus* ήταν υψηλή, εξαιτίας τόσο ενός αριθμού διαγνωστικών για τα είδη τόπων, όσο και εξαιτίας των διαφορών στις αλληλικές συχνότητες, αλλά και στην παρουσία μοναδικών αλληλομόρφων στα είδη αυτά. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των αλληλομόρφων που ανιχνεύθηκαν ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος για το είδος *L. granatensis* από ότι στο *L. europaeus* γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι τα άτομα του Ευρωπαϊκού λαγού προέρχονται από πληθυσμούς σε κατάσταση αιχμαλωσίας και επομένως θα μπορούσαν να έχουν εκτεθεί σε πολλαπλά φαινόμενα ιδρυτή (Alves & Ferrand 1999).

Ένα χρόνο αργότερα, με τη μελέτη των Alves *et al.* (2000) σε πρωτεΐνες του πλάσματος, ήταν δυνατός ο διαχωρισμός μεταξύ των ειδών *L. granatensis* και *L. europaeus*, εξαιτίας της ύπαρξης μοναδικών αλληλομόρφων στα είδη αυτά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι μια πεπτιδάση εμφανίζει και στα δύο είδη το ίδιο πρότυπο διαχωρισμού των αλληλομόρφων. Αυτό υποδεικνύει ότι η μοριακή βάση της ποικιλότητάς τους είναι ίδια, επιτρέποντας την εξαγωγή του συμπεράσματος ότι πρόκειται για μια

περίπτωση προγονικού πολυμορφισμού (Alves *et al.* 2000). Παράλληλα διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της γενετικής ποικιλότητας του λαγού της Ιβηρικής χερσονήσου είναι υψηλότερα από αυτά που παρατηρούνται στον Ευρωπαϊκό λαγό της κεντρικής Ευρώπης, γεγονός που μπορεί να οφείλεται και πάλι στην προέλευση των δειγμάτων του Ευρωπαϊκού λαγού από πληθυσμούς σε κατάσταση αιχμαλωσίας (Alves *et al.* 2000).

Οι Melo-Ferreira *et al.* (2005) μελετώντας πληθυσμούς των τριών ειδών της Ιβηρικής χερσονήσου (*L. granatensis*, *L. europaeus*, *L. castroviejo*) με τη μέθοδο PCR-RFLP στο κυτόχρωμα *b* (mtDNA) και χρησιμοποιώντας περιοριστικά ένζυμα που είναι διαγνωστικά για τα είδη, διαπίστωσαν την ύπαρξη ενός σημαντικού αριθμού ατόμων από μεγάλο εύρος της Ιβηρικής χερσονήσου που φέρουν το mtDNA του είδους *L. timidus*. Βάσει των αποτελεσμάτων τους διατύπωσαν την υπόθεση ότι το γεωγραφικό όριο στο οποίο παρατηρούνται σήμερα τα άτομα που φέρουν mtDNA τύπου *L. timidus* θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει τη νοτιότερη ιστορικά θέση της ζώνης υβριδισμού μεταξύ των ειδών, που μεταβαλλόταν ανάλογα με το κλίμα. Δύο σενάρια μπορούν να διατυπωθούν για τον τρόπο διεξόδου του mtDNA από το είδος *L. timidus* στο είδος *L. europaeus*. Το πρώτο προϋποθέτει την επαφή των δύο αυτών ειδών κατά το παρελθόν, γεγονός που απαιτεί την συνύπαρξη των δύο αυτών ειδών στην ίδια περιοχή. Ωστόσο το σενάριο αυτό δεν υποστηρίζεται από τα υπάρχοντα παλαιοντολογικά και μοριακά δεδομένα (Lopez-Martinez 1980, Pierpaoli *et al.* 1999). Επομένως, αν τα δύο αυτά είδη δεν ήρθαν ποτέ σε επαφή, το mtDNA του είδους *L. timidus* θα μπορούσε να έχει περάσει στο είδος *L. europaeus* έχοντας ως ενδιάμεσο σταθμό το είδος *L. granatensis*. Αντίστοιχα ερωτήματα δημιουργούνται και στην περίπτωση των ατόμων του είδους *L. castroviejo*, τα οποία φέρουν mtDNA του είδους *L. timidus*. Η άγνοια ωστόσο για την ιστορία του ενδημικού αυτού είδους της Ιβηρικής και τα ελλιπή δεδομένα δεν επιτρέπουν την εκτίμηση του βαθμού διεξόδου του γονιδιώματος στο είδος αυτό. Οι συγγραφείς υποθέτουν ότι τα φαινόμενα διεξόδου γονιδιώματος που παρατηρούνται και στα τρία είδη της Ιβηρικής χερσονήσου, θα μπορούσαν να ερμηνευθούν από περιστασιακούς υβριδισμούς ακολουθούμενους από πολλαπλά κύματα επιλογής στο mtDNA, η οποία δρα θετικά στα άτομα που το φέρουν, ανεξάρτητα από τις διαφορές στην ιστορία, την οικολογία και συμπεριφορά των ειδών αυτών (Melo-Ferreira *et al.* 2005).

Η παρουσία του mtDNA του ορεσίβιου λαγού (*L. timidus*) σε άγρια άτομα του Ευρωπαϊκού λαγού της Σουηδίας παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Thulin *et al.* (1997). Ωστόσο περιπτώσεις στις οποίες θηλυκά άτομα του ορεσίβιου λαγού ζευγάρωναν αυτενεργώς με αρσενικά άτομα Ευρωπαϊκού λαγού σε κατάσταση αιχμαλωσίας είχαν παρατηρηθεί πολύ παλαιότερα από τους Gustavsson & Sundt (1965), με την αντίστροφη διασταύρωση να επιτυγχάνεται μόνο με τεχνητή γονιμοποίηση. Στην εργασία του ο Thulin και οι συνεργάτες του (1997) μελέτησαν διάφορα άτομα του ορεσίβιου και του Ευρωπαϊκού λαγού από αντιπροσωπευτικές περιοχές της Σουηδίας. Η μέθοδος που χρησιμοποίησαν ήταν

αυτή των RFLPs στο μόριο του mtDNA και οι αναλύσεις τους παρουσίασαν διαφοροποίηση που ήταν ενδεικτική της εξελικτικής απόστασης των δύο αυτών ειδών ($8 \pm 1\%$, SD). Η διαφοροποίηση αυτή, αν και υψηλή, θεωρείται αναμενόμενη μεταξύ ειδών θηλαστικών του ίδιου γένους (Tegelstrom *et al.* 1988, Martin & Palumbi 1993). Ο χρόνος απόκλισής τους εκτιμήθηκε στα 2-4 εκ. χρόνια πριν από σήμερα. Από το σύνολο των ατόμων του Ευρωπαϊκού λαγού που αναλύθηκαν, έξι έφεραν mtDNA παρόμοιο ή ταυτόσημο με αυτό του ορεσίβιου λαγού. Αν και βάσει των δεδομένων τους, δεν ήταν δυνατός ο αποκλεισμός της πιθανότητας υβριδισμού σε συνθήκες αιχμαλωσίας και της μετέπειτα απελευθέρωσης των ατόμων αυτών, ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά τους οδήγησαν στην υπόθεση της μεταβίβασης του mtDNA από τους ορεσίβιους λαγούς στον ευρωπαϊκό μέσω της διαδικασίας του υβριδισμού στη φύση, γεγονός που πρέπει να έλαβε χώρα μετά την εισαγωγή των ατόμων του Ευρωπαϊκού λαγού στην χώρα (Thulin *et al.* 1997).

Μετέπειτα μελέτη των διαφορών που παρουσιάζονται σε συμπάτριους και αλλοπάτριους πληθυσμούς των ειδών *L. timidus* και *L. europaeus* (mtDNA cytb RFLPs) της Σουηδίας, έδειξε ότι η μεταξύ των ειδών μεταβίβαση του mtDNA στην φύση δεν είναι αμφίδρομη, αλλά μονόδρομη και συγκεκριμένα από το αυτόχθον είδος της περιοχής (*L. timidus*) στο είδος που εισήχθη τελευταίο (*L. europaeus*) (Thulin & Tegelstrom 2002). Περίπου το 10% των Ευρωπαϊκών λαγών της Σουηδίας που μελετήθηκαν διέθετε mtDNA του είδους *L. timidus* ενώ δεν παρατηρήθηκε κανένα άτομο του ορεσίβιου λαγού να φέρει mtDNA του Ευρωπαϊκού λαγού. Από τα δεδομένα αυτά, οι συγγραφείς συμπέραναν ότι θηλυκά άτομα του *L. timidus* ζευγαρώνουν με αρσενικά του *L. europaeus* και ότι τουλάχιστον κάποια θηλυκά άτομα που προκύπτουν από αυτή τη διασταύρωση, ζευγαρώνουν με αρσενικά άτομα του είδους *L. europaeus*, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παρατηρούμενη μεταβίβαση του mtDNA του είδους *L. timidus* στον Ευρωπαϊκό λαγό. Η αντίθετη διασταύρωση συμβαίνει σπάνια ή ακόμα και ποτέ στην φύση αφού κανένα άτομο του είδους *L. timidus* δεν χαρακτηρίζεται από mtDNA του *L. europaeus*. Η «αποτυχία» αυτή των θηλυκών ατόμων του είδους *L. timidus* να «ξεχωρίσουν» τα αρσενικά άτομα του είδους *L. europaeus* θα μπορούσε σύμφωνα με τους συγγραφείς, να σχετίζεται με την αναπαραγωγική συμπεριφορά του τελευταίου. Αναλυτικότερα, τα κυρίαρχα αρσενικά άτομα του είδους *L. europaeus* ακολουθούν και πολιορκούν τα θηλυκά πριν και κατά τη διάρκεια του οίστρου τους (Flux 1970, Holley & Greenwood 1984), με αποτέλεσμα να ζευγαρώνουν περισσότερες φορές από ότι τα υποδεέστερα άτομα αυτών (Holley 1986). Αν και τέτοιου είδους αναπαραγωγική συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και σε άτομα του είδους *L. timidus*, ωστόσο αποτελεί σπάνιο φαινόμενο. Ακόμα όμως και αν κάποια αρσενικά του είδους *L. timidus* πάλευαν για τη διεκδίκηση ενός θηλυκού, το αποτέλεσμα θα ήταν αμφίβολο και αυτό εξαιτίας της σωματικής τους διάπλασης η οποία είναι υποδεέστερη αυτής του είδους *L. europaeus*. Αποτέλεσμα του μονοκατευθυντήριου αυτού υβριδισμού είναι η απώλεια μιας

τουλάχιστον γέννας για το είδος *L. timidus* σε κάθε τέτοια διασταύρωση, γεγονός που σε συνδυασμό με την απώλεια των ενδαιτημάτων του είδους στη Σουηδία, οδηγεί στη μείωση της πληθυσμιακής του πυκνότητας (φαινόμενο γνωστό ως «εξαφάνιση μέσω υβριδισμού» Rhymer & Simberloff 1996) (Thulin & Tegelstrom 2002).

Οι Suchentrunk *et al.* (1998) μελετώντας πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού της Αγγλίας διαπίστωσαν χαμηλά επίπεδα αλλοενζυμικής ετεροζυγωτίας τα οποία διέφεραν σημαντικά από την αντίστοιχη ποικιλότητα των λαγών της Αυστρίας (Hartl & Ferrand 1993, Hartl *et al.* 1995). Αντιθέτως, η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία σε δύο πληθυσμούς της Αγγλίας υπερβαίνει τις ελάχιστες τιμές των Αυστριακών πληθυσμών. Το χαρακτηριστικό αυτό φαινόμενο παρατηρείται, βάσει θεωρητικών και πειραματικών δεδομένων, σε πληθυσμούς σπονδυλόζων μετά το πέρας μιας πληθυσμιακής στενωπού (Suchentrunk *et al.* 1998). Επιπλέον, τα γενετικά δεδομένα αποκαλύπτουν τη στενή σχέση μεταξύ των πληθυσμών της Αγγλίας και της Νέας Ζηλανδίας καθώς και με πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης. Κυρίαρχη διαφορά των πληθυσμών της Αγγλίας και της Νέας Ζηλανδίας από αυτούς της κεντρικής Ευρώπης αποτελεί η απώλεια πολλών αλληλομόρφων, τα οποία είναι παρόντα στους πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης. Παράλληλα, οι πληθυσμοί της Νέας Ζηλανδίας δεν παρουσιάζουν σημαντική απώλεια γενετικής ποικιλότητας σε σχέση με τους πληθυσμούς της Αγγλίας από τους οποίους θεωρείται ότι προήλθαν. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τις υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί για την εκ προθέσεως εισαγωγή λαγών στα Βρετανικά νησιά αμέσως μετά το άνοιγμα των Στενών της Μάγχης και των διαχωρισμό των νησιών αυτών από την ηπειρωτική περιοχή (Arnold 1993) πριν από περίπου 2.000 χρόνια, οι οποίες πιθανό να βασίστηκαν σε λίγα άτομα, τα οποία αποτέλεσαν και τον ιδρυτή όλων των πληθυσμών που παρουσιάζονται σήμερα στην Αγγλία. Ωστόσο εναλλακτική θα μπορούσε να θεωρηθεί η περίπτωση όπου, λαγοί με χαμηλά ποσοστά γενετικής ποικιλότητας εισέβαλαν στην Αγγλία πριν από το άνοιγμα στενών, μέσω της φυσικής γέφυρας που ένωνε τα Βρετανικά νησιά με τη σημερινή ηπειρωτική Ευρώπη πριν από περίπου 8.000 χρόνια (Suchentrunk *et al.* 1998).

Έρευνα ενός μεγάλου αριθμού ατόμων από 20 δειγματοληπτικές θέσεις στην Αυστρία έδειξε χαμηλή μεταξύ των πληθυσμών αλλοενζυμική διαφοροποίηση, ως άμεση συνέπεια του υψηλού ρυθμού μετανάστευσης μεταξύ αυτών. Ωστόσο, ήταν δυνατός ο εντοπισμός μικρού βαθμού διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών της δυτικής και βόρειας Αυστρίας από αυτούς της ανατολικής και νότιας. Ο συνδυασμός μορφολογικών, αλλοενζυμικών και RFLPs δεδομένων διαφόρων πληθυσμών της Αυστρίας έδειξε παρόμοιο πρότυπο διαφοροποίησης με αυτό που ανακτήθηκε από τις αναλύσεις των αλλοενζύμων. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό του υψηλού ρυθμού μετανάστευσης λαγών στην Αυστρία από χώρες που βρίσκονται ανατολικά και νότια αυτής (Hartl *et al.* 1993).

Τα δεδομένα της παραπάνω μελέτης συνδυάστηκαν με μορφολογικούς χαρακτήρες (μεριστικούς και μη) σε μια προσπάθεια διερεύνησης της αναπτυξιακής ομοιόστασης, η οποία θεωρείται ένδειξη της αρμοστικότητας ενός πληθυσμού (Hartl *et al.* 1995). Οι αναλύσεις τους έδειξαν θετική συσχέτιση μόνο στα ανήλικα άτομα ως προς την αλλοενζυμική ετεροζυγωτία και τις γεωγραφικές μονάδες. Αντιθέτως στα ενήλικα άτομα η συσχέτιση μεταξύ της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας και της ετεροζυγωτίας ήταν αρνητική και στατιστικά σημαντική μόνο σε μεριστικούς χαρακτήρες του κρανίου και όχι σε χαρακτήρες συνεχούς κατανομής. Το γεγονός αυτό σύμφωνα με τους συγγραφείς είναι ενδεικτικό ότι στους λαγούς του είδους αυτού, διαφορετικά μορφολογικά συστήματα επηρεάζονται σε διαφορετικό βαθμό από την αναπτυξιακή ομοιόσταση κατά τη διάρκεια διαφορετικών φάσεων της ζωής τους και υποδηλώνει ότι η αναπτυξιακή ομοιόσταση του είδους είναι υψηλότερη στις περισσότερο ετερόζυγες αλλοενζυμικές γενετικές δεξαμενές των γεωγραφικών μονάδων. Αντίθετα, μελέτες σε πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού στην Ουγγαρία με την χρήση αλλοένζυμων δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν διακριτές γενετικές δεξαμενές (Hartl *et al.* 1989).

Μελέτη διαφόρων πληθυσμών λαγών της Πολωνίας από επτά δειγματοληπτικές θέσεις κατά τη διάρκεια της τετραετίας 1986-1990 έδειξε μέτριες έως χαμηλές τιμές διαφοροποίησης σε πρωτεϊνικούς τόπους, στοιχείο επίσης ενδεικτικό του υψηλού αριθμού μεταναστών ανά γενεά μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών, καθώς επίσης και της καλύτερης βιωσιμότητας των ετερόζυγων θηλυκών ατόμων (Hartl *et al.* 1992). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η μείωση που παρατηρείται στους πληθυσμούς αυτούς δεν οφείλεται στην γενετική τους υποβάθμιση, αν και κάτι τέτοιο θα ήταν αναμενόμενο επακόλουθο της πτώσης του πληθυσμιακού μεγέθους κάτω από ένα κρίσιμο όριο μέσω της διαδικασίας του ομοικτικού υποβιβασμού.

Πληθυσμοί του Ευρωπαϊκού λαγού της Βουλγαρίας που μελετήθηκαν με τη χρήση αλλοενζύμων εμφάνισαν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα ποικιλότητας σε σύγκριση με μεγάλης έκτασης περιοχές της κεντρικής Ευρώπης (Suchentrunk *et al.* 2000). Αυτή η μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση οφείλεται κυρίως στις υψηλές τιμές ετεροζυγωτίας μικρού αριθμού γενετικών τόπων (δύο). Επιπρόσθετα, οι πληθυσμοί αυτοί εμφάνισαν ένα μοναδικό αλληλόμορφο σε χαμηλή συχνότητα, ενώ κάποια αλληλόμορφα που παρουσιάζονται σε πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης απουσίαζαν από τα άτομα της Βουλγαρίας που μελετήθηκαν. Το νέο αυτό αλληλόμορφο παρατηρείται μόνο σε έναν πληθυσμό, ο οποίος συνορεύει με την βόρεια Ελλάδα, γεγονός που οδήγησε τους συγγραφείς στην διατύπωση της υπόθεσης μικρού βαθμού γονιδιακής ροής από τη βόρεια Ελλάδα στην Βουλγαρία. Η απουσία άλλων νέων αλληλομόρφων στους πληθυσμούς της Βουλγαρίας σύμφωνα με την ίδια μελέτη οφείλεται είτε στην έλλειψη ισχυρής γονιδιακής ροής από τις γειτονικές περιοχές (Μικρά Ασία, Ελλάδα, περιοχές βορειοανατολικά της Μαύρης Θάλασσας) είτε στην απουσία

άλλων κοινών αλληλομόρφων στους γειτονικούς αυτούς πληθυσμούς-πιθανές πηγές γενετικού υλικού. Επιπλέον, το γεγονός ότι ένας αριθμός αλληλομόρφων της κεντρικής Ευρώπης απουσιάζει από τους πληθυσμούς της Βουλγαρίας θα μπορούσε να είναι ενδεικτικό ότι οι γενετικές δεξαμενές της κεντρικής Ευρώπης αποτέλεσαν αποδέκτες γονιδιακής ροής και από άλλα τμήματα εκτός της Ευρώπης (ανατολικά). Η χαμηλή διαφοροποίηση θα μπορούσε εν μέρει να οφείλεται στις εντατικές μεταφορές λαγών (500-1000 λαγοί, δύο με τρεις φορές το χρόνο για τη δεκαετία 1970-1980, ιδιαίτερα από τις ανατολικές προς τις δυτικές περιοχές της Βουλγαρίας) (Suchentrunk *et al.* 2000). Μελέτες των δεικτών εγκαθίδρυσης (F-statistics: F_{ST}) δείχνουν ότι η κατανομή της γενετικής ποικιλότητας στις περιοχές της κεντρικής και νοτιοανατολικής Ευρώπης δεν επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από τις μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό σημαντικού βαθμού γονιδιακής ροής μεταξύ μεγάλων γεωγραφικών αποστάσεων, παραπέμποντας σε ένα μάλλον παμμικτικό δίκτυο τοπικών πληθυσμών. Παρά τη γενικότερη εικόνα υψηλής γονιδιακής ροής για μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις, υπάρχει ωστόσο μια τάση μικρής διαφοροποίησης των τοπικών γενετικών δεξαμενών των πληθυσμών της νοτιοανατολικής (Βουλγαρία) και κεντρικής (Αυστρία) Ευρώπης (Suchentrunk *et al.* 2000).

Στην περιοχή της πρώην Γιουγκοσλαβίας οι Vvara *et al.* (2002) συνέλεξαν λαγούς από τέσσερις περιοχές της Βοϊβοντίνας (Vojvodina) και με τη χρήση αλλοενζύμων διαπίστωσαν ότι η γενετική τους ποικιλότητα (ως προς την ετεροζυγωτία και τον πολυμορφισμό) ήταν υψηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στους λαγούς της Πολωνίας (Hartl *et al.* 1992), της Αυστρίας και της Βουλγαρίας (Suchentrunk *et al.* 2000). Ωστόσο οι τιμές αυτές θα μπορούσαν να θεωρηθούν συνέπεια του μικρού αριθμού των ατόμων που ανέλυσαν (N=26), των λίγων αλλοενζυμικών τόπων που μελετήθηκαν, καθώς και της μεγαλύτερης ευαισθησίας της μεθόδου ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των αλληλομόρφων (Vvara *et al.* 2002).

Λίγα χρόνια αργότερα, η μελέτη ενός μεγαλύτερου αριθμού ατόμων από την ίδια περιοχή (Vojvodina) μέσω RFLPs σε mtDNA (Djan *et al.* 2006) αποκάλυψε ότι η διαφοροποίηση των απλοτύπων των λαγών της Vojvodina ήταν ανάλογη αυτής που παρατηρείται στους λαγούς της κεντρικής Ευρώπης (Hartl *et al.* 1993), αλλά σαφώς χαμηλότερη των λαγών της κεντρικής Ελλάδας (βλέπε παρακάτω Mamuris *et al.* 2001). Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των δύο μελετών για την περιοχή της Vojvodina κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι λαγοί της περιοχής αυτής έχουν προέλθει από την κεντρική Ευρώπη (Djan *et al.* 2006).

Η πρώτη γενετική μελέτη του Ευρωπαϊκού λαγού στον Ελλαδικό χώρο πραγματοποιήθηκε από τον Μαμούρη και τους συνεργάτες του (2001), με κύριο στόχο την παροχή πληροφοριών σχετικά με τη διατήρηση και διαχείριση της γενετικής υπόστασης των λαγών της Ελλάδας, καθώς και την αποτίμηση των γενετικών επιπτώσεων των πρακτικών

απελευθερώσεων που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν άτομα άγριων πληθυσμών της κεντρικής Ελλάδας και εκτρεφόμενα άτομα πριν αυτά απελευθερωθούν, από δύο διαφορετικά σημεία εκτροφής. Τα άγρια άτομα συλλέχθηκαν από περιοχή που διαθέτει όλο το εύρος των ενδιαιτημάτων του λαγού και στην οποία έλαβαν χώρα απελευθερώσεις κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας. Επιπλέον, εντός αυτής υπάρχουν επίσης περιοχές ελεγχόμενου κυνηγιού, στις οποίες δεν έχουν πραγματοποιηθεί απελευθερώσεις (Mamuris *et al.* 2001). Χρησιμοποιώντας ως μοριακό δείκτη τον πολυμορφισμό στο μήκος των περιοριστικών θραυσμάτων του mtDNA (mtDNA-RFLPs) η μέση τιμή διαφοροποίησης των απλοτύπων ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται σε είδη λαγών της Ευρώπης, με την εξαίρεση των λαγών της Ιβηρικής χερσονήσου. Η πλειοψηφία των απλοτύπων που μελετήθηκαν ήταν μοναδικοί, ενώ περίπου το 1/5 αυτών ήταν κοινοί μεταξύ των πληθυσμών. Αν και παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις απλοτυπικές συχνότητες μεταξύ των πληθυσμών, ωστόσο η διαφοροποίηση αυτή δεν φαίνεται να σχετίζεται με την γεωγραφική τους απόσταση. Ο αριθμός των κοινών μεταξύ των πληθυσμών απλοτύπων μειώνεται όσο αυξάνει η γεωγραφική τους απόσταση, ενώ το ποσοστό των μοναδικών απλοτύπων παραμένει υψηλό, στοιχείο ενδεικτικό της απομόνωσής τους. Σύμφωνα με τους Mamuris *et al.*, η απομόνωση αυτή οφείλεται περισσότερο στην κοινωνική και οικολογική συμπεριφορά του λαγού, παρά στα φυσικά εμπόδια (δεν υπάρχουν στην περιοχή μελέτης) που θα μπορούσαν εν δυνάμει να εμποδίσουν τη γονιδιακή ροή. Στη μελέτη τους αυτή ήταν εφικτός επίσης ο διαχωρισμός των εκτρεφόμενων ατόμων από τα άτομα των άγριων πληθυσμών, αλλά και η ανίχνευση ενός μικρού αριθμού ατόμων, τα οποία έφεραν απλότυπους αρκετά συγγενικούς με αυτούς των εκτρεφόμενων ατόμων. Αρκετά ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα άτομα αυτά εντοπίστηκαν μόνο στις περιοχές εκείνες, όπου έχουν πραγματοποιηθεί απελευθερώσεις στο παρελθόν. Επομένως, τα άτομα αυτά είτε έχουν προέλθει από απελευθερώσεις που έλαβαν χώρα στο παρελθόν είτε προέκυψαν από συζεύξεις άγριων και εκτρεφόμενων ατόμων μετά την απελευθέρωσή τους (Mamuris *et al.* 2001).

Ένα χρόνο αργότερα, η ίδια ομάδα ερευνητών (Mamuris *et al.* 2002) πραγματοποίησε ανάλυση RAPD σε έναν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων που περιλάμβαναν τόσο τα άτομα της κεντρικής Ελλάδας (άγρια και εκτρεφόμενα) όσο και άτομα από την Πολωνία, την Αυστρία, τη Γερμανία τη Γαλλία και τη Βουλγαρία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλων των στατιστικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν διακρίνονται δύο γενεαλογικές γραμμές. Η πρώτη περιελάμβανε τους πληθυσμούς της Βουλγαρίας και της Ελλάδας με σαφή διαχωρισμό μεταξύ τους, ενώ η δεύτερη τους υπόλοιπους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Η εντός των κλάδων αυτών διαφοροποίηση δεν είναι ξεκάθαρη, αφού και οι τιμές στατιστικής υποστήριξης των περισσότερων κλάδων είναι χαμηλότερες του 57%. Επιπρόσθετα, αν και η γενετική διαφοροποίηση των Ελληνικών πληθυσμών δεν παρουσιάζει

γεωγραφικό πρότυπο, η ανάλυση των συχνοτήτων των ζωνών του DNA αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές τιμές γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των Ελληνικών πληθυσμών ($F_{ST}=0,022$) (Mamuris *et al.* 2002).

Οι Suchentrunk *et al.* (2003) θέλοντας να ελέγξουν την υπόθεση παρουσίας αυτόχθονων αλληλομόρφων ως αποτέλεσμα μεταλλαγών κατά τη διάρκεια της απομόνωσης των λαγών σε καταφύγια της Βαλκανικής χερσονήσου του ανώτερου Πλειστοκαίνου, πραγματοποίησαν αναλύσεις αλληλομόρφων σε διάφορους πληθυσμούς της Ελλάδας (κεντρική Ελλάδα, Σέρρες, Λουτράκι και νοτιοανατολική Κρήτη-Ιεράπετρα). Τα δεδομένα που προέκυψαν συγκρίθηκαν στη συνέχεια με αυτά που παρήχθησαν από το ίδιο εργαστήριο σε λαγούς της Βουλγαρίας (Suchentrunk *et al.* 2000). Τα επίπεδα αλληλομόρφων ποικιλότητας και πληθυσμιακής δομής που παρατηρήθηκαν στους λαγούς της Ελλάδας έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του είδους στη Βουλγαρία και την κεντρική Ευρώπη. Η παρουσία σε χαμηλές συχνότητες, μικρού αριθμού μοναδικών αλληλομόρφων στους Ελληνικούς πληθυσμούς είναι ενδεικτικό μικρής διαφοροποίησης της γονιδιακής δεξαμενής των πληθυσμών αυτών από αυτούς της Βουλγαρίας και της κεντρικής Ευρώπης. Ωστόσο, τα κοινά αλληλόμορφα των λαγών της κεντρικής Ευρώπης ήταν επίσης κοινά και για τους λαγούς της Ελλάδας, ενώ κανένας από τους Ελληνικούς πληθυσμούς δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα πλούσια γενετική σύσταση (Suchentrunk *et al.* 2003).

Σε μια προσπάθεια μελέτης των λαγών της Ανατολίας που θεωρείται ότι ανήκουν στο είδος *L. europaeus* συλλέχθηκαν άτομα από διάφορα αντιπροσωπευτικά σημεία της κατανομής του είδους στην περιοχή και πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλομόρφων (Sert *et al.* 2005). Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε μια πιο πλούσια γενετική ποικιλότητα σε σχέση με τους λαγούς των υπολοίπων Ευρωπαϊκών πληθυσμών με τους οποίους συγκρίθηκαν. Αν και παρατηρήθηκαν μοναδικά αλληλόμορφα στο σύνολο των πληθυσμών που μελετήθηκαν, η συχνότητα τους ήταν πολύ χαμηλή. Επιπλέον, κάποια αλληλόμορφα των πληθυσμών αυτών βρέθηκαν και σε πληθυσμούς του Ισραήλ (Suchentrunk *et al.* μη δημοσιευμένα δεδομένα) αποτελώντας ένδειξη γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών των δύο αυτών περιοχών. Το γενικότερο πρότυπο της γενετικής δομής που εμφανίζουν οι λαγοί της Ανατολίας δεν διαφέρει από αυτό πληθυσμών της Ευρώπης. Οι λαγοί της Ανατολίας παρουσιάζονται πιο συγγενικοί με αυτούς της Ελλάδας, ενώ οι υψηλές τιμές F_{ST} είναι ενδεικτικές σημαντικής γενετικής διαφοροποίησης για κάποιους πολύ απομακρυσμένους πληθυσμούς. Τέλος, η διαφοροποίηση των δύο μορφολογικά διακριτών μορφών της Ανατολίας, βάσει του χρωματισμού του τριχώματός τους, ήταν πολύ μικρή, επιβεβαιώνοντας το φαινόμενο της ανεξέλεγκτης χρήσης εξωτερικών μορφολογικών χαρακτήρων στη συστηματική, τα οποία αρκετές φορές αποτελούν απλά προσαρμογές του οργανισμού στην περιβαλλοντική ποικιλότητα των ενδιαιτημάτων και όχι μια γενικότερη διαφοροποίηση της γενετικής τους δεξαμενής σε φυλογενετικό επίπεδο (Sert *et al.* 2005).

3.1.2 Αναλύσεις αλληλουχιών γενετικού υλικού (DNA)

Σύμφωνα με αναλύσεις νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του mtDNA (control region-I, cyt *b*) σε άτομα του είδους *L. corsicanus* της Ιταλίας, το είδος αποτελεί μια μονοφυλετική ομάδα με ισχυρή στατιστική υποστήριξη, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα ανάλυσης μορφολογικών χαρακτήρων (Pierpaoli *et al.* 1999). Η απουσία κοινών απλοτύπων μεταξύ του Ιταλικού και του Ευρωπαϊκού λαγού οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το *L. corsicanus* είναι αναπαραγωγικά απομονωμένο και δεν υβριδίζει με συμπάτριους πληθυσμούς Ευρωπαϊκού λαγού. Οι φυλογενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν ότι τα είδη αυτά ανήκουν σε ξεχωριστές φυλογενετικές γραμμές, οι οποίες εποίκησαν τη δυτική Ευρώπη σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου (Pierpaoli *et al.* 1999). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μετέπειτα μελέτη της ίδιας ομάδας σε μεγαλύτερο αριθμό Ευρασιατικών και Αφρικανικών ειδών (Pierpaoli *et al.* 2003). Χαρακτηριστικό ήταν το γεγονός ότι τα δύο είδη της Ιταλίας (*L. corsicanus*, *L. europaeus*) εμφανίζουν παρόμοια ενδοειδική ποικιλότητα η οποία είναι τρεις φορές χαμηλότερη από αυτή που παρουσιάζουν οι Αλπικοί πληθυσμοί του *L. timidus*. Οι λαγοί της Ιταλίας παρουσιάζουν έντονη φυλογεωγραφική δομή, φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρείται ούτε στους πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης αλλά ούτε και σε αυτούς του ορεσίβιου λαγού πιθανά εξαιτίας της δημογραφικής ιστορίας του τελευταίου κατά το Πλειστόκαινο. Γενικότερα, το σύνολο των Ευρασιατικών και Αφρικανικών ειδών που μελετήθηκαν φαίνεται να ανήκουν σε δύο κύριους κλάδους. Στον πρώτο κλάδο περιλαμβάνονται τα είδη *L. granatensis*, *L. corsicanus* και *L. timidus*, ενώ ο δεύτερος κλάδος περιλαμβάνει το είδος *L.c. mediterraneus*, τα πολύ συγγενικά *L. habessinicus* και *L.starcki* καθώς και το είδος *L. europaeus*. Ωστόσο η θέση των Αφρικανικής προέλευσης ειδών (*L.c. mediterraneus*, *L. habessinicus* και *L. starcki*) δεν υποστηρίζεται στατιστικά σημαντικά. Τα αποτελέσματα των Pierpaoli *et al.* (Pierpaoli *et al.* 1999) εμφανίζουν για πρώτη φορά το είδος *L.corsicanus* να είναι πιο συγγενικό με τον ορεσίβιο λαγό από ό,τι με τον Ευρωπαϊκό, σε αντίθεση με τις μέχρι τότε μελέτες. Το γεγονός αυτό οδήγησε τους συγγραφείς στην διατύπωση της υπόθεσης ότι τα είδη *L. corsicanus* και *L. timidus* αποτελούν υπολειμματικά είδη, η προέλευση των οποίων χρονολογείται πριν από την εξάπλωση του είδους *L. europaeus* στη Δυτική Ευρώπη και τα οποία προσαρμόστηκαν στο μεγάλο εύρος των Μεσογειακών και Αλπικών ενδιαιτημάτων. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη υπάρχουν ενδείξεις απότομης πληθυσμιακής αύξησης στους πληθυσμούς του ορεσίβιου λαγού και στα λίγα άτομα του Ευρωπαϊκού λαγού που μελετήθηκαν, η οποία πραγματοποιήθηκε περίπου τα τελευταία 135.000 και 25.000 χρόνια αντιστοίχως. Αντιθέτως, το πληθυσμιακό μέγεθος του είδους *L. corsicanus* παρέμεινε σταθερό, ενώ οι διαφοροποίηση των απλοτύπων του χρονολογείται στα 45.000-121.000 χρόνια πριν από σήμερα. Επομένως, η εποίκηση της

Σικελίας θα μπορούσε να έχει γίνει με φυσικό τρόπο αφού κατά την περίοδο αυτή η στάθμη της Μεσογείου ήταν περίπου 110m χαμηλότερη από ότι είναι σήμερα με αποτέλεσμα η Σικελία να ενώνεται φυσικά με την Ιταλική χερσόνησο. Οι απλότυποι των λαγών του είδους *L. corsicanus* της κεντρικής Ιταλίας είναι μοναδικοί, σχηματίζοντας μια μονοφυλετική ομάδα, ενώ απουσιάζουν από τους λαγούς της νότιας Ιταλίας και της Σικελίας. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση μεταξύ των λαγών της Σικελίας και της κεντρικής Ιταλίας μπορεί να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα της απομόνωσης της Σικελίας μετά το τέλος της τελευταίας Παγετώδους περιόδου (Pierpaoli *et al.* 1999). Τέλος, δεν φαίνεται να υπάρχουν ενδείξεις διείσδυσης γονιδιώματος από το είδος *L. europaeus* ή αντίστροφα. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι αν και τις τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες απελευθερώσεις ατόμων του Ευρωπαϊκού λαγού στην Σικελία, ωστόσο μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία καταγραφή τους, εμφανίζοντας έτσι το είδος *L. corsicanus* ως μόνο αντιπρόσωπο του γένους στο νησί (Pierpaoli *et al.* 2003).

Η μελέτη των αλληλουχιών διαφόρων τμημάτων του mtDNA (cyt *b* και T_f γονίδιο τρανσφερίνης) σε πέντε είδη λαγών που κατανέμονται στην Ευρώπη (*L. granatensis*, *L. europaeus*, *L. castroviejoii*, *L. corsicanus*, *L. timidus*) και ενός είδους από τις Βορειοδυτικές ακτές της Αφρικής (*L. capensis*) αποκάλυψε την ύπαρξη ατόμων των ειδών *L. granatensis* και *L. europaeus* της Ιβηρικής χερσονήσου, που φέρουν mtDNA του ορεισίβιου λαγού (Alves *et al.* 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι διείσδυση mtDNA του *L. timidus*, παρατηρήθηκε και στο είδος *L. castroviejoii*, ωστόσο ο μικρός αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν από το τελευταίο στις αναλύσεις αυτές, καθιστά απαραίτητη τη διεξαγωγή περαιτέρω μελετών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το είδος *L. granatensis* διακρίνεται από τους λαγούς της Βόρειας Αφρικής, που αναφέρονται ως *L. capensis*, ενώ τα είδη *L. castroviejoii* και *L. corsicanus* συνιστούν μια αδελφή ομάδα, αποτελώντας πιθανά υπολείμματα ενός κοινού προγόνου με μεγάλο εύρος κατανομής στη νότια και νοτιοδυτική Ευρώπη. Τέλος οι λαγοί της Σαρδηνίας (*L.c. mediterraneus*) φαίνεται να συνδέονται στενά με αυτούς του Μαρόκου, από τους οποίους και πρέπει να εισήχθησαν στο νησί τον 16^ο αιώνα (Vigne 1992).

Οι Melo-Ferreira *et al.* (2007) χρησιμοποιώντας αλληλουχίες του cyt *b* και της περιοχής ελέγχου (D-loop) του mtDNA σε δείγματα που καλύπτουν το μεγαλύτερο τμήμα της κατανομής του είδους *L. timidus* (Ευρώπη, Ασία) διέκριναν χαμηλά επίπεδα γεωγραφικής δομής, ενώ η ποικιλότητα που παρουσιάζει είναι χαμηλότερη σε σχέση με άλλα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του Ευρωπαϊκού λαγού της Ελλάδας. Ένα μικρό ποσοστό της παρατηρούμενης ποικιλότητας (7,5%) οφείλεται στην μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών διαφοροποίηση, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό (64,2%) αποδίδεται στην ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα. Παράλληλα, εκτίμησαν ότι η εξάπλωσή του έλαβε χώρα 164.000 χρόνια πριν από σήμερα, δηλαδή κατά τη διάρκεια της προτελευταίας Παγετώδους περιόδου (Ρίσσιος 130.000-116.000 χρόνια πριν από σήμερα Kukla *et al.* 2002) και νωρίτερα από την τελευταία

Παγετώδη περίοδο (70.000-18.000 χρόνια πριν από σήμερα Kukla *et al.* 2002). Το είδος *L. timidus*, ως αρκτικό είδος, επηρεάστηκε από τις Παγετώδεις περιόδους με έναν διαφορετικό τρόπο από ότι τα εύκρατα είδη. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η επέκταση του είδους έγινε τις περιόδους εκείνες που χαρακτηρίζονταν από πτώση της θερμοκρασίας και όχι αντίστροφα. Έτσι, το είδος θα μπορούσε να έχει διατηρήσει μεγάλη και συνεχή κατανομή κατά τη διάρκεια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου στις περιοχές νότια από το όριο των παγετώνων. Πιο πρόσφατες επεκτάσεις του είδους πρέπει να πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή της Βόρειας Παλαιαρκτικής η οποία στην κορύφωση της τελευταίας Παγετώδους περιόδου καλύπτονταν από πάγο. Η διαμερισματοποίηση και η μείωση της κατανομής του είδους κατά τη διάρκεια των θερμότερων περιόδων θα μπορούσαν να επιφέρουν μερική διαφοροποίηση των απομονωμένων πληθυσμών (οροσειρές) μέσω της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (Melo-Ferreira *et al.* 2007).

Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, η νουκλεοτιδική ποικιλότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των Ιβηρικών απλοτύπων των ειδών *L. granatensis* και *L. europaeus* που φέρουν mtDNA τύπου *L. timidus*, είναι αντίστοιχη με αυτή που παρουσιάζεται σε πληθυσμούς του είδους δότη (*L. timidus*). Η ποικιλότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι οι απλότυποι που φέρουν mtDNA του ορεσίβιου λαγού από τα δύο αυτά είδη, ανήκουν σε δύο διακριτές φυλογενετικές γραμμές, οι οποίες συνδέονται στενά με απλοτύπους του είδους *L. timidus* που κατανέμονται στις Άλπεις. Τα στοιχεία αυτά οδήγησαν στην υπόθεση της ύπαρξης δύο τουλάχιστον φαινομένων υβριδισμού με το είδος *L. timidus* στην Ιβηρική χερσόνησο και τη μετέπειτα υποχώρησή του, με αποτέλεσμα τμήμα αυτού να υπάρχει σήμερα στις Άλπεις. Οι δύο ομάδες του είδους *L. granatensis* που παρατηρούνται, φαίνεται να επεκτάθηκαν πρόσφατα (33.000 και 35.000 χρόνια πριν από σήμερα) σε μια περίοδο όπου σύμφωνα με τα απολιθώματα, η παρουσία του ορεσίβιου λαγού κάλυπτε μεγάλο τμήμα της υπό μελέτη περιοχής (Sesé & Sevilla 1996). Αν και το πρότυπο διαφοροποίησης του είδους *L. europaeus* είναι αντίστοιχο με αυτό του *L. granatensis*, ωστόσο η υπόθεση της κοινής εξελικτικής ιστορίας των δυο αυτών ειδών δεν μπορεί να γίνει αποδεκτή, αφού η παρουσία του Ευρωπαϊκού λαγού στην περιοχή είναι πιο πρόσφατη και εκτιμάται, βάσει παλαιοντολογικών όσο και μοριακών δεδομένων, μετά την τελευταία Παγετώδη περίοδο. Για την διερεύνηση των συνθηκών κάτω από τις οποίες ο Ευρωπαϊκός λαγός εποίκισε την περιοχή αυτή, περισσότερα δεδομένα κρίνονται απαραίτητα. Ωστόσο, οι υποθέσεις που θα μπορούσαν να ειπωθούν για τις συνθήκες εποίκησης του *L. europaeus* είναι δύο. Σύμφωνα με την πρώτη το είδος αυτό έφτασε στην Ιβηρική χερσόνησο πριν την εξαφάνιση του *L. timidus* και στη συνέχεια το αντικατέστησε. Εναλλακτικά, το είδος αυτό έφτασε στην περιοχή μετά την εξαφάνιση του *L. timidus* με αποτέλεσμα ο υβριδισμός μεταξύ των δύο αυτών ειδών να έγινε κατά τη διάρκεια επέκτασης του πρώτου προς αυτή. Παρατηρήσεις ωστόσο μιας αμφίδρομης μεταφοράς mtDNA σε πληθυσμούς των δύο αυτών ειδών της Ρωσίας, εγείρει τη διατύπωση

μιας τρίτης υπόθεσης, όπου η παρουσία mtDNA του είδους *L. timidus* στους Ευρωπαϊκούς λαγούς οφείλεται σε φαινόμενα υβριδισμού μεταξύ του *L. europaeus* και ατόμων τα οποία αποτελούν υβρίδια του *L. granatensis* και *L. timidus* (Melo-Ferreira *et al.* 2007).

Το μοναδικό είδος λαγού που θεωρείται ότι κατανέμεται στη Δανία είναι το *L. europaeus*. Η ανάλυση ωστόσο τμήματος της περιοχής ελέγχου του mtDNA έδειξε ότι το 5% περίπου των ατόμων που μελετήθηκαν φέρουν mtDNA του ορεσίβιου λαγού (Fredsted *et al.* 2006). Η εξαγωγή συμπερασμάτων, όσον αφορά στο κατά πόσο τα άτομα αυτά ήταν ορεσίβιοι λαγοί ή Ευρωπαϊκοί λαγοί που φέρουν mtDNA ορεσίβιου λαγού, θεωρήθηκε παρακινδυνευμένη από τη στιγμή που βασίζεται μόνο σε δεδομένα mtDNA. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τη συχνότητα των απλοτύπων "*L. timidus*", την απουσία του είδους αυτού από τη χώρα και το γεγονός ότι τα δύο είδη (*L. timidus*, *L. europaeus*) υβριδίζουν, καθιστά πολύ πιθανή την εκδοχή τα άτομα αυτά να αποτελούν Ευρωπαϊκούς λαγούς, που φέρουν mtDNA του ορεσίβιου λαγού. Η παρουσία των λαγών αυτών πιθανόν να οφείλεται στη διασπορά ή την εκ προθέσεως μετατόπιση πληθυσμών του Ευρωπαϊκού λαγού (που φέρουν mtDNA του ορεσίβιου λαγού) από τη γειτονική Σουηδία. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τη δεκαετία του 1980 στα εκτροφεία της Δανίας εισήχθησαν άτομα από πολλές Ευρωπαϊκές χώρες όπως η Ιταλία, η Γαλλία, η Ουγγαρία, αλλά και η Σουηδία (Fredsted *et al.* 2006).

Οι λαγοί της Σαρδηνίας -αν και αβέβαιης ταξινομικής κατάταξης- παρουσιάζουν, βάσει αλληλουχιών της περιοχής ελέγχου του mtDNA, στενή σχέση με αυτούς των βορείων παραλίων της Αφρικής. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν μοναδικούς απλοτύπους, ενώ δεν φαίνεται να έχουν περάσει άλλες πληθυσμιακές στενωπούς μετά τη μεταφορά τους στο νησί, ούτε έδειξαν σημάδια διείσδυσης γενετικού υλικού από άλλα είδη. Η ποικιλότητά τους, αν και χαμηλή, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην τεχνητή εισαγωγή ατόμων και στη μετέπειτα δημογραφική τους αύξηση, είναι σε θέση να τα κατατάξει τους πληθυσμούς του νησιού σε δύο διακριτές φυλογενετικές γραμμές. Η μια παρουσιάζει μεγαλύτερη αφθονία και ένα διάχυτο γεωγραφικό πρότυπο, ενώ η δεύτερη χαρακτηρίζεται από μικρότερη αφθονία και να κατανέμεται κυρίως στο νότιο τμήμα του νησιού (Scandura *et al.* 2007).

Στην περιοχή της Βαλκανικής, η ανάλυση τμήματος της περιοχής ελέγχου (CR-I) του mtDNA σε έναν σημαντικό αριθμό ατόμων της ηπειρωτικής και νησιωτικής Ελλάδας, της Κύπρου και χωρών της Βαλκανικής και της κεντρικής Ευρώπης αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο διακριτών φυλογενετικών γραμμών με προφανές φυλογεωγραφικό πρότυπο (Kasapidis *et al.* 2005). Η γεωγραφική τους κατανομή επιτρέπει την ονομασία του πρώτου ως «ανατολικό» κλάδο και του δεύτερου ως «δυτικό». Στον «ανατολικό» κλάδο περιλαμβάνονται πληθυσμοί των ανατολικών νησιών του Αιγαίου, της ανατολικής Μακεδονίας, της Θράκης, της Κύπρου, του Ισραήλ, καθώς και κάποιοι πληθυσμοί της Βουλγαρίας. Ο «δυτικός» κλάδος αποτελείται από πληθυσμούς της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Λευκάδας, της Νάξου, των Κυθήρων και της

Κρήτης καθώς και από κάποιους πληθυσμούς της Βουλγαρίας, της Ιταλίας και της κεντρικής Ευρώπης. Ο χρόνος απόκλισης των κλάδων αυτών εκτιμήθηκε στα 105.000-490.000 χρόνια πριν από σήμερα. Οι δύο αυτοί κλάδοι συνυπάρχουν γεωγραφικά στην περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας, όπου σχηματίζουν μια ζώνη επικάλυψης. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η ζώνη αυτή οφείλεται όχι μόνο στη φυσική διασπορά των πληθυσμών, αλλά και σε εκ προθέσεως μετατοπίσεις πληθυσμών από τον άνθρωπο. Το γεγονός αυτό φαίνεται να αληθεύει για τους πληθυσμούς της Βουλγαρίας, όπου η ανάμιξη των δύο κλάδων παρατηρείται σχεδόν σε ολόκληρη τη χώρα και αποτελεί πιθανώς επακόλουθο μετατοπίσεων λαγών από τις ανατολικές στις δυτικές περιοχές τη δεκαετία 1970-80 ως τμήμα δράσεων διαχειριστικών πρακτικών για το κυνήγι. Όσον αφορά στον δυτικό κλάδο, οι πληθυσμοί της ηπειρωτικής Ελλάδας, που εμφανίζονται γενετικά δομημένοι με έντονο φυλογεωγραφικό πρότυπο, είναι πολύ περισσότερο διαφοροποιημένοι από τους πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης του κλάδου αυτού. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να ερμηνευθούν από την προς τον βορρά επέκταση πληθυσμών του Ευρωπαϊκού λαγού μετά τις Παγετώδεις περιόδους (Kasapidis *et al.* 2005).

3.1.3. Αναλύσεις Μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Οι Andersson *et al.* (1999) πραγματοποίησαν την πρώτη μελέτη πληθυσμιακής γενετικής σε είδη λαγών της Ευρώπης χρησιμοποιώντας μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Στόχος τους ήταν ο εντοπισμός των γενετικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών των ειδών *L. timidus* και *L. europaeus* της Βόρειας Ευρώπης, η εκτίμηση της ενδοειδικής διαφοροποίησης και η αποτίμηση πιθανής γονιδιακής ροής μεταξύ των δύο αυτών ειδών που υβριδίζουν. Στην προσπάθειά τους να μειώσουν την πιθανότητα δειγματοληψίας υβριδίων των δύο υπό μελέτη ειδών, συνέλεξαν άτομα από αλλοπάτριους πληθυσμούς (ορεσίβιοι λαγοί από την κεντρική Νορβηγία και άτομα του Ευρωπαϊκού λαγού από τη νότια Σουηδία). Ο διαχωρισμός των δύο υπό μελέτη ειδών κατέστη δυνατός εξαιτίας σημαντικών διαφορών στις αλληλικές συχνότητες των μικροδορυφορικών τόπων που μελετήθηκαν. Δεν ήταν δυνατό να εντοπιστεί ωστόσο τυχόν ενδοειδική πληθυσμιακή δομή, αλλά ούτε και πιθανά υβρίδια. Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ των ειδών ήταν χαμηλή, γεγονός που σύμφωνα με τους συγγραφείς θα μπορούσε να οφείλεται είτε στο φαινόμενο ομοπλασίας των μικροδορυφορικών τόπων είτε σε πρόσφατο γεγονός υβριδισμού μεταξύ ατόμων του Ευρωπαϊκού λαγού με άτομα του ορεσίβιου λαγού της Σουηδίας.

Λίγο αργότερα οι Fickel *et al.* (1999) μελέτησαν τη γενετική δομή και ποικιλότητα δύο κοντινών γεωγραφικά πληθυσμών του *L. europaeus* σε περιοχή της Γερμανίας (North Rhine-Westphalia). Στις αναλύσεις τους χρησιμοποιήθηκαν 4 μικροδορυφορικοί τόποι, καθώς και τμήμα της περιοχής ελέγχου του mtDNA. Σύμφωνα με την κατανομή των απλοτύπων του mtDNA, οι δύο πληθυσμοί εμφανίζονται να είναι γενετικά δομημένοι και να

διαφέρουν σημαντικά ο ένας από τον άλλο, ως αποτέλεσμα της περιορισμένης μητρικής γονιδιακής ροής. Αντιθέτως, η κατανομή των αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων δεν ανέδειξε διαφορές μεταξύ των δύο γεωγραφικών ομαδοποιήσεων. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι ενώ το mtDNA χαρακτηρίζεται από μητρική κληρονομικότητα, οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες ως τμήματα του πυρηνικού DNA, κληρονομούνται και από τα δύο φύλα σε ίσες αναλογίες. Συμπερασματικά, τα θηλυκά άτομα των δύο πληθυσμών δεν συνεισφέρουν στη γονιδιακή ροή, όπως αυτό καθορίζεται από την κατανομή των απλοτύπων, ενώ υπεύθυνα για την ανταλλαγή γενετικού υλικού (αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων) μεταξύ των δύο πληθυσμών είναι τα αρσενικά άτομα. Αίτια μιας τέτοιας κατάστασης θα μπορούσαν να αποτελούν: α) η υψηλή φιλοπατρική συμπεριφορά των θηλυκών ατόμων και β) ο υψηλότερος, σε σχέση με τα θηλυκά, βαθμός διασποράς ή η μεγαλύτερη χωροκράτεια (home range) των αρσενικών ατόμων.

Μεταγενέστερη μελέτη της ίδιας ομάδας βάσει των ίδιων μοριακών δεικτών σε έναν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων επιβεβαιώνει τα παραπάνω αποτελέσματα (Fickel *et al.* 2005). Αναλυτικότερα, οι μέσες τιμές διαφοροποίησης των απλοτύπων κυμαίνονταν σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί για πληθυσμούς της Αυστρίας και της Γερμανίας, δείχνοντας ότι οι πληθυσμοί αυτοί είναι διαφοροποιημένοι ως προς το mtDNA τους. Αποκλίσεις από τις αναμενόμενες εκτιμήσεις υπό την υπόθεση παμμιξίας ήταν ενδεικτικές της περιορισμένης ανταλλαγής αναπαραγωγικά ενεργών θηλυκών ατόμων μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών. Η ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλότητα ήταν διπλάσια αυτής μεταξύ των πληθυσμών. Αν και παρατηρήθηκε μερική απομόνωση μεταξύ των γεωγραφικών ομαδοποιήσεων, ωστόσο αυτή δεν ακολουθούσε το πρότυπο απομόνωσης λόγω απόστασης. Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύθηκε ως αποτέλεσμα της περιβαλλοντικής διαμερισματοποίησης, η οποία οδήγησε στην δημιουργία απομονωμένων πληθυσμών, με εντονότερο το φαινόμενο της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης από αυτό της γονιδιακής ροής. Άμεση συνέπεια αυτού ήταν η διαφοροποίηση των πληθυσμών αυτών ανεξάρτητα από την μεταξύ τους γεωγραφική απόσταση. Στα θηλυκά άτομα των υπό μελέτη πληθυσμών, η τυχαία γενετική παρέκκλιση διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο από ότι η γονιδιακή ροή μέσω της μετανάστευσης αυτών. Επομένως, οι πληθυσμοί της Βορειοδυτικής Γερμανίας παρουσιάζονται γενετικά διαφοροποιημένοι σε τέτοιο βαθμό, ώστε να μην υφίστανται φαινόμενα ομομικτικού υποβιβασμού και εγκαθίδρυσης αλληλομόρφων εξαιτίας της περιορισμένης γονιδιακής ροής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τόσο τα φυσικά φράγματα όσο και αυτά που επάγονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες, φαίνεται να ασκούν μικρή επίδραση στην πληθυσμιακή δομή (Fickel *et al.* 2005).

Στη μελέτη τους οι Estomba *et al.* (2006) χρησιμοποιώντας έξι μικροδορυφορικούς τόπους παρατήρησαν έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών τριών ειδών

λαγόμορφων που κατανέμονται στην Ιβηρική χερσόνησο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων τους, το σύνολο των ατόμων της Ιβηρικής χερσονήσου βάσει μορφολογίας, προσδιορίζεται στο προκαθορισμένο για αυτά είδος. Επιπλέον τα είδη *L. granatensis* και *L. castroviejo* εμφανίζονται πιο συγγενικά μεταξύ τους από ότι με τα άτομα του είδους *L. europaeus*, το οποίο είναι ενδεικτικό της ύπαρξης ισχυρού φράγματος στην γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών των τριών υπό μελέτη ειδών, επιβεβαιώνοντας έτσι την κατάταξή τους ως διακριτά βιολογικά είδη. Η γενετική ποικιλότητα που παρατηρείται στο είδος *L. castroviejo* είναι χαμηλότερη από αυτή που παρατηρείται στους πληθυσμούς του είδους *L. europaeus* της Ιβηρικής και της Βουλγαρίας, πιθανώς αντανακλώντας την γενετική απομόνωση του είδους αυτού το οποίο χαρακτηρίζεται από περιορισμένη γεωγραφική κατανομή και μικρό αναλογικά πληθυσμιακό μέγεθος. Οι πληθυσμοί του Ευρωπαϊκού λαγού της Ιβηρικής χερσονήσου εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα γενετικής ποικιλότητας με αυτούς της Βουλγαρίας, ωστόσο σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στις κατανομές των αλληλικών τους συχνοτήτων, γεγονός ενδεικτικό της περιορισμένης μεταξύ αυτών γονιδιακής ροής.

Στην πιο πρόσφατη μελέτη τους οι Thulin *et al.* (2006a) συνδύασαν την πληροφορία που παρέχεται από μοναδικούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς του mtDNA (SNPs) με δεδομένα που προκύπτουν από επτά μικροδορυφορικούς τόπους, έχοντας ως στόχο την διερεύνηση πιθανής διείσδυσης γενετικού υλικού μεταξύ των ειδών *L. europaeus* και *L. timidus* στην ευρύτερη ζώνη υβριδισμού των δύο αυτών ειδών στην Ρωσία. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις πεδίου, άτομα του είδους *L. europaeus* στα βορειότερα τμήματα της κατανομής τους, εμφανίζουν διαβάθμιση ως προς τον χρωματισμό του τριχώματός τους. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα υβριδισμού των δύο συμπάτριων στην περιοχή ειδών, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν μέχρι σήμερα επιστημονικά τεκμηριωμένες μελέτες που να επαληθεύουν τέτοιου είδους ισχυρισμούς. Τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των πληθυσμών αυτών παρουσιάζουν έναν μικρό αριθμό δειγμάτων, τα οποία ως προς το mtDNA κατατάσσονται στο είδος *L. europaeus*, ενώ ως προς το πυρηνικό τους γονιδίωμα στο είδος *L. timidus*. Το γεγονός αυτό κατά τους συγγραφείς αποτελεί ένδειξη διείσδυσης γονιδιώματος από το είδος *L. europaeus* στο είδος *L. timidus*, κάτι το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά στην επιστημονική βιβλιογραφία των ειδών αυτών. Εξαίρεση αποτελεί ο εντοπισμός ενός τέτοιου ατόμου στη Σουηδία που συλλέχθηκε στο βορειότερο άκρο κατανομής του είδους *L. europaeus*, όπου η πυκνότητά του είναι κατά πολύ χαμηλότερη από αυτή των πληθυσμών του είδους *L. timidus*. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε τους συγγραφείς στην υπόθεση ότι ο υβριδισμός μεταξύ των δύο αυτών ειδών είναι πολύ πιθανό να είναι άμεσα εξαρτώμενος από τη συχνότητα του κάθε είδους στην εκάστοτε μελετώμενη περιοχή (Thulin *et al.* 2006a).

3.1.4 Συμπεράσματα επί των γενετικών μελετών του είδους *L. europaeus*

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από τις γενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το είδος *L. europaeus* στην Ευρώπη, αυτό που μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα είναι ότι αποτελεί διακριτή οντότητα έναντι των υπολοίπων ειδών που κατανέμονται στην ήπειρο. Η πλειοψηφία των μελετών, ενώ είναι σε θέση να διακρίνει, βάσει γενετικού υλικού, τα προκαθορισμένα από την ταξινομική είδη, αδυνατεί να προσδιορίσει τις ενδοειδικές τους σχέσεις. Μελέτες που βασίζονται στην ανάλυση αλληλοεξέλιξης, καθώς και τη γονοτύπηση άλλων πρωτεϊνικών τόπων, ανιχνεύουν υψηλή ενδοειδική διαφοροποίηση, η οποία δεν αντανακλά τις μεταξύ των πληθυσμών γεωγραφικές αποστάσεις και αδυνατεί να προσδιορίσει τα όρια των υφιστάμενων πληθυσμών. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν εν μέρει απόρροια του μικρού δειγματοληπτικού μεγέθους, της περιορισμένης έκτασης της υπό μελέτη περιοχής, καθώς και της μειωμένης διακριτικής ικανότητας των μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές. Αντιθέτως, η μελέτη των πολυμορφισμών σε επίπεδο mtDNA είτε με μεθοδολογίες που περιλαμβάνουν τη γονοτύπηση είτε την αλληλούχηση τμημάτων αυτού, εστιάζει σε μεγαλύτερο βαθμό στις ενδοειδικές εξελικτικές διαδικασίες, που έλαβαν χώρα το τελευταίο 1 εκατομμύριο χρόνια. Τέλος, μελέτες που βασίζονται στη γονοτύπηση πολυμορφικών πυρηνικών τόπων, όπως οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες, βοηθούν στην διερεύνηση των εξελικτικών διεργασιών δίνοντας μεγαλύτερη έμφαση στις διαπληθυσμιακές σχέσεις του είδους.

Όσον αφορά στις μέχρι σήμερα γνώσεις μας για το είδος στις περιοχές της Ευρώπης που έχουν μελετηθεί, μπορούν να ειπωθούν τα παρακάτω:

- Οι πληθυσμοί του είδους στην Ιβηρική χερσόνησο παρουσιάζουν υψηλή ενδοειδική διαφοροποίηση, χωρίς ωστόσο το πρότυπό της να αντικατοπτρίζει τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων. Το μεγαλύτερο ποσοστό της παρατηρούμενης διαφοροποίησης οφείλεται στην παρουσία στα άτομα αυτά mtDNA πολύ συγγενικού με αυτό του ορεσίβιου λαγού. Η επέκταση του είδους στην Ιβηρική ακολούθησε αυτή του ορεσίβιου λαγού. Τέλος, η ποικιλότητα των πληθυσμών της περιοχής που είναι παρόμοια με τους πληθυσμούς του είδους της Βουλγαρίας, είναι ενδεικτική της ύπαρξης φράγματος στη γονιδιακή ροή μεταξύ αυτού και των δύο ενδημικών ειδών της χερσονήσου.
- Στη Σουηδία, τα αρσενικά άτομα του είδους φαίνεται να υβριδίζουν με θηλυκά άτομα του ορεσίβιου λαγού στη ζώνη επαφής τους, ενώ παράλληλα δεν παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών.
- Οι πληθυσμοί του είδους της Ρωσίας, όντας συμπάτριοι με πληθυσμούς του ορεσίβιου λαγού, υβριδίζουν με ανάστροφο τρόπο από αυτόν των λαγών της Σουηδίας. Αποτέλεσμα αυτού είναι η παρουσία ατόμων ορεσίβιου λαγού που φέρουν

mtDNA του Ευρωπαϊκού λαού. Το γεγονός αυτό εγείρει υποθέσεις πυκνο-εξαρτώμενου υβριδισμού.

- Στους πληθυσμούς του είδους της Αγγλίας, της Αυστρίας, της Γερμανίας, της Πολωνίας και της Ουγγαρίας δεν εντοπίζονται διακριτές γενετικές δεξαμενές.
- Στην Ιταλική χερσόνησο το είδος θεωρείται ότι εποίκησε την περιοχή μεταγενέστερα από το ενδημικό είδος της χώρας *L. corsicanus*, επιπλέον εμφανίζεται αναπαραγωγικά απομονωμένο, ενώ υπάρχουν ενδείξεις απότομης πληθυσμιακής αύξησης που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία 25.000 χρόνια.
- Οι πληθυσμοί της Βουλγαρίας παρουσιάζουν σχετικά αυξημένα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, η διαφοροποίηση ωστόσο των τοπικών γενετικών δεξαμενών είναι περιορισμένη. Αυτό πιθανόν οφείλεται στις δράσεις μετατοπίσεων του παρελθόντος, ενώ είναι χαρακτηριστικός ο μικρός βαθμός γονιδιακής ροής από περιοχές της Βόρειας Ελλάδας.
- Στην περιοχή της πρώην Γιουγκοσλαβίας οι πληθυσμοί του είδους, αν και εμφανίζουν υψηλότερη ποικιλότητα από τους πληθυσμούς της Αυστρίας, της Πολωνίας και της Βουλγαρίας, δεν μπορούν να αποδοθούν σε διακριτές πληθυσμιακές οντότητες.
- Στον Ελλαδικό χώρο η διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους είναι κατά πολύ υψηλότερη από αυτή που παρατηρείται στις υπόλοιπες περιοχές της Ευρώπης με εξαίρεση αυτή των πληθυσμών της Ιβηρικής, όπου παρατηρείται διείσδυση του γονιδιώματος του ορεσίβιου λαού. Τα αποτελέσματα των μέχρι σήμερα μελετών είναι ενδεικτικά ύπαρξης γενετικής δομής των Ελληνικών πληθυσμών ακόμα και σε μικρο-γεωγραφική κλίμακα.
- Τέλος, οι πληθυσμοί της Ανατολίας, που είναι πιο συγγενικοί με αυτούς της Ελλάδας, παρουσιάζουν πλουσιότερη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς του είδους που έχουν μελετηθεί, ενώ σημαντική διαφοροποίηση παρουσιάζεται μόνο μεταξύ των πιο απομακρυσμένων πληθυσμών.

Βάσει των μελετών για τις οποίες έγινε λόγος παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι οι γενετικές αναλύσεις, που έχουν πραγματοποιηθεί για τους πληθυσμούς του *L. europaeus* και οι οποίες βασίζονται στα αλλοένζυμα δεν έχουν αποκαλύψει ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των ατόμων από διάφορα σημεία της Ευρώπης. Από την άλλη πλευρά, μελέτες του mtDNA με τη χρήση πολυμορφισμών περιοριστικών θραυσμάτων (RFLPs) ή άμεση αλληλούχηση τμημάτων του mtDNA δείχνουν διαφορετικά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών για ολόκληρη την Ευρώπη, χωρίς όμως να είναι δυνατή η εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων από τα δεδομένα που προκύπτουν, με εξαίρεση πληθυσμούς του είδους που κατανέμονται στην Ελλάδα. Οι μελέτες που βασίζονται στις αναλύσεις μικροδορυφορικών αλληλουχιών αν και ελάχιστες, δείχνουν ότι με τη χρήση τους, είναι

εφικτός ο εντοπισμός των εξελικτικών διαδικασιών που έλαβαν χώρα στο πρόσφατο παρελθόν. Επιπρόσθετα, η συνδυασμένη ανάλυση τμήματος αλληλουχίας του mtDNA και μικροδορυφορικών αλληλουχιών μπορεί να αποκαλύψει με ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια τα εξελικτικά μονοπάτια του είδους αφού η χρήση του πρώτου ως μοριακό εργαλείο επιτρέπει την σε βάθος χρόνου και μεγαλύτερης γεωγραφικής έκτασης μελέτη της φυλογένεσης του είδους και η χρήση των μικροδορυφορικών τόπων, την πιο πρόσφατη και σε μικρότερη γεωγραφική κλίμακα εξέλιξη των πληθυσμών, διευκρινίζοντας τυχόν φαινόμενα μερικής οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού. Παράλληλα, το γεγονός ότι η Βαλκανική χερσόνησος αποτέλεσε ένα από τα σημαντικότερα καταφύγια ειδών κατά τις Παγετώδεις περιόδους στην Ευρώπη, σε συνδυασμό με τον μικρό αριθμό δεδομένων που υπάρχουν από αυτή για το είδος, καθιστά τη μελέτη των πληθυσμών της περιοχής με χρήση συνδυασμού γενετικών δεικτών, απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση του ρόλου της στην διαφοροποίηση και διασπορά του είδους κατά το Πλειστόκαινο.

4. Στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελούν:

1. η διερεύνηση της υπάρχουσας πληθυσμιακής δομής του είδους *L. europaeus* στην Βαλκανική χερσόνησο με έμφαση στον ελληνικό χώρο, όπως αυτή περιγράφεται από την κατανομή των γονοτύπων στο χώρο και τον χρόνο και αποτελεί απόρροια τόσο των σύγχρονων διαδικασιών, όσο και των ιστορικών διαδικασιών του παρελθόντος
2. η ολοκληρωμένη μελέτη του Ελλαδικού χώρου και η σύγκριση της ποικιλότητας που παρουσιάζει με περιοχές εκτός αυτού και
3. η αποσαφήνιση της εξελικτική ιστορίας του είδους σε μια περιοχή που αποτέλεσε καταφύγιο για το είδος τις τελευταίες Παγετώδεις περιόδους, καθώς και των μεταναστευτικών δρόμων που αυτό ακολούθησε

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα από όλο το εύρος της κατανομής του είδους στην περιοχή μελέτης, και χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός μοριακών δεικτών (mtDNA και μικροδορυφορικών αλληλουχιών) ικανών να ανιχνεύσουν γεγονότα που έλαβαν χώρα σε τοπική αλλά και σε ευρύτερη γεωγραφική κλίμακα, καθώς επίσης και σε βάθος χρόνου αλλά και στο εγγύτερο παρελθόν.

Κεφάλαιο ΙΙ

Ιδιαιτερότητες πληθυσμών του είδους στην Κρήτη

1. Ενδείξεις φθινοπωρινής αναπαραγωγής σε πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαού της Κρήτης**1.1 Γενικά στοιχεία για την αναπαραγωγή των λαών**

Θεμελιώδεις έννοιες της βιολογίας ενός είδους αποτελούν η δομή και δυναμική των φυσικών πληθυσμών, οι οποίες αντικατοπτρίζονται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος και το πρότυπο της χωροταξικής ποικιλότητας στη δημογραφία, και στην πληθυσμιακή ανάπτυξη (Rodenhouse *et al.* 1997). Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση της ποικιλότητας στο χώρο αποτελεί πρόκληση με μεγάλο βαθμό δυσκολίας. Εξαιτίας αυτού, κρίνεται απαραίτητος ο έμμεσος προσδιορισμός της πληθυσμιακής ανάπτυξης, μέσω της εκτίμησης άλλων παραμέτρων. Κάποιες από τις σημαντικότερες δημογραφικές παραμέτρους που καθορίζουν την πληθυσμιακή ανάπτυξη είναι η αναπαραγωγή, η επιβίωση και η διασπορά των οργανισμών. Από αυτές τις τρεις, η πιο εύκολα μετρήσιμη παράμετρος είναι αυτή της αναπαραγωγής (Keith 1981).

Οι ζωικοί οργανισμοί έρχονται συχνά αντιμέτωποι με τις έντονες μεταβολές του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν μόνο τα άτομα εκείνα που φέρουν χαρακτηριστικά προσαρμογής σε αυτές. Απαραίτητο στοιχείο για την εξασφάλιση της επιβίωσης του είδους, είναι ο συγχρονισμός της αναπαραγωγικής του δραστηριότητας με τις περιόδους εκείνες του χρόνου, όπου οι συνθήκες είναι οι βέλτιστες για την επιβίωση των απογόνων (Pèvet 1987).

Αρκετές είναι οι μέχρι σήμερα γνωστές περιβαλλοντικές παράμετροι, όπως η διάρκεια της ημέρας, η θερμοκρασία, η βροχόπτωση, η διαθεσιμότητα της τροφής κ.α., που έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν ερεθίσματα για τους ζωικούς οργανισμούς, βάσει των οποίων ενεργοποιούνται αλλαγές στην αναπαραγωγική τους δραστηριότητα. Ωστόσο, ανάλογα με τον βίοτοπο στον οποίο διαβιού ένας οργανισμός, κάποιες από αυτές προβλέπουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τις προσεχείς περιβαλλοντικές καταστάσεις από ότι άλλες. Επιπρόσθετα, οι ζωικοί οργανισμοί όντας στο φυσικό τους ενδιαίτημα δεν υπόκεινται ποτέ σε έναν και μόνο παράγοντα τη φορά, αλλά αντιθέτως στη μεταβολή του συνόλου των περιβαλλοντικών παραμέτρων (Pèvet 1987). Επομένως, η διατύπωση γενικών κανόνων για τους κύκλους αναπαραγωγής διαφορετικών ειδών θηλαστικών καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη, ιδιαίτερα αν λάβει κανείς υπόψη ότι η αναπαραγωγική δραστηριότητα επηρεάζεται από σειρά παραγόντων, οι οποίοι ποικίλλουν από περιοχή σε περιοχή και στα διαφορετικά είδη. Σε αρκετές περιπτώσεις έχουν αναφερθεί διαφορές ακόμα και μεταξύ διακριτών

πληθυσμών του ίδιου είδους, οι οποίοι ζουν σε περιοχές με διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως το γεωγραφικό πλάτος, το κλίμα, η βλάστηση, η θήρευση κ.α.). Αυτή η πλαστικότητα παρουσιάζεται σε έντονο βαθμό στο είδος *Lepus americanus*, όπου η έναρξη και ο τερματισμός της αναπαραγωγικής του περιόδου ποικίλλει από περιοχή σε περιοχή και από χρονιά σε χρονιά. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί επίσης και σε άλλα είδη λαγών (Keith 1981). Ένα ακόμα παράδειγμα μιας τέτοιας διαφοροποίησης θα μπορούσε να αποτελεί και ο Ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*, Pallas), μιας και αποτελεί είδος με μεγάλο εύρος κατανομής που διαβίει σε μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων αντιπροσωπευτικών ακόμα και των πιο ακραίων μορφών των χερσαίων οικοσυστημάτων (π.χ. έρημος του Ισραήλ και βόρεια δάση της Σουηδίας, Macdonald & Barret 1995).

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και αφορούν στη βιολογία της αναπαραγωγής του είδους *L. europaeus* είναι πολυάριθμες και εστιάζονται τόσο σε φυσικούς πληθυσμούς (στην Ευρώπη από τους: Kolosov 1941, Raczynski 1964, Lincoln 1974, Hewson & Taylor 1975, Pielowski & Raczynski 1976, Frylestam 1980, Broekhuizen & Maaskamp 1981, Kovács 1983, Pepin 1987, Hansen 1992, Marboutin *et al.* 2003), όσο και σε πληθυσμούς που έχουν εισαχθεί σε διάφορες χώρες του κόσμου (στην Αργεντινή από τους Bonino & Montenegro 1997, στον Καναδά από τους Reynolds & Stinson 1959, στη Νέα Ζηλανδία από τους Flux 1967 και Parkes 1989 και στην Αυστραλία από τους Stott & Harris 2006). Η πλειονότητα των μελετών που προαναφέρθηκαν, επικεντρώνεται σε πληθυσμούς μέσου γεωγραφικού πλάτους, καθώς και σε αυτούς που διαβιούν στα βορειότερα σημεία κατανομής του είδους. Συνέπεια αυτού αποτελεί η έλλειψη πληροφορίας, όσον αφορά στα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των νοτιότερων πληθυσμών του είδους. Αν και ο ετήσιος αναπαραγωγικός κύκλος όπως και η δημογραφία του είδους θεωρούνται αρκετά καλά γνωστοί τομείς της βιολογίας του, με χαρακτηριστική την αναπαραγωγική αδράνεια κατά τους φθινοπωρινούς μήνες, ωστόσο αξιοσημείωτες διακυμάνσεις έχουν παρατηρηθεί στις διαφορετικές χρονιές. Η αναπαραγωγική περίοδος του είδους ξεκινά τον Ιανουάριο και διαρκεί μέχρι τον Σεπτέμβρη (σε εξαιρετικές περιπτώσεις διαρκεί μέχρι και τον Οκτώβρη). Σε περιοχές που επικρατούν δριμείς χειμώνες (όπως στην Λιθουανία, Likevičienė 1962 και στη Ρωσία, Korneev 1960 από Raczynski 1964), η αναπαραγωγή μπορεί να μην αρχίσει έως τον Μάρτιο, οπότε βελτιώνονται οι καιρικές συνθήκες. Αντιθέτως, στις περιπτώσεις εκείνες που παρατηρούνται ήπιοι χειμώνες, θηλυκά άτομα σε κατάσταση εγκυμοσύνης παρατηρούνται εξαιρετικά νωρίς στην αναπαραγωγική περίοδο (π.χ. Stieve 1952, Hay 1953, Likevičienė 1962, Raczynski 1964, Möller 1976). Από τα παραπάνω, γίνεται σαφής η επιρροή των τοπικών κλιματολογικών συνθηκών στην αναπαραγωγική περίοδο. Η συνεισφορά τους στις μεταβολές, τόσο της έναρξης όσο και λήξης της, είναι σημαντική με άμεσες συνέπειες στη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (Flux 1967, Hewson & Taylor 1975, Cary & Keith 1979).

Το γεωγραφικό πλάτος και η μέση θερμοκρασία αποτελώντας αλληλοσχετιζόμενους παράγοντες, συνδέονται έως ένα βαθμό με τους άμεσους παράγοντες καθορισμού της διάρκειας της αναπαραγωγικής περιόδου (Keith 1981). Διαφορές στη διάρκειά της, έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη βιολογία της αναπαραγωγής του οργανισμού και ενδέχεται να οδηγήσουν σε διαφορετικές στρατηγικές αναπαραγωγής σε τμήμα των πληθυσμών του είδους. Κάποιες από τις διαφορές αυτές έχουν αποδειχθεί να είναι δείκτες μιας πολύ πιο θεμελιώδους διαφοροποίησης, αυτής του γενετικού υλικού. Παράδειγμα τέτοιου είδους διαφοροποίησης αποτελούν οι μεταβολές που παρατηρούνται στον αριθμό των νεογνών που παράγονται ανά γέννα σε πληθυσμούς του είδους *L. americanus* που διαβιούν σε περιοχές διαφορετικού γεωγραφικού πλάτους (Keith *et al.* 1966).

Αν και το φαινόμενο της συγχρονισμένης αναπαραγωγής αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των περισσότερων ειδών του γένους *Lepus* (αμερικανικός λαγός, λαγός της Καλιφόρνιας και πιθανώς αρκτικός λαγός), ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στους πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού, μιας και δεν παρατηρούνται σαφώς διακριτές ημερομηνίες σύλληψης διαδοχικών γεννήσεων. Εξαιρέση θα μπορούσαν να αποτελέσουν πληθυσμοί που διαβιούν στα βορειότερα όρια της κατανομής του είδους, όπως π.χ. στη Ρωσία, όπου η αναπαραγωγική περίοδος είναι αισθητά μειωμένη (Keith 1981).

Η χρονική στιγμή, κατά την οποία συνήθως αρχίζει η αναπαραγωγή, φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τον μέσο αριθμό γεννήσεων των τοπικών πληθυσμών (π.χ. όπως στον αμερικανικό λαγό), ο οποίος με τη σειρά του αντανακλά σε μεγάλο βαθμό τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (βλ. Keith 1981 και εκεί αναφερόμενα παραδείγματα). Σύμφωνα με παρατηρήσεις, ο αριθμός των νεογνών ανά γέννα, ο οποίος κυμαίνεται από ένα έως δεκατρία για το είδος (Averianov *et al.* 2003), είναι αντιστρόφως ανάλογος με τη μέση ετήσια θερμοκρασία με αποτέλεσμα να αυξάνεται όσο αυτή μειώνεται (Flux 1967). Ωστόσο, αξιοσημείωτες αποκλίσεις έχουν αναφερθεί, όσον αφορά στον αριθμό των νεογνών ανά γέννα εντός της αναπαραγωγικής περιόδου (Flux 1967, Hewson & Taylor 1975, Pielowski 1976).

Στον Ευρωπαϊκό λαγό, η μεταβλητότητα της γονιμότητας στη διάρκεια του χρόνου αποτελεί παράγοντα εξέχουσας σημασίας, μιας και θεωρείται ότι διαδραματίζει αποφασιστικό ρόλο στη διακύμανση του πληθυσμιακού μεγέθους (Möller 1971, Pielowski 1976, Pielowski & Raczyński 1976) μαζί με άλλες λιγότερο καταφανείς μεταβλητές, όπως η επιβίωση των νεαρών ατόμων, οι καιρικές συνθήκες και η θήρευση (Keith 1981). Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει τη γονιμότητα, είναι το ποσοστό των ενεργών αναπαραγωγικά θηλυκών ατόμων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (βλ. Martinet 1980, Möller 1980, Pépin *et al.* 1981), μεταβλητή η οποία είναι σχετικά εύκολο να μετρηθεί.

Η πληροφορία που σχετίζεται με τη βιολογία της αναπαραγωγής των Ευρωπαϊκών λαγών σε διαφορετικές περιβαλλοντικές και τοπογραφικές συνθήκες, αποτελεί τμήμα θεμελιώδους γνώσης, βάσει της οποίας θα καταστεί δυνατή η αποσαφήνιση πολλών ερωτημάτων γύρω από τη βιολογία του είδους. Επιπλέον, η μελέτη των πληθυσμών ενός είδους που έχει προσαρμοστεί αρκετά καλά σε ετερογενή και ακραία αρκετές φορές περιβάλλοντα θα διευκολύνει τη διατύπωση βásiμων προβλέψεων, όσον αφορά στις επιπτώσεις του φαινομένου του θερμοκηπίου στις διάφορες μορφές του πλανήτη (Di Prisco & Verde 2006).

Η πλαστικότητα που εκφράζεται στον αναπαραγωγικό κύκλο του Ευρωπαϊκού λαγού, αποτελεί ένδειξη αρμοστικότητας των πληθυσμών του είδους στις διάφορες συνθήκες, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί ή όχι στη μεταξύ τους γενετική διαφοροποίηση. Λαμβάνοντας υπόψη τα μέχρι σήμερα δημοσιευμένα δεδομένα, καθώς και την επίδραση των τοπικών περιβαλλοντικών συνθηκών και του τοπίου στην αναπαραγωγική δραστηριότητα του είδους, η διατύπωση γενικότερων συμπερασμάτων όσον αφορά στην αναπαραγωγή του είδους σε ολόκληρο το εύρος κατανομής του κρίνεται ανέφικτη. Η διεξαγωγή μακροχρόνιων μελετών σε περιοχές που παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά θα διευκολύνει την εξαγωγή γενικότερων συμπερασμάτων χωρίς ωστόσο να συνεπάγεται την καθολική τους ισχύ. Έχοντας όλα τα παραπάνω στο μυαλό και γνωρίζοντας την εντυπωσιακά υψηλή γενετική ποικιλότητα που παρατηρείται στους πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού στην Ελλάδα (Kasapidis *et al.* 2005, αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσής μου και της παρούσας διδακτορικής διατριβής) σε αντίθεση με αυτήν που παρατηρείται στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη (π.χ. Hartl *et al.* 1993, Suchentrunk *et al.* 1998, Suchentrunk *et al.* 2000), είναι πολύ πιθανό η μελέτη περιοχών που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές ιστορικές, κλιματολογικές και τοπογραφικές παραμέτρους, να αποκαλύψει νέους παράγοντες υπεύθυνους για τη διαμόρφωση της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς του είδους.

Η Κρήτη αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα νησιά της Ελλάδας στο χώρο του Αιγαίου, όπου οι λαγοί φτάνουν σε αρκετά μεγαλύτερες πυκνότητες από αυτές που παρατηρούνται στους υπόλοιπους πληθυσμούς της χώρας (προσωπική επικοινωνία με κυνηγούς και Κυνηγετικούς συλλόγους του νησιού). Ενδείξεις υπάρχουν επίσης ότι η αναπαραγωγή των πληθυσμών του νησιού δεν περιορίζεται στη μέχρι σήμερα αποδεκτή, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για το είδος περίοδο, αλλά είναι συνεχής με αναπαραγωγικώς ενεργά άτομα να παρατηρούνται καθόλη τη διάρκεια του χρόνου. Η παντελής έλλειψη δεδομένων στη διεθνή βιβλιογραφία, όσον αφορά στην αναπαραγωγή του είδους στην Ελλάδα, καθώς και οι αξιοσημείωτες διαφορές που παρατηρούνται στις μελέτες που ήδη έχουν πραγματοποιηθεί, καθιστά τα δεδομένα της παρούσας μελέτης σημαντική πληροφορία για την αναπαραγωγή του είδους. Τα δεδομένα αυτά, συνιστούν την πρώτη δημοσιευμένη πληροφορία για την

αναπαραγωγή του Ευρωπαϊκού λαγού σε Μεσογειακά οικοσυστήματα. Τέτοιου είδους πληροφορία, εκτός των άλλων, κρίνεται εξέχουσας σημασίας, γιατί μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για την πρόβλεψη των επιπτώσεων του φαινομένου του θερμοκηπίου στην δυναμική των πληθυσμών ειδών που εξαπλώνονται σε βορειότερες περιοχές.

Με στόχο την καλύτερη δυνατή αξιοποίηση των διαθέσιμων δεδομένων, καθώς και την διερεύνηση της εγκυρότητας της προαναφερθείσας από τους κυνηγούς δήλωσης (συνεχής αναπαραγωγή των λαγών της Κρήτης), πραγματοποιήθηκε σειρά στατιστικών αναλύσεων. Στην προσπάθειά μας να αποφύγουμε την υπερτόνιση των δεδομένων, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει ενδεχομένως σε παραπλανητικά αποτελέσματα, αρκεστήκαμε στην πραγματοποίηση των πιο βασικών εξ αυτών, δεδομένης της ετερογένειας των παρατηρήσεων που αφορούν στην αναπαραγωγή του είδους στην Κρήτη.

1.2 Υλικά και Μέθοδοι

Περιοχή Μελέτης

Το νησί της Κρήτης εντοπίζεται στο νοτιότερο τμήμα της Ελληνικής επικράτειας και καταλαμβάνει έκταση 8.265 τετ. χλμ.. Χαρακτηρίζεται από έντονο ανάγλυφο με αρκετούς κύριους ορεινούς όγκους που το υψόμετρό τους φτάνει αυτό της πλειοψηφίας των ορεινών όγκων της ηπειρωτικής Ελλάδας (μέγιστο υψόμετρο που προσεγγίζει τα 2.500 m).

Το κλίμα της Κρήτης χαρακτηρίζεται ως τυπικό Μεσογειακό. Εξαιτίας της γεωγραφικής θέσης του νησιού, το κλίμα είναι ήπιο και παραλιακό με εξαίρεση τις πιο ορεινές περιοχές όπου το κλίμα είναι ορεινό (Matzarakis *et al.* 2005).

Όσον αφορά στις διακυμάνσεις στη θερμοκρασία του αέρα, στην κρύα και βροχερή περίοδο κατά τους μήνες Οκτώβρη έως Μάρτη, οι χαμηλότερες θερμοκρασίες παρατηρούνται κατά τη διάρκεια του Ιανουαρίου και του Φεβρουαρίου. Η ελάχιστη θερμοκρασία του αέρα για τους μήνες αυτούς ποικίλλει από 7-9 °C στις παραθαλάσσιες περιοχές, 4-6 °C στην ενδοχώρα, ενώ ακόμα χαμηλότερες θερμοκρασίες επικρατούν στις ορεινές περιοχές. Γενικότερα κατά την περίοδο αυτή, οι πεδιάδες που βρίσκονται στο ανατολικό τμήμα του νησιού αποτελούν τις λιγότερο ψυχρές περιοχές της Ελλάδας (Matzarakis *et al.* 2005).

Η θερμή και ξηρή περίοδος που εκτείνεται από τον Απρίλη έως τον Σεπτέμβρη, χαρακτηρίζεται από σχεδόν ολοκληρωτική απουσία των βροχοπτώσεων, και ελαφρώς θερμές θερμοκρασίες. Οι θερμότεροι μήνες της περιόδου αυτής είναι ο Ιούλιος και ο Αύγουστος. Η μέση μέγιστη θερμοκρασία αέρα κατά τη διάρκεια των δύο αυτών μηνών κυμαίνεται από 28-32 °C, αρκετές φορές φτάνει τους 34-36 °C ενώ σπάνια προσεγγίζει τους 40 °C κυρίως στις πεδιάδες της ενδοχώρας στη νότια Κρήτη. Ο Ιούνιος παρουσιάζει περίπου τα ίδια επίπεδα θερμοκρασίας με αυτά του Σεπτέμβρη, με αποτέλεσμα ο τελευταίος να θεωρείται καλοκαιρινός μήνας στην Κρήτη. Η μέση ετήσια βροχόπτωση μειώνεται από τα δυτικά προς τα ανατολικά και από το βορρά προς τον νότο (κυμαίνεται από 500 mm έως 1200 mm) ενώ αυξάνει με το υψόμετρο (φτάνει τα 1600 mm στον ορεινό όγκο των Λευκών Ορέων στη δυτική Κρήτη, Matzarakis *et al.* 2005).

Ο κυρίαρχος τύπος ενδιαιτήματος του νησιού είναι τα φρύγανα με το είδος *Sarcopoterium spinosum* να υπερτερεί ως προς την αφθονία (27,32%), ακολουθούμενος από τις καλλιέργειες (23,69%), τα δάση *Olea* και *Ceratonia* (20,69%), τους βοσκότοπους (5,38%), τα Μεσογειακά πευκοδάση (4,84%), τα Κυπαρισσο-δάση (*Acerο Cupression*, 4,02%) και τα Ορο-Μεσογειακά φρύγανα (3,52%). Αν και άλλοι τύποι ενδιαιτημάτων υπάρχουν επίσης στο νησί, ωστόσο αυτοί αντιπροσωπεύονται από χαμηλότερα ποσοστά (Sarris *et al.* 2005).

Κυνηγετική Περίοδος και συλλογή δεδομένων

Στην Ελλάδα, οι λαγοί προστατεύονται επισήμως από τα μέσα Ιανουαρίου έως τα μέσα Σεπτεμβρίου. Ο κανονισμός αυτός αποσκοπεί στη διασφάλιση της αδιατάραχτης αναπαραγωγικής περιόδου του είδους. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, αποτελούν πληροφορία για άτομα λαγών που συλλήφθηκαν κατά τη διάρκεια της κυνηγετικής περιόδου (από τα μέσα Σεπτεμβρίου έως τα μέσα Ιανουαρίου) σε δύο διαδοχικές χρονιές (2001-02 και 2002-03). Όλες οι περιοχές δειγματοληψίας αποτελούν τμήματα κοινοτικών περιοχών, στις οποίες επιτρέπεται η κυνηγετική δραστηριότητα και όπου ο κάθε κυνηγός συνέλεξε το θήραμα με ή χωρίς τη βοήθεια κυνηγόσκυλου. Ερωτηματολόγια στάλθηκαν σε όλους τους κυνηγετικούς συλλόγους της Κρήτης, καθώς και σε κυνηγούς που κατείχαν επίσημη άδεια από το κράτος. Στα ερωτηματολόγια αυτά, οι κυνηγοί μπορούσαν να καταγράψουν την ακριβή τοποθεσία σύλληψης του θηράματος, το κατά προσέγγιση βάρος του, το φύλο του, την αναπαραγωγική του κατάσταση (καταγραφή που πραγματοποιήθηκε μόνο για τα θηλυκά άτομα βάσει χαρακτηριστικών εγκυμοσύνης ή/και θηλασμού τα οποία ήταν δυνατόν να εξακριβωθούν με οπτική επαφή και ανατομή του ζώου) και σε περίπτωση εγκυμοσύνης, τον αριθμό των εμβρύων που κυοφορούσε το θηλυκό άτομο. Πρόσθετα δείγματα αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια του Φεβρουαρίου και για τις δύο χρονιές που πραγματοποιήθηκε η συλλογή των δεδομένων. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από λαθροκυνηγούς του είδους, μιας και ο μήνας αυτός δεν περιλαμβάνεται στην κυνηγετική περίοδο, και η πρόσβασή μας στα στοιχεία αυτά έγινε εφικτή μέσω των κυνηγετικών συλλόγων και της δράσης της θηροφυλακής που ενεργεί με στόχο την πάταξη της λαθροθηρίας. Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις ήταν: συνολικός αριθμός των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων, συχνότητες των αναπαραγωγικά μη ενεργών θηλυκών, των θηλυκών ατόμων που εγκυμονούσαν και των θηλυκών ατόμων που θήλαζαν, και τέλος μέσος αριθμός νεογνών που παράγονται σε μια γέννα από κάθε θηλυκό άτομο.

Ο συνολικός αριθμός ατόμων που συλλέχθηκε στη διάρκεια των δύο κυνηγετικών περιόδων, ήταν 366. Ωστόσο, οι περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο βάσει των ατόμων εκείνων που παρουσίαζαν αναπαραγωγική δραστηριότητα ή ήταν τουλάχιστον εν δυνάμει ενεργά ως προς την αναπαραγωγή. Η κατηγοριοποίηση των ατόμων σε αναπαραγωγικά ικανά και μη έγινε λαμβάνοντας υπόψη το κατά προσέγγιση βάρος τους. Αναλυτικότερα, τα άτομα εκείνα που ζύγιζαν λιγότερο από το ελαφρύτερο κυοφορούν θηλυκό, θεωρήθηκαν ως μη αναπαραγωγικά ικανά. Ο διαχωρισμός αυτός προκύπτει από το γεγονός ότι τα άτομα εκείνα που είναι σε θέση να αναπαραχθούν έχουν θεωρητικά φτάσει και στο αναμενόμενο αναπτυξιακό στάδιο, ενδεικτικό του οποίου μπορεί να θεωρηθεί το βάρος του οργανισμού. Η παραπάνω συνθήκη οδήγησε στη μείωση του συνολικού αριθμού των ατόμων που αναλύθηκαν, τα οποία πλέον αποτελούνταν από 178 θηλυκά και 143 αρσενικά φτάνοντας στο σύνολό τους τα 321 άτομα. Επιπρόσθετα, όσον αφορά στα αναπαραγωγικά

ικανά θηλυκά άτομα, αυτά χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες οι οποίες είναι: α. τα άτομα που δεν εγκυμονούσαν και δεν αναφέρθηκε να θηλάζουν (αναπαραγωγικώς ανενεργά), β. τα άτομα που θηλάζαν (αναπαραγωγικώς ενεργά, θηλάζοντα) και γ. τα άτομα που εγκυμονούσαν (αναπαραγωγικώς ενεργά, εγκυμονούντα).

Ανάλυση Δεδομένων

Για την καλύτερη δυνατή διαχείριση των δεδομένων και με στόχο τη σύγκριση της αναπαραγωγικής δραστηριότητας των πληθυσμών της Κρήτης με αυτή πληθυσμών άλλων περιοχών, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των διμηνιαίων τιμών των υπό μελέτη παραμέτρων. Οι τιμές αυτές εκτιμήθηκαν με την ένωση των παρατηρήσεων δύο διαδοχικών μηνών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η κάθε κυνηγετική περίοδος να χωριστεί σε τρία διακριτά χρονικά διαστήματα ως εξής: Σεπτέμβρης-Οκτώβρης, Νοέμβρης-Δεκέμβρης και Ιανουάριος-Φεβρουάριος.

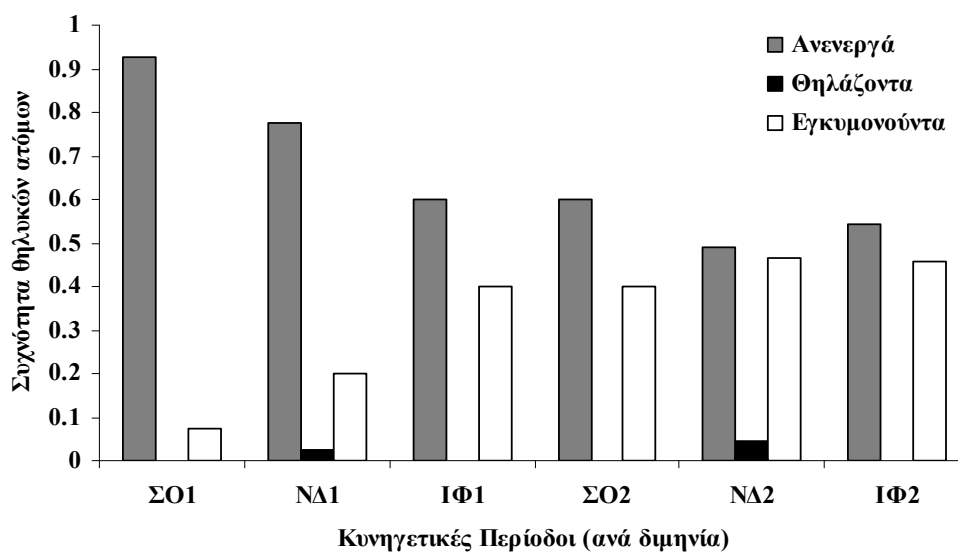
Για τη διαπίστωση του κατά πόσο η δειγματοληπτική μέθοδος μεροληπούσε έναντι του ενός από τα δύο φύλα, πραγματοποιήθηκε παραμετρικός έλεγχος t-test για δύο ανεξάρτητα δείγματα. Κατά τον έλεγχο αυτό διαπιστώθηκε εάν ο μέσος αριθμός των θηλυκών ατόμων διέφερε από αυτόν των αρσενικών ατόμων. Προϋποθέσεις του ελέγχου αυτού αποτελούν: α. τα δεδομένα να είναι συνεχή, β. η κατανομή τους να προσεγγίζει την κανονική κατανομή και γ. να παρατηρείται ομοιογένεια στις διασπορές των δύο φύλων. Για τη σύγκριση των μεταβλητών μεταξύ των δύο κυνηγετικών περιόδων πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των δεδομένων ανά περίοδο και ακολούθησε στατιστικός έλεγχος t-test, με σύγκριση δειγμάτων ανά ζεύγη. Οι προϋποθέσεις του ελέγχου αυτού είναι οι ίδιες με αυτές του t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Ο λόγος που τα δείγματα αυτά συγκρίθηκαν ανά ζεύγη είναι το γεγονός ότι η περιοχή δειγματοληψίας (στην περίπτωσή μας η Κρήτη) μελετήθηκε δύο συνεχόμενες χρονιές την ίδια χρονική περίοδο και επομένως υπήρξε επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας. Η τήρηση των στατιστικών προϋποθέσεων των παραμετρικών ελέγχων που χρησιμοποιήθηκαν (κανονικότητα και ομοιογένεια διασποράς) ελέγχθηκαν με τις δοκιμασίες Kolmogorov-Smirnov και Levene's αντίστοιχως. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις είχαν ως επίπεδο σημαντικότητας το $\alpha = 0,01$ και πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS v. 12.0.

Θεωρώντας ότι το μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ των γεννήσεων ισοδυναμεί με τη διάρκεια κύησης (41 με 42 ημέρες σύμφωνα με τους Martinet *et al.* 1970), ένα υγιές ενήλικο άτομο *Lepus europaeus* μπορεί να γεννήσει, κάτω από τις καλύτερες δυνατές συνθήκες, 1,46 φορές στο χρονικό όριο των δύο μηνών (Perin 1989). Επομένως, ο υπολογισμός της βέλτιστης εν δυνάμει παραγωγής νεογνών ανά ενήλικο θηλυκό άτομο ανά διμηνία για τις δύο υπό μελέτη κυνηγετικές περιόδους, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιάζοντας τη διμηνιαία συχνότητα των εγκυμονούντων θηλυκών με το μέσο ανά διμηνία αριθμό νεογνών καθώς και

με τον μέγιστο αριθμό γεννήσεων στο χρονικό αυτό διάστημα (1,46). Οι εκτιμήσεις αυτές επιτρέπουν την άμεση σύγκριση των δεδομένων μας με αυτά ήδη δημοσιευμένων μελετών.

1.3 Αποτελέσματα

Το ελαφρύτερο (και πιθανότατα νεότερο) θηλυκό άτομο που εγκυμονούσε ζύγιζε 1,5 kg, ενώ το ελαφρύτερο θηλυκό άτομο που θήλαζε μικρά ζύγιζε μόλις 1,3 kg. Θεωρώντας την πληροφορία της εγκυμοσύνης ως περισσότερο αξιόπιστη από αυτή του θηλασμού, τα άτομα εκείνα που ζύγισαν πάνω από 1,5 kg ταξινομήθηκαν ως ικανά να παράγουν απογόνους ενώ αυτά που ζύγισαν λιγότερο ως μη αναπαραγωγικώς ικανά. Πληροφορία σχετική με την εγκυμοσύνη των θηλυκών ατόμων θεωρείται πιο αξιόπιστη, μιας και αποτελεί φαινόμενο το οποίο είναι ορατό με γυμνό μάτι, ενώ επιπλέον επιβεβαίωση παρέχεται και από την πληροφορία για τον αριθμό των νεογνών που εγκυμονούνται από κάθε θηλυκό άτομο. Επομένως ακόμα και κάποιος χωρίς ιδιαίτερη εμπειρία μπορεί να αποφανθεί για το φαινόμενο αυτό. Αντιθέτως, πληροφορία σχετική με τα θηλυκά άτομα που θήλαζαν δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστη στον ίδιο βαθμό, μιας και η διαπίστωσή της απαιτεί την παρατήρηση ενός πιο έμπειρου ατόμου (παρατήρηση αδένων του μαστού) αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα μη καταγραφής της. Το κατά προσέγγιση βάρος των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στις περαιτέρω αναλύσεις κυμαινόταν από 1,5 έως 3,3 kg (1,5-3,2 kg για τα θηλυκά άτομα και 1,5-3,3 kg για τα αρσενικά άτομα).

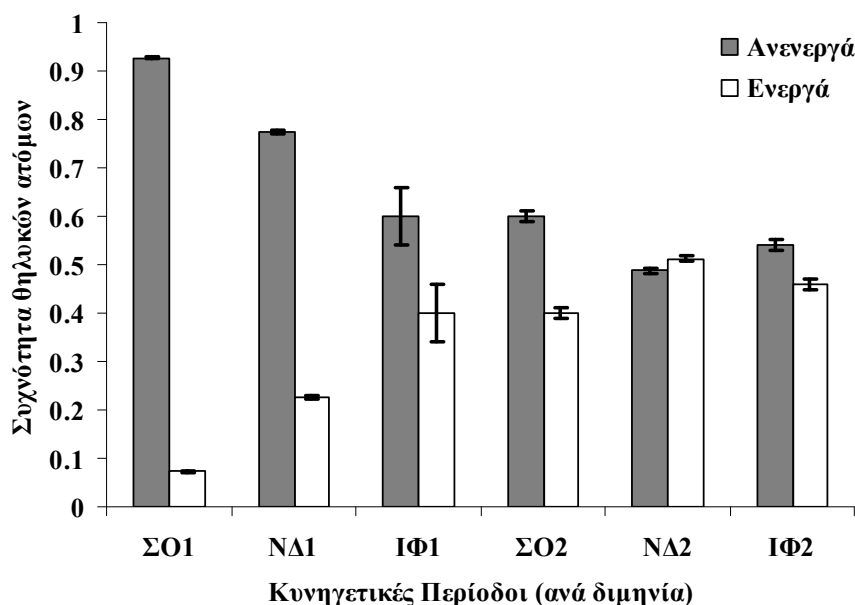


Εικόνα 1. Διακύμανση στη συχνότητα των τριών κατηγοριών θηλυκών ατόμων (αναπαραγωγικώς ανενεργά, θηλάζοντα και εγκυμονούντα) κατά τη διάρκεια των δύο υπό μελέτη κυνηγετικών περιόδων (2001-02 : 1, 2002-03 : 2) χωρισμένες σε διαστήματα των δύο μηνών [ΣΟ: Σεπτέμβρης-Οκτώβρης, ΝΔ:Νοέμβρης-Δεκέμβρης και ΙΦ: Ιανουάριος-Φεβρουάριος].

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P=0,517$) μεταξύ του αριθμού των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας

μελέτης. Επομένως, δεν υπάρχει κάποια ένδειξη μεροληψίας της δειγματοληπτικής μεθόδου ως προς το ένα από τα δύο φύλα.

Εγκυμονούντα θηλυκά άτομα βρέθηκαν καθόλη τη διάρκεια της μελέτης (**Εικόνα 1**). Το διμηνιαίο ποσοστό των θηλυκών ατόμων που εγκυμονούσαν ήταν υψηλότερο του 20% για όλες τις περιόδους και τις χρονιές που μελετήθηκαν με εξαίρεση της διμηνίας Σεπτέμβρης-Οκτώβρης της κυνηγετικής περιόδου 2001-02, όπου το ποσοστό αυτό φτάνει μόλις το 7,3%. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια των ίδιων μηνών της επόμενης κυνηγετικής περιόδου (2002-03) το ποσοστό αυτό έφτανε το 40%. Η υψηλότερη διμηνιαία τιμή που παρατηρήθηκε και για το σύνολο των δεδομένων φτάνει το 46,5% κατά τους μήνες Νοέμβριο-Δεκέμβριο του 2002. Όσον αφορά στα θηλυκά άτομα που θήλαζαν μικρά, η χαμηλότερη συχνότητα που παρατηρήθηκε ήταν 0% για την πλειοψηφία των μηνών που μελετήθηκαν, ενώ η υψηλότερη έφτανε το 4,7% κατά τους μήνες Νοέμβριο-Δεκέμβριο του 2002. Η υψηλότερη συχνότητα αναπαραγωγικά ανενεργών θηλυκών ήταν



Εικόνα 2: Διακύμανση του ποσοστού των ανενεργών και ενεργών ως προς την αναπαραγωγή θηλυκών ατόμων. Στο γράφημα παρουσιάζεται και οι εκτιμήσεις της διασποράς ως προς το δειγματοληπτικό μέγεθος οι οποίες πραγματοποιήθηκαν βάσει του τύπου $s_p^2 = pq/(n-1)$ (Zar 1996).

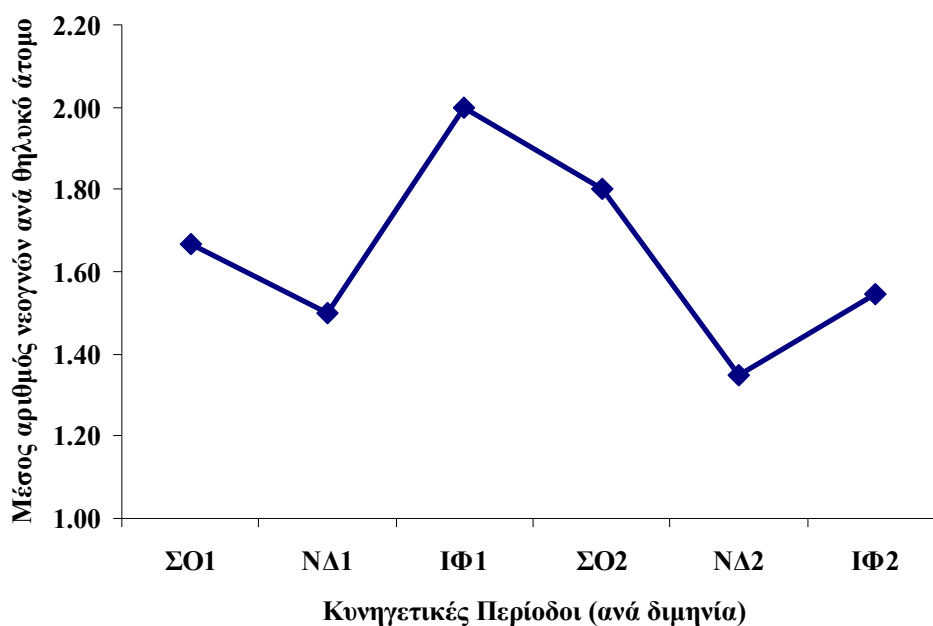
92,7% το Σεπτέμβρη-Οκτώβρη του 2001, ενώ η χαμηλότερη ήταν 48,8% η οποία παρατηρήθηκε το διάστημα Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου της επόμενης κυνηγετικής περιόδου (2002-03).

Η κατηγοριοποίηση των θηλυκών ατόμων σε αναπαραγωγικώς ενεργά (τα οποία περιλαμβάνουν τα εγκυμονούντα και τα θηλάζοντα θηλυκά) και μη ενεργά επέτρεψε την εκτίμηση της διασποράς των εκτιμώμενων αυτών ποσοστών ως προς το δειγματοληπτικό τους μέγεθος. Ο υπολογισμός της πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση της

διασποράς μεταβλητών που ακολουθούν τη διωνυμική κατανομή (Zar 1996). Η διμηνία Ιανουάριος-Φεβρουάριος 2002 παρουσίασε την υψηλότερη τιμή της διασποράς, γεγονός που αποδίδεται στο μικρό δειγματοληπτικό μέγεθος των μηνών αυτών (**Εικόνα 2**).

Οι αλλαγές στο ποσοστό των εγκυμονούντων θηλυκών ατόμων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ των δύο Κυνηγετικών περιόδων ($P = 0,023 > 0,01$). Ομοίως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο στο ποσοστό των θηλυκών ατόμων που θήλαζαν όσο και στο ποσοστό των αναπαραγωγικά ανενεργών θηλυκών ατόμων ($P = 0,423$ και $P = 0,508$ αντιστοίχως).

Ο μέσος αριθμός νεογνών ανά θηλυκό άτομο ανά διμηνία, παρουσιάζει μέγιστη τιμή κατά τους μήνες Ιανουάριο-Φεβρουάριο της πρώτης Κυνηγετικής περιόδου 2001-02 με τιμή 2 και ακολουθούν οι μήνες Σεπτέμβρης-Οκτώβρης της δεύτερης Κυνηγετικής περιόδου με τιμή 1,8. Η χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια των μηνών Νοέμβρης-Δεκέμβρης της δεύτερης Κυνηγετικής περιόδου φτάνοντας το (1,35) (**Εικόνα 3**). Ο εκτιμώμενος μέσος αριθμός νεογνών για το σύνολο των δεδομένων ($n=54$) είναι 1,537



Εικόνα 3. Διακύμανση στο μέσο αριθμό νεογνών ανά θηλυκό άτομο κατά τη διάρκεια των δύο υπό μελέτη κυνηγετικών περιόδων (2001-02 : 1, 2002-03 : 2) χωρισμένες σε διαστήματα των δύο μηνών [ΣΟ: Σεπτέμβρης-Οκτώβρης, ΝΑ: Νοέμβρης-Δεκέμβρης και ΙΦ: Ιανουάριος-Φεβρουάριος].

(τυπικό σφάλμα: $\pm 0,07$) με συχνότερα παρατηρούμενη τιμή το ένα και δύο νεογνά (26 και 27 περιπτώσεις αντιστοίχως). Ο μεγαλύτερος αριθμός νεογνών που καταγράφηκε σε μία γέννα είναι 3 έμβρυα, ο οποίος παρατηρήθηκε μια μόνο φορά. Οι συνολικές διμηνιαίες τιμές του μέσου αριθμού νεογνών ανά γέννα ανά θηλυκό άτομο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Οι τιμές που εκτιμήθηκαν για την βέλτιστη εν δυνάμει παραγωγή νεογνών σε διάστημα δύο μηνών από το σύνολο των δεδομένων, παρατίθενται στον **Πίνακα 1**. Η χαμηλότερη μέση τιμή παρατηρήθηκε κατά τους μήνες Σεπτέμβριο-Οκτώβριο (0,51), ενώ η υψηλότερη κατά τους μήνες Ιανουάριο-Φεβρουάριο (1,06).

Πίνακας 1. Διμηνιαίες και συγκεντρωτικές διμηνιαίες τιμές της συχνότητας των θηλυκών ατόμων σε κατάσταση εγκυμοσύνης, του μέσου αριθμού νεογνών ανά θηλυκό άτομο και της εν δυνάμει παραγωγής νεογνών ανά θηλυκό άτομο στους υπό μελέτη πληθυσμούς της Κρήτης (n : συνολικός αριθμός εν δυνάμει αναπαραγωγικά θηλυκών ατόμων ανά διμηνία και για τις δύο Κυνηγετικές Περιόδους).

		Κυνηγετική Περίοδος 2001-02		Κυνηγετική Περίοδος 2002-03		Συνολική Συχνότητα Εγκυμοσύνης	Συνολικός Μέσος αριθμός νεογνών	Συνολική εν δυνάμει παραγωγή νεογνών	
		n	Συχνότητα Εγκυμοσύνης	Μέσος αριθμός νεογνών	Συχνότητα Εγκυμοσύνης				Μέσος αριθμός νεογνών
Διμηνιαία Περίοδος	Σεπτέμβριος- Οκτώβριος (ΣΟ)	66	0,07	1,67	0,40	1,80	0,19	1,77	0,51
	Νοέμβριος- Δεκέμβριος (ΝΔ)	83	0,20	1,50	0,46	1,35	0,34	1,39	0,69
	Ιανουάριος- Φεβρουάριος (ΙΦ)	29	0,40	2,00	0,46	1,54	0,45	1,62	1,06

1.4 Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι πληθυσμοί λαγού της Κρήτης παρουσιάζουν αναπαραγωγική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια των δύο υπό μελέτη Κυνηγετικών περιόδων (2001-2003). Ενώ τα αναπαραγωγικώς ανενεργά θηλυκά συνιστούν το υψηλότερο ποσοστό των θηλυκών ατόμων, ωστόσο θηλυκά άτομα σε κατάσταση εγκυμοσύνης παρατηρήθηκαν σε όλους τους υπό μελέτη μήνες. Η παρατηρούμενη διακύμανση στο βάρος των αναπαραγωγικά ικανών (αναπαραγωγικώς ανενεργά και ενεργά) θηλυκών ατόμων, είναι ενδεικτική της παρουσίας στο δείγμα και ανήλικων ατόμων κάποια εκ των οποίων εγκυμονούσαν. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα της άμεσης εξάρτησης της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς από την ηλικία, όπου τα θηλυκά άτομα νεαρής ηλικίας (μόλις ενός έτους ή άτομα που αναπαράγονται για πρώτη φορά στη ζωή τους), χαρακτηρίζονται από χαμηλή αναπαραγωγική επίδοση, φαινόμενο το οποίο έχει ήδη παρατηρηθεί σε πληθυσμούς του είδους που κατανέμονται στην Νέα Ζηλανδία (Flux 1967).

Το ποσοστό των θηλυκών ατόμων σε κατάσταση εγκυμοσύνης, ήταν πάντα άνω του 20%. Εξαιρέση αποτελούν οι μήνες Σεπτέμβρης-Οκτώβρης του 2001, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε σφάλμα καταγραφής του συνόλου των χαρακτηριστικών του συλληφθέντων ατόμων από τους κυνηγούς. Η υψηλότερη τιμή του παρατηρείται κατά τη διάρκεια των μηνών Νοέμβριος-Δεκέμβριος με ποσοστό 46,5%. Η σύγκριση των δεδομένων της παρούσας μελέτης με αυτά αντίστοιχων μελετών, αποκαλύπτει ότι σε αρκετές περιοχές (δυτική Πολωνία, Βρετανία, Γαλλία και Ολλανδία) το ποσοστό των θηλυκών ατόμων που εγκυμονούν κατά τους μήνες Νοέμβριο-Δεκέμβριο είναι μηδέν (Raczyński 1964, Lincoln 1974, Pepin 1975, Broekhuizen & Maaskamp 1981 αντιστοίχως) ενώ αντιθέτως στην Κρήτη, η χαμηλότερη τιμή δεν φτάνει ποτέ το μηδέν και η υψηλότερη φτάνει το 46,5% (Πίνακας 2). Επιπλέον, στις περιοχές εκείνες στις οποίες έχουν παρατηρηθεί θηλυκά άτομα σε κατάσταση εγκυμοσύνης για τους εν λόγω μήνες, το ποσοστό αυτών είναι πάντα κάτω του 20% (Flux 1967, Hewson & Taylor 1975, Stott & Harris 2006) με τις περισσότερες των περιπτώσεων να θεωρούνται εξαιρετικές (Hay 1953, Korneev 1960 από Raczyński 1964, Raczyński 1964, Hewson & Taylor 1975) και να αποδίδονται στις ήπιες καιρικές συνθήκες των εκάστοτε χειμερινών περιόδων (Likevičienė 1962). Οι Pepin, Meunier & Angibault (1981) αναφέρουν χαρακτηριστικά ότι το ποσοστό των θηλυκών ατόμων σε κατάσταση εγκυμοσύνης για την περίοδο Νοέμβρης-Δεκέμβρης στο Παρίσι, έφτανε μόλις το 1%. Στη Γερμανία ο Stieve (1952) κάνει αναφορά για ενεργά αναπαραγωγικώς αρσενικά κατά τους μήνες Οκτώβρη έως Δεκέμβρη, ενώ ο Möller (1971) παρατήρησε ότι το 30% των θηλυκών ατόμων που μελέτησε θήλαζαν έως την πρώτη του Νοέμβρη. Δυστυχώς, η χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών στις περισσότερες έως σήμερα μελέτες, που αφορούν στην αναπαραγωγή του είδους, καθιστά τις μεταξύ τους συγκρίσεις εξαιρετικά δύσκολες έως και ανέφικτες.

Από τα παραπάνω, γίνεται εμφανές ότι αν και μελέτες πληθυσμών με καλά καθορισμένη αναπαραγωγική περίοδο έχουν αποκαλύψει περιπτώσεις αναπαραγωγικά ενεργών θηλυκών κατά τους φθινοπωρινούς μήνες αλλά και κατά τους πρώτους μήνες του χειμώνα, ωστόσο η συχνότητά τους είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή που παρατηρείται στην παρούσα μελέτη. Σε αυτή τη μελέτη, αν και τα μικρά δειγματοληπτικά μεγέθη συνεισφέρουν στην μεροληψία των εκτιμώμενων παραμέτρων, ωστόσο στην περίπτωση των ενεργών αναπαραγωγικά ατόμων δεν θα μπορούσε παρά μόνο να οδηγούν στην υποεκτίμηση του αριθμού τους (εξαιτίας της μη καταγραφής όλων των ατόμων που εγκυμονούν, λόγω της αδυναμίας εντοπισμού κυήσεων λίγων μόνο ημερών, αλλά και τη μη καταγραφή από όλους τους κυνηγούς των ατόμων που θηλάζουν). Συμπερασματικά είναι αρκετά ασφαλές να ειπωθεί ότι η παρούσα μελέτη αποτελεί ισχυρή ένδειξη συνεχούς αναπαραγωγής για τους πληθυσμούς λαγού της Κρήτης καθόλη τη διάρκεια του έτους. Η απουσία μεροληψίας της δειγματοληπτικής μεθόδου όσον αφορά στην αναλογία των φύλων, εξασφαλίζει ότι τα δύο φύλα αντιπροσωπεύονται ισότιμα στο δείγμα.. Στην περίπτωση υπερ-εκπροσώπησης του ενός από τα δύο φύλα, αυτή θα μπορούσε να οδηγήσει σε περαιτέρω υπο- ή υπερ-εκτίμηση των συχνοτήτων όλων των υπό μελέτη μεταβλητών και να οδηγήσει σε αμφίβολα αποτελέσματα.

Θηλυκά άτομα σε κατάσταση θηλασμού, παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης μόνο τη διμηνία Νοέμβρης-Δεκέμβρης και των δύο κυνηγετικών περιόδων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα θηλυκά άτομα που θηλάζουν δεν μπορούν να θεωρηθούν αμερόληπτη ένδειξη, μιας και υπάρχει αυξημένη πιθανότητα να μην έχουν καταχωρηθεί ως σημαντική πληροφορία από όλους τους κυνηγούς και επιπλέον να μην ήταν όλοι οι κυνηγοί σε θέση να διαγνώσουν την κατάσταση των μαστικών αδένων, ενώ αντίθετα η πλειονότητα αυτών (αν όχι όλοι) ήταν σε θέση να καταγράψουν κάτι τόσο εμφανές όσο η εγκυμοσύνη, γνωρίζοντας ότι μετά τη σύλληψή του το ζώο υποβάλλεται σε ανατομή με στόχο την απομάκρυνση εσωτερικών οργάνων και πιθανών εμβρύων και την κατάλληλη αποθήκευσή του για μετέπειτα βρώση, διαδικασία η οποία γίνεται ανεξαιρέτως. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι θηλάζοντα θηλυκά παρουσιάζονται στα δείγματά μας μόνο κατά τους μήνες που προαναφέρθηκαν μας επιτρέπει να διατυπώσουμε την υπόθεση ότι αυτό οφείλεται στην πεποίθηση των κυνηγών ότι ο θηλασμός αυτή τη χρονική περίοδο αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των πληθυσμών λαγού της Κρήτης.

Η απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δύο διαδοχικών κυνηγετικών περιόδων, τόσο για τα αναπαραγωγικά ανενεργά θηλυκά όσο και για εγκυμονούντα και θηλάζοντα θηλυκά, είναι ενδεικτική το ότι τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορεί να οφείλονται στην τύχη και μόνο, έχοντας ωστόσο υπόψη το σφάλμα που επιφέρουν τα μικρά δειγματοληπτικά μεγέθη.

Ο μέγιστος αριθμός νεογνών ανά γέννα ανά θηλυκό άτομο, που καταγράφηκε κατά τη μελέτη αυτή, ισούται με τρία και παρατηρήθηκε μόνο μια φορά τον Οκτώβριο του 2002. Η

τιμή αυτή έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχες τιμές που παρατηρήθηκαν κατά τους φθινοπωρινούς μήνες στη Σουηδία, όπου ο αριθμός των νεογνών κυμαίνεται από ένα έως τρία (Frylestam 1980).

Ο μέσος αριθμός νεογνών, όπως αυτός προέκυψε από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, συγκαταλέγεται μεταξύ των χαμηλότερων τιμών που έχουν παρατηρηθεί ποτέ όχι μόνο για πληθυσμούς του είδους (**Πίνακας 2**), αλλά και για τα είδη του γένους *Lepus*. Γνωρίζοντας ότι ο αριθμός των νεογνών είναι αντιστρόφως ανάλογα συνδεδεμένος με τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, όπως αναφέρεται χαρακτηριστικά από τον Flux (1981), η τιμή που παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη συνεχούς αναπαραγωγής του είδους καθόλη τη διάρκεια του χρόνου για τους πληθυσμούς της Κρήτης. Αναλογιζόμενοι ότι η εποχική διακύμανση στην παραγωγή νεαρών ατόμων στον Ευρωπαϊκό λαγό είναι αποτέλεσμα αλλαγών στο ποσοστό των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού που εγκυμονούν, στον αριθμό των νεογνών που αυτά γεννούν, καθώς επίσης και ότι η μέγιστη παραγωγικότητα παρατηρείται πάντα στη μέση της αναπαραγωγικής περιόδου (Raczyński 1964, Flux 1967, Hewson & Taylor 1975, Velek & Semizorova 1976, Amaya *et al.* 1979, Broekhuizen & Maaskamp 1981) είναι πολύ πιθανό να ισχύει η υπόθεση της συνεχούς αναπαραγωγής (η μέγιστη παραγωγικότητα παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη τη διμηνία Νοέμβρη-Δεκέμβρη και όχι Σεπτέμβρη-Οκτώβρη ή Ιανουάριο-Φεβρουάριο). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι οι περιπτώσεις στις οποίες έχουν παρατηρηθεί αντίστοιχες τιμές, είναι στο είδος *L. capensis* (1,5) από τον Flux (1981) και στο ενδημικό είδος της Ιβηρικής χερσονήσου *L. granatensis* (1,6) από τους Alves *et al.* (2002), δύο είδη τα οποία χαρακτηρίζονται από συνεχή αναπαραγωγή καθόλη τη διάρκεια του χρόνου.

Ο μέσος αριθμός νεογνών που παρατηρήθηκε τους μήνες Σεπτέμβριος-Οκτώβριος, είναι χαμηλότερος από αυτόν που παρατηρήθηκε στο Παρίσι για τους ίδιους μήνες από τους Pepin Meunier & Angibault (1981). Αντιθέτως η τιμή που παρατηρήθηκε από την ίδια μελέτη για τους μήνες Ιανουάριος-Φεβρουάριος είναι χαμηλότερη από αυτή της παρούσας μελέτης.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα μοναδικά είδη του γένους *Lepus* που έχουν αποδειχθεί σύμφωνα με εμπεριστατωμένες μελέτες ότι αναπαράγονται καθόλη τη διάρκεια του χρόνου είναι το είδος *L. capensis* (Flux 1981) και το είδος *L. granatensis* (Alves *et al.* 2002). Σε μελέτη του ο Raczyński (1964) αναφέρεται μεταξύ άλλων και σε μια σχεδόν συνεχή περίοδο αναπαραγωγής για πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού που κατανέμονται στην περιοχή του Καυκάσου, ωστόσο με έναν εποχικό και κυκλικό χαρακτήρα. Οι πληθυσμοί των ειδών που προαναφέρθηκαν, διαβιούν σε περιοχές όπου το συνεχές πρότυπο της αναπαραγωγής κρίνεται πλεονεκτικότερο έναντι των άλλων προτύπων αναπαραγωγής εξαιτίας σειράς παραγόντων. Κάποιοι από αυτούς είναι το κλίμα, η διαθεσιμότητα της τροφής και η καταπόνηση (stress) η οποία σχετίζεται με την παρουσία θηρευτών. Παρατηρήσεις του Lechleiner (1959) στο είδος *L. californicus*, επιβεβαιώνουν την υπόθεση σύμφωνα με την

οποία οι συνθήκες διατροφής επηρεάζουν την αναπαραγωγή. Ο συγγραφέας προσπαθεί να ερμηνεύσει την ταυτόχρονη παρουσία αναπαραγωγικά ενεργών και μη ενεργών ενήλικων ατόμων σύμφωνα με τις συνθήκες των ενδιαιτημάτων στα οποία διαβιούν. Τα ζώα εκείνα που ζουν σε υγρές περιοχές όπου τα φυτά παραμένουν χλωρά καθόλη τη διάρκεια του χρόνου, μπορούν να συμμετάσχουν στην αναπαραγωγή χωρίς καμία διακοπή. Η μελέτη του Flux (1967), έδειξε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της περιόδου έναρξης της αναπαραγωγής στη Νέα Ζηλανδία και της απόκλισης της θερμοκρασίας των δύο μηνών που προηγήθηκαν αυτής, από την επί πολλά έτη μέση θερμοκρασία. Σύμφωνα με αυτό, καθοριστικό παράγοντα για την έναρξη της αναπαραγωγής δεν αποτελεί η απόλυτη θερμοκρασία αλλά η μεταβολή της σε σχέση με τον επί πολλά έτη μέσο όρο της υπό μελέτη περιοχής. Συμπεραίνει επίσης ότι η θερμοκρασία φαίνεται να επηρεάζει τον ρυθμό ωρίμανσης του αναπαραγωγικού κύκλου, το εναρκτήριο λάκτισμα του οποίου προκαλείται από την ανταπόκριση του οργανισμού στο μήκος της ημέρας, αλλά και από άλλους δευτερεύοντες ή άμεσους παράγοντες που επηρεάζουν την ακριβή ημερομηνία των συλλήψεων.

Οι καιρικές συνθήκες που επικρατούν στην Κρήτη είναι ήπιες, με δριμείς συνθήκες να παρατηρούνται μόνο για περιορισμένο χρονικό διάστημα, ενώ επί το πλείστον υπάρχουν μεγάλες περιόδους ηλιοφάνειας στη διάρκεια του χρόνου. Οι καιρικές συνθήκες σε συνδυασμό με τον κύριο τύπο βλάστησης, καθώς και με τις πρακτικές χρήσης γης του νησιού προσφέρουν μέτρια έως υψηλή διαθεσιμότητα τροφής στους πληθυσμούς λαγών για όλο το χρόνο. Επιπρόσθετα, τα μοναδικά σαρκοφάγα του νησιού συνίσταται σε κουνάβια (*Meles meles arcalus*), νυφίτσες (*Mustela numidica galinthias*) και αγριόγατους (*Felis silvastris agrius*) (Zimmermann 1953). Τα σαρκοφάγα αυτά μαζί με τα αρπακτικά πουλιά που παρατηρούνται στο νησί (χρυσαιετοί, γερακίνες και άλλα, Ελληνική Ορνιθολογική Εταιρεία: <http://www.ornithologiki.gr>) αποτελούν τους κύριους θηρευτές των λαγών. Επομένως θα μπορούσε να διατυπώσουμε με ασφάλεια ότι, η έλλειψη μεγάλων σαρκοφάγων στο νησί έχει ως αποτέλεσμα λιγότερη καταπόνηση των πληθυσμών λαγού από θηρευτές σε σχέση με αυτή που αντιμετωπίζουν οι πληθυσμοί του είδους που ζουν στην ηπειρωτική Ελλάδα.

Σύμφωνα με πρόσφατες γενετικές αναλύσεις (της παρούσας διδακτορικής διατριβής), οι πληθυσμοί Ευρωπαϊκού λαγού της Κρήτης αποτελούν διακριτή ομάδα, τόσο έναντι των υπόλοιπων πληθυσμών της Ελλάδας όσο και έναντι των πληθυσμών του είδους της κεντρικής Ευρώπης. Επομένως, η γενετική τους διακριτότητα θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την ιδιαίτερη αναπαραγωγική τους επίδοση. Ωστόσο, μελλοντικές εμπειριστατωμένες μελέτες κρίνονται απαραίτητες για την επιβεβαίωση ή την απόρριψη της παραπάνω υπόθεσης.

Πίνακας 2. Διακύμανση που παρατηρείται στην διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (γκρι περιοχές) στο ποσοστό των εγκυμονούντων θηλυκών και στον αριθμό των νεογνών ανά γέννα (σε παρένθεση) σε διαφορετικά σημεία κατανομής των πληθυσμών του είδους (*Lepus europaeus*) [ΜΔΠ=μη διαθέσιμη πληροφορία, *=από τη μελέτη των Broekhuizen & Maaskamp (1981)]

	I	Φ	M	A	M	I	I	I	A	Σ	O	N	A	Αριθμός νεογνών/γέννα	Περιοχή	Βιβλιογραφική αναφορά
	20% (1)	85.2% (1.43)	53.6% (2.64)	75% (4)	59.1% (3.46)	75% (3.17)	83.3% (3.5)	52.6% (2.9)	16.7% (3.5)	0%	0%	0%	0%	2.0-2.8	Πολωνία	Raczynski (1964)
														-	Ρουμανία	Scarlatescu et al. (1963)*
														2.1-2.3	Δανία	Hansen (1992)
														2.5-3.2	Σουηδία	Flyvlietam (1980)
	69% (1.4)	86% (2.1)	73% (2.7)	100% (3.1)	89% (3.3)	80% (3)	62% (3)	78% (2.6)	22% (2.6)	0%	0%	0%	0%	2.68	Ολλανδία	Broekhuizen & Maaskamp (1981)
	37-40% (1-1.5)	60-63% (1-1.5)	77-80% (2-2.5)	97-100% (3.5-4)	97-100% (3-3.5)	97-100% (2.5-3)	60-63% (1-1.5)	57-60% (0)	0-3% (0)	0-3% (0)	0%	0%	0%	3.0	Αγγλία	Lincoln (1974)
	11-1% (2)	46.8% (2.15)	82.9% (2.71)	94% (3.65)	92.1% (3.23)	80.7% (2.85)	80.6% (2.63)	57.7% (2.27)	43.7% (2.02)	27.4%	11.1% (1.83)	3.7% (1.75)	2.69	Σουηδία	Hewson & Taylor (1975)*	
														-	Καναδάς	Ronoldis & Simon (1959)
	29% (1)		47% (3.14)		94% (2.73)		50% (2.4)		35% (2.57)		1% (1.5)		2.5	Γαλλία	Péron et al. (1981)	
	57% (1.1)	99% (1.2)	98% (2.3)	91% (2.5)	98% (2.8)	96% (2.6)	93% (2.8)	95% (2.3)	17% (2.7)	6%	0%	4%	2.2	Νέα Ζηλανδία	Flux (1957), Parkes (1989)	
	0% (0)	20-25% (1.7)	60-65% (2.2-2.3)	75-80% (1.5-2)	70-75% (2.2-2.5)	80-85% (2.4-2.5)	65-70% (2)	25-30% (0)	0% (0)	0%	-	-	2.2	Αργεντινή	Borhio & Montenegro (1997)	
	55-60% (1.2-1.4)	75-90% (1.2-1.4)	65-70% (2-2.2)	75-90% (2.2-2.4)	70-75% (2.6-2.8)	40-45% (2.6-2.8)	45-50% (2.6-2.8)	40-45% (2.4-2.6)	20-25% (1.8-2)	5-10%	0-5%	15-20%	2.19	Αυστραλία	Speit & Harris (2006)	
	45% (1.62)		NA	NA	NA	NA	NA	NA	19% (1.77)		34% (1.39)		1.54	Ελλάδα (Κρήτη)	Πρόσφατη μελέτη	

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι οι υπό μελέτη πληθυσμοί του είδους *L. europaeus* στην Κρήτη, δεν εμφανίζουν περίοδο παύσης της αναπαραγωγικής τους δραστηριότητας κατά τους φθινοπωρινούς μήνες, αλλά αντιθέτως, τόσο το ποσοστό των θηλυκών ατόμων που εγκυμονούν όσο και ο αριθμός των νεογνών ανά γέννα παρέχουν ισχυρή ένδειξη ότι αυτοί οι νησιώτικοι πληθυσμοί αναπαράγονται συνεχώς. Παρά τα μικρά δειγματοληπτικά μεγέθη, τον περιορισμένο αριθμό των μεταβλητών που μελετήθηκαν και τη μικρή χρονική περίοδο που διήρκεσε η μελέτη αυτή, το υψηλό ποσοστό και ο μικρός μέσος αριθμός νεογνών είναι αξιοσημείωτα και παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται σε άλλα είδη λαγών που χαρακτηρίζονται από συνεχή αναπαραγωγή. Αν και η πιθανότητα αναπαραγωγικής παύσης κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, δεν μπορεί να απορριφθεί (μιας και δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν τους μήνες αυτούς), ωστόσο παρατηρήσεις κυνηγών στο πεδίο την απορρίπτουν μιας και αναφέρουν την παρουσία τόσο εγκυμονούντων θηλυκών όσο και νεογνών λίγων ημερών κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης δεν αποτελούν παρά μια ένδειξη αναπαραγωγικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια των φθινοπωρινών μηνών για τους πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού της Κρήτης και επομένως μελλοντικές και σε βάθος χρόνου μελέτες κρίνονται απαραίτητες, έτσι ώστε να προκύψουν ακλόνητα συμπεράσματα για την αναπαραγωγή του είδους στην Κρήτη.

Η διεξαγωγή μελετών που αφορούν στην αναπαραγωγή των πληθυσμών λαγού της Κρήτης, καθώς και πληθυσμών του είδους σε άλλες περιοχές της ηπειρωτικής και νησιωτικής Ελλάδας, όπου παρατηρείται επίσης εκτεταμένη γενετική ποικιλότητα, θα διευκολύνει την ανάπτυξη μελλοντικών κατευθυντήριων γραμμών, όσον αφορά στις πρακτικές διαχείρισης και διατήρησης των πληθυσμών του είδους, οι οποίες θα βασίζονται σε συνδυασμένη και πολύπλευρη πληροφορία και επομένως σε σφαιρικότερη εικόνα για την κατάσταση των πληθυσμών του είδους. Επιπλέον, η μελέτη σχετικά πρόσφατων πληθυσμών, όσον αφορά στην εξελικτική τους ιστορία και την παρουσία τους στο νησί, οι οποίοι είναι πολύ καλά προσαρμοσμένοι στο θερμό κλίμα της Κρήτης, θα επιτρέψει τη συλλογή ανεκτίμητων στοιχείων και συμπερασμάτων για την ανάπτυξη, τις επιδράσεις και τις συνέπειες των κλιματικών και ανθρωπογενών προκλήσεων. Επιπρόσθετα, τέτοιου είδους γνώση, θα βοηθήσει πιθανώς, στην πρόβλεψη των αποκρίσεων των πληθυσμών που κατανέμονται σε βορειότερα κλίματα σε θερμότερες συνθήκες εξαιτίας της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής.

Κεφάλαιο ΙΙΙ

Φυλογεωγραφία του Ευρωπαϊκού λαγού στη Βαλκανική

1. Το Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) ως μοριακός δείκτης

Τα είδη ως επί το πλείστον αποτελούνται από γεωγραφικά δομημένους πληθυσμούς, μερικοί από τους οποίους μπορεί να έχουν μικρή ή καθόλου γενετική επαφή για μεγάλο χρονικό διάστημα. Άλλα είδη πάλι, χαρακτηρίζονται από σχετικά πρόσφατη επέκταση της κατανομής τους, με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί τους να συνδέονται πολύ στενά μεταξύ τους. Η ιστορική και η σύγχρονη δημογραφία μπορεί να επηρεάσει τη χωρική δομή των πληθυσμών ενός είδους και ως εκ τούτου να επηρεάσει με πολλούς τρόπους την ενδοειδική γενεαλογία. Η πρόκληση του μιτοχονδριακού DNA στην αποτίμηση των φυλογεωγραφικών προτύπων είναι η αποκρυπτογράφηση των παλαιών και των σύγχρονων δημογραφικών παραγόντων, που πιθανώς έχουν παραγάγει το παρατηρούμενο χωρικό πρότυπο των γενεαλογικών γραμμών σε ένα είδος (Avisé 2000).

Γενικά στοιχεία

Η ανάλυση της πληροφορίας που περιέχεται σε ολόκληρο το γονιδίωμα των οργανισμών ή σε μεγάλα τμήματα αυτού, αν και αποτελεί κομβικό σημείο στη διερεύνηση των εξελικτικών διαδικασιών που έλαβαν χώρα στο παρελθόν και διαμόρφωσαν το σημερινό πρότυπο βιοποικιλότητας, θεωρείται προς το παρόν απρόσιτη. Οι σύγχρονες εργαστηριακές τεχνικές και μεθοδολογίες ανάλυσης, επιτρέπουν τη μελέτη μικρών τμημάτων του γονιδιώματος σε έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων, κάτι που για την πλειονότητα των ερευνητικών εργαστηρίων τοποθετείται σε ένα ανεκτό οικονομικά επίπεδο. Ως αποτέλεσμα αυτού, οι περισσότερες μελέτες μοριακής συστηματικής και εξέλιξης, βασίζονται στην ανάλυση ενός ή περισσοτέρων τμημάτων του γονιδιώματος που συνίσταται κυρίως στην εύρεση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Τα συμπεράσματα εξάγονται με βάση την παραδοχή ότι τα δεδομένα από τα τμήματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικά των γονιδιωμάτων από τα οποία προέχονται και επομένως και των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών. Ωστόσο μια τέτοιου είδους παραδοχή ενέχει τον κίνδυνο της παραπλανητικής πληροφόρησης, αφού η εξελικτική δυναμική των διαφόρων τμημάτων του DNA δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, ενώ επιπλέον έχει αποδειχτεί ότι η γενεαλογική ιστορία ορθόλογων τμημάτων του γονιδιώματος δεν ταυτίζεται απαραίτητα με την εξελικτική ιστορία των ειδών (π.χ. Hudson 1983, Nei 1986, Neigel & Avisé 1986, Doyle 1992, Ruvolo 1994, Maddison 1997, Nichols 2001, Nordborg 2001).

Αν και υπήρξαν αρκετές προσπάθειες για την εξακρίβωση της φυλογενετικής χρησιμότητας συγκεκριμένων γονιδίων (Graybeal 1994), η θέση, το μήκος της αλληλουχίας,

η διαθεσιμότητα αντίστοιχης πληροφορίας στις κοινόχρηστες βάσεις δεδομένων και, σε μικρότερο βαθμό, η ικανότητα περιγραφής της εξελικτικής ιστορίας του είδους αποτελούν τα κύρια κριτήρια επιλογής γενετικών δεικτών. Επιπλέον, η εκτίμηση του κατά πόσο ένα γονίδιο μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικό ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού αποτελεί ένα πολύ δύσκολο εγχείρημα, το οποίο δεν μπορεί κανείς να το γνωρίζει εκ των προτέρων (Cummings *et al.* 1995, Ayala 1997).

Η σημαντική πρόοδος που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ ατόμων, πληθυσμών και ειδών οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό της στη χρήση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) ως γενετικού δείκτη (Wilson *et al.* 1985, Avise *et al.* 1987, Harrison 1989). Το πλεονέκτημα που παρέχει η χρήση του mtDNA σε μελέτες ζωικών οργανισμών, οφείλεται στην πιστότητα του αριθμού και της λειτουργίας των γονιδίων του, στην έλλειψη φαινόμενων διπλασιασμού των γονιδίων αυτών, στην κυρίαρχα μητρική κληρονομιά του και στην εν γένει απουσία ανασυνδυασμού (Brown 1985, Harrison 1989, Ladoukakis & Zouros 2001, Stadler & Delph 2002, Jaramillo-Correa & Bousquet 2005, Ujvari *et al.* 2007).

Τα γονίδια του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού γονιδιώματος παρουσιάζουν ως επί το πλείστον διαφορετικές φυλογενέσεις, γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται στα διαφορετικά μονοπάτια κληρονομιάς τους, στις αποκλίνουσες εξελικτικές πιέσεις στις οποίες υποβάλλονται, καθώς και στις διαφορετικές αποκρίσεις τους σε διαδικασίες όπως η διαλογή εξελικτικών γραμμών (lineage sorting), ο διπλασιασμός ή η απαλοιφή γονιδίων, καθώς και η υβριδική ειδογένεση. Αντιθέτως, συγκλίνουσες φυλογενέσεις μεταξύ των δύο αυτών γονιδιωμάτων θα μπορούσαν να υπονοούν ότι τα γονιδιακά φυλογενετικά δέντρα συγκλίνουν επίσης με τη μια και μοναδική υποκείμενη φυλογένεση, αυτή των ειδών (Reyes *et al.* 2004).

Δομή του μιτοχονδριακού DNA

Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα μικρό, δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο, που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα μέσα στα μιτοχόνδρια. Το μέγεθος του κυμαίνεται από 16.000 έως 20.000 bp (Brown 1983, Moritz *et al.* 1987), εξαπλώνεται καθολικά σε όλο το ζωικό βασίλειο και χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη συντηρητικότητα ως προς το γονιδιακό του περιεχόμενο. Σε όλα τα πολυκύτταρα ζώα που έχουν μελετηθεί, καθώς και σε μερικά πρωτόζωα, το mtDNA περιλαμβάνει την ίδια ομάδα γονιδίων (37 σε αριθμό): 22 γονίδια μεταφορικών RNA (tRNA), 13 πρωτεϊνικά γονίδια, 2 ριβοσωμικά RNA (rRNA) και δύο μη κωδικές περιοχές (η μεγαλύτερη εκ των οποίων καλείται περιοχή ελέγχου, D-loop) που ελέγχουν την αντιγραφή του DNA και τη μεταγραφή του RNA (Avise *et al.* 1987). Από το μιτοχονδριακό DNA απουσιάζουν τα ιντρόνια στις περιοχές των γονιδίων, ενώ οι μεσογονιδιακές αλληλουχίες είναι γενικά μικρές ή απύσες. Τα μιτοχονδριακά γονίδια που

κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Τα γονίδια αυτά είναι τα ακόλουθα: 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6) 1 υπομονάδα του κυτοχρώματος *b*, 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* (CO I, II, III) και 2 υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPase 6 και 8) (Moritz *et al.* 1987).

Τα γονίδια του mtDNA έχουν πυκνή διάταξη και η σειρά τους είναι σταθερή εντός συγκεκριμένου φύλου (Wilson *et al.* 1985). Οι εξελικτικές αλλαγές που συμβαίνουν στο mtDNA είναι συνήθως απλές και αφορούν σε αντικαταστάσεις βάσεων και μεταλλαγές στο μήκος, οι οποίες παρατηρούνται συνήθως στις μικρές μη κωδικές περιοχές (Brown 1985, Meyer 1993). Οι δύο αλυσίδες του μιτοχονδριακού DNA χαρακτηρίζονται ως ελαφριά (L) και βαριά (H) και τα ονόματά τους αντικατοπτρίζουν τη διαφορά τους στο ποσοστό γουανίνης και θυμίνης (G+T) που περιέχουν, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική συμπεριφορά τους σε διαβάθμιση πυκνότητας CsCl₂ (Meyer 1993). Στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών όλα σχεδόν τα γονίδια, εκτός κάποιων εξαιρέσεων (το γονίδιο ND6 και οι 8 τύποι tRNA), κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H.

Οι δύο μη κωδικές περιοχές του mtDNA

Οι δύο μη κωδικές περιοχές συνιστούν λιγότερο από το 7% ολόκληρου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η κύρια μη κωδική περιοχή καλείται D-loop (displacement loop) εξαιτίας μιας ασυνήθιστης δομής τριών αλυσίδων που είναι ορατή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το μήκος της κυμαίνεται από 880 έως 1400 bp, αν και μπορεί να το υπερβεί εξαιτίας των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που περιέχει, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί σε έναν μεγάλο αριθμό ειδών συμπεριλαμβανομένου και του Ευρωπαϊκού λαγού (Sbisa *et al.* 1997). Η περιοχή αυτή εκτείνεται μεταξύ των γονιδίων tRNA της φαινυλαλανίνης (Phe) και της προλίνης (Pro) και περιλαμβάνει υποκινητές (promoters) της μεταγραφής της ελαφριάς (L) και βαριάς (H) αλυσίδας, ενώ παράλληλα αποτελεί στόχο αρκετών πρωτεϊνών και ενζύμων (DNA και RNA πολυμεράσες, μεταγραφικοί και ρυθμιστικοί παράγοντες), με αποτέλεσμα να υποβάλλεται σε ποικίλες εξελικτικές πιέσεις (Saccone *et al.* 1991). Η δεύτερη μη κωδική περιοχή είναι πολύ μικρότερη, εντοπίζεται περίπου 11 kb από την D-loop, στην κατεύθυνση της αντιγραφής και περιλαμβάνει το σημείο έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς (L) αλυσίδας (Larizza *et al.* 2002).

1.1 Η περιοχή ελέγχου του mtDNA (D-loop) ως φυλογενετικός δείκτης

Πέρα από τη λειτουργική του σημασία, το τμήμα αυτό αποτελεί το ταχύτερα εξελισσόμενο κομμάτι του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, όπως αυτό έχει αποδειχθεί από σειρά μελετών (Saccone *et al.* 1993). Αναλυτικότερα, ο κεντρικός τομέας παρουσιάζει εκτεταμένη νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ ειδών, ενώ παράλληλα διαφοροποιείται στον

ίδιο βαθμό με αυτόν γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου. Αντιθέτως, οι δύο περιφερειακοί τομείς της D-loop εξελίσσονται με έντονους ρυθμούς, δημιουργώντας έτσι ετερογένεια, τόσο στο μήκος όσο και στην αλληλουχία των τμημάτων αυτών. Η εκτεταμένη ποικιλότητα στο μέγεθος της περιοχής ελέγχου (και επομένως και του mtDNA), τόσο εντός (ετεροπλάσμια) όσο και μεταξύ των ατόμων, δημιουργείται εξαιτίας του διαφορετικού αριθμού επαναληπτικών αλληλουχιών οι οποίες περιλαμβάνονται στους τομείς αυτούς. Αρκετά εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι οι επαναλήψεις αυτές βρίσκονται είτε στην αρχή είτε στο τέλος της D-loop, περιοχές οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα αναδίπλωσης σε σταθερές δευτεροταγείς δομές (Sbisa *et al.* 1997).

Συνεπώς, οι συγκρίσεις αλληλουχιών είτε βάσει μιτοχονδριακών γονιδίων είτε βάσει των συντηρημένων περιοχών της D-loop, παρέχουν πληροφορία που αφορά τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ειδών ή ακόμα και μεταξύ αρκετά διαφοροποιημένων πληθυσμών. Αντιθέτως, συγκρίσεις μεταξύ των περισσότερο μεταβλητών περιοχών επιτρέπουν τη μελέτη των σχέσεων που υπάρχουν μεταξύ πληθυσμών ή ακόμα και ατόμων (Avisé *et al.* 1987, Avisé *et al.* 1989). Η μεγάλη ποικιλότητα που παρατηρείται μεταξύ ατόμων σε μεγάλο εύρος ειδών μεταζώων (από τα θηλαστικά μέχρι τα έντομα και τα μαλάκια), καθιστά την περιοχή της D-loop ισχυρό εργαλείο στις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής και ακτινωτής ειδογένεσης (Biju-Duval *et al.* 1991, Hoelzel *et al.* 1991, 1993, Casane *et al.* 1994, Fumagalli *et al.* 1996, Lyholm *et al.* 1996).

Στα πλαίσια αυτά και προκειμένου να ελέγξουμε τις φυλογενετικές σχέσεις διαφόρων πληθυσμών του Ευρωπαϊκού λαού στη Βαλκανική, πραγματοποιήσαμε αλληλούχηση τμήματος της περιοχής ελέγχου του mtDNA, αντιπροσωπευτικών δειγμάτων των υπό μελέτη δειγματοληπτικών περιοχών. Η λεπτομερής μελέτη της ποικιλότητας που παρουσιάζει το είδος στον ευρύτερο χώρο της Βαλκανικής έχει ως απώτερο στόχο τη διερεύνηση της πρόσφατης εξελικτικής του ιστορίας, αλλά και τη συμβολή στην ανάδειξη και θέσπιση κατάλληλων πρακτικών για τη διατήρησή της.

2. Υλικά και Μέθοδοι

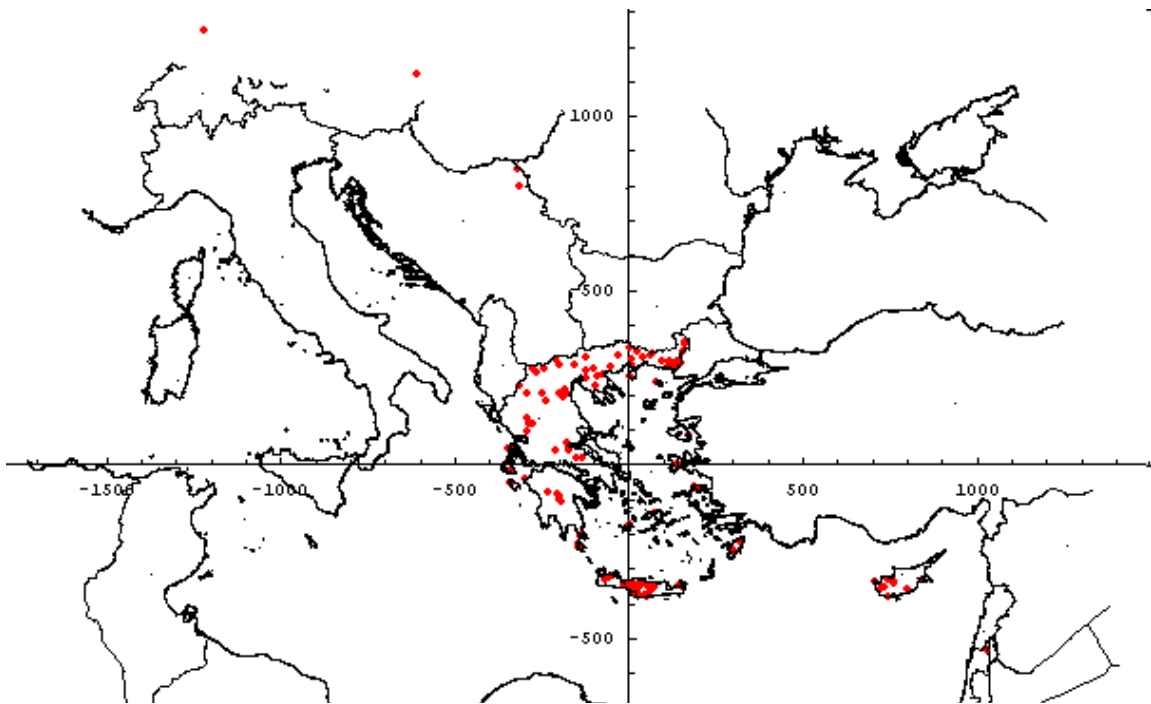
2.1 Συλλογή δειγμάτων

Κατά τη συλλογή των δειγμάτων έγινε προσπάθεια κάλυψης, με όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφο τρόπο, της κατανομής του υπό μελέτη είδους στη περιοχή της νότιας Βαλκανικής χερσονήσου. Σκοπός της προσπάθειας αυτής ήταν να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα απώλειας απλοτύπων, κάτι που μπορεί να οδηγούσε σε παραπλανητικά ή λανθασμένα συμπεράσματα, αφού η αντιπροσώπευση της γενετικής ποικιλότητας του είδους, τόσο σε ένδο- όσο και σε δια-πληθυσμιακό επίπεδο θα ήταν ανεπαρκής. Το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, βρίσκονται αποθηκευμένα στο εργαστήριο Μοριακής Βιοτεχνολογίας και Γενετικής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής (Ι.ΘΑ.ΒΙ.Γ.) του ερευνητικού κέντρου ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Η παρούσα μελέτη βασίζεται σε δείγματα λαγών τα οποία συλλέχθηκαν από κυνηγούς τόσο σε περιοχές της ηπειρωτικής όσο και της νησιώτικης Ελλάδας, της Κύπρου, της Σερβίας, της Γερμανίας και της Αυστρίας. Πιο συγκεκριμένα, δείγματα ιστού λαγών συλλέχθηκαν κατά τις κυνηγετικές περιόδους 1997-2006 με τη βοήθεια 1) των Κυνηγετικών Συλλόγων και κυνηγών της Κρήτης και ιδιαίτερα του 1^{ου} Κυνηγετικού Συλλόγου Ηρακλείου και του προέδρου του κ. Μ. Φραγκιαδουλάκη, καθώς και των κυνηγών Μ. Παπαδημητράκη και Μ. Κοσκινά, 2) των Κυνηγετικών Συλλόγων της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Δασικής Υπηρεσίας της Βορείου Ελλάδας και ιδιαίτερα του δασολόγου Π. Πλατή και της ΣΤ' Κυνηγετικής Ομοσπονδίας Μακεδονίας-Θράκης, 3) των Κυνηγετικών Συλλόγων Τριπόλεως, Μολάων με τη βοήθεια της κ. Ε. Μαραβέλια και της κ. Μ. Μαρουστούκου και του κ. Κάττη Η. του Κυνηγετικού Συλλόγου Λεωνιδίου και κυνηγών της Λακωνίας, 4) του Κυνηγετικού Συλλόγου της Ρόδου και φίλων κυνηγών του νησιού, 5) του Κυνηγετικού Συλλόγου Λευκάδας και κυνηγών στα νησιά των Επτανήσων, 6) κυνηγών της Νάξου και 7) των Κυθήρων, 8) των κυνηγών Δ. Μαυρατζώτη (προέδρου του Κ. Σ. Σάμου κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας) και Δ. Μουρούζη της Σάμου, 9) του Τμήματος Θήρας του Υπουργείου Εσωτερικών της Κυπριακής Δημοκρατίας, 10) του συνεργάτη μας από το Πανεπιστήμιο του Βελιγραδίου Duško Čironić και τέλος 11) του συνεργάτη μας στο Ερευνητικό Ινστιτούτου Οικολογίας Άγριας Πανίδας της Βιέννης, Franz Suchentrunk.

Ο τύπος των δειγμάτων συνίσταται σε τμήμα ιστού, το οποίο συλλέχθηκε αμέσως μετά τη θανάτωση του ζώου και αποθηκεύτηκε σε πλαστικό εργαστηριακό σωληνάκι (ependorff) όγκου 2ml που περιείχε 95% αιθανόλη. Η συγκεκριμένη μέθοδος διατήρησης του ιστού επιλέχθηκε βάσει της ευκολίας που παρουσιάζει κατά το χειρισμό, την τοποθέτηση και μεταφορά των δειγμάτων μέσα στα εργαστηριακά σωληνάρια από τους κυνηγούς, καθώς και τη δίχως ιδιαίτερα προβλήματα εξαγωγή γενωμικού DNA. Τα δείγματα συνοδεύονταν από αναλυτικό πίνακα, στον οποίο ο εκάστοτε κυνηγός ήταν δυνατό να καταγράψει

πληροφορία που σχετιζόταν με την ακριβή περιοχή της δειγματοληψίας, το κατά προσέγγιση βάρος του ατόμου, το φύλο, τα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά (μόνο για τα θηλυκά άτομα που βρίσκονταν σε κατάσταση εγκυμοσύνης ή θηλασμού) και την ημερομηνία που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Τα δείγματα αυτά εν συνεχεία συγκεντρώνονταν στο εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιοτεχνολογίας του Ι.ΘΑ.ΒΙ.Γ. για περαιτέρω μελέτη.

Στον αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν ως προς το mtDNA (90 αλληλουχίες συνολικά από την Ελλάδα, την Κύπρο, τη Σερβία, τη Γερμανία και την Αυστρία) προστέθηκαν και ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από τη βάση γενετικών δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ο συνολικός αριθμός ατόμων που συμπεριλήφθηκε στις αναλύσεις του μιτοχondριακού DNA φτάνει τα 164 άτομα (συμπεριλαμβανομένων και των 3 ειδών που χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδα). Το σύνολο των δειγμάτων, με πληροφορίες για την περιοχή προέλευσης και τον κωδικό πρόσβασης στη γενετική βάση δεδομένων GenBank, παρατίθεται στο **Παράρτημα Ι**. Η γεωγραφική κατανομή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν δίνεται στην **Εικόνα 3.1**. Εξαιρέση αποτελούν τέσσερα άτομα από περιοχές της Βουλγαρίας η ακριβής γεωγραφική προέλευση των οποίων δεν είναι γνωστή και επομένως δεν μπορεί να παρουσιαστεί.



Εικόνα 3.1 Γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Από την εικόνα αυτή εξαιρούνται 4 άτομα από περιοχές της Βουλγαρίας, η ακριβής προέλευση των οποίων είναι άγνωστη. Ο χάρτης αυτός δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Sundial με τη χρήση της γωνιομετρικής προβολής GIS σημείων πάνω σε επίπεδο. Κέντρο αυτής αποτελεί το κεντροειδές-κέντρο βάρους (σημείο τομής των αξόνων) των δειγματοληπτικών περιοχών (μονάδα μέτρησης αποτελεί το km).

2.2 Εργαστηριακές αναλύσεις

Κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών αναλύσεων ελήφθησαν όλες οι απαραίτητες προφυλάξεις, τόσο για την αποφυγή μολύνσεων των δειγμάτων (γάντια, αποστείρωση των υλικών, καθαρισμός του πάγκου εργασίας μετά το πέρας των εργασιών κ.α.) που θα οδηγούσαν σε λανθασμένα αποτελέσματα, όσο και για την ασφάλεια του ερευνητή και του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε. Το σύνολο των εργαστηριακών αναλύσεων περιλαμβάνει συνοπτικά τα ακόλουθα:

- α) εξαγωγή και ποσοτικοποίηση ολικού γενωμικού DNA
- β) πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος του μιτοχονδριακού DNA μέσω της τεχνικής της PCR (Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) και
- γ) προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχησης.

2.2.1 Εξαγωγή και ποσοτικοποίηση ολικού γενωμικού DNA

Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε από μικρά κομμάτια ιστού (1-2 mm³ τμήματος αυτιού, εσωτερικού οργάνου ή μυός). Αναλυτικότερα, τα κομμάτια αυτά μετά τη λειοτριβήσή τους επώαστηκαν στους 55°C για τουλάχιστον 12 ώρες σε διάλυμα πέψης που περιείχε 700μl 10mM Tris-HCl (pH=7,5) και 10mM EDTA (pH=8,0), 87,5μl SDS (10%) και 10μl πρωτεΐνάση K (10mg/ml). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο εξαγωγής με τη μέθοδο των αλάτων σύμφωνα με τους Hillis *et al.* (1996) (αναλυτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου εξαγωγής παρατίθεται στο Παράρτημα Ι του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσής μου, Αντωνίου 2002).

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της εξαγωγής, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού που ανακτήθηκε από το κάθε άτομο. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε με την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας αυτού (2μl) σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για 45min (τάσης 100Volts) μαζί με, γνωστής ποσότητας και μήκους θραυσμάτων DNA, μάρτυρα (DNA Ladder 100bp). Η σύγκριση της έντασης των ζωνών του μάρτυρα με αυτές που προκύπτουν από την εξαγωγή του DNA επέτρεψε τον κατά προσέγγιση προσδιορισμό της ποσότητας ολικού γενωμικού DNA που ανακτήθηκε κατά τη διαδικασία της εξαγωγής. Η καθαρότητα του εκτιμήθηκε τόσο βάσει της οξύτητας των ζωνών που παρουσιάζονται όσο και της παρουσίας ή απουσίας ανεπιθύμητων συστατικών σε μεγάλες ποσότητες (RNA, λοιπά κυτταρικά στοιχεία), τα οποία εμφανίζονται ως μεγάλης έκτασης φθορίζουσες περιοχές (smear). Όπως γίνεται αντιληπτό, η παραπάνω διαδικασία κρίνεται απαραίτητη όχι μόνο για τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA, αλλά και για την εκτίμηση της καθαρότητάς του, που αποτελούν σημαντικά στοιχεία για τον καθορισμό των κατάλληλων συνθηκών στην διαδικασία του ενζυμικού πολλαπλασιασμού (PCR).

Μετά την ποσοτικοποίηση του DNA και δεδομένου ότι μεγάλες ποσότητες DNA ή/και υψηλή ποσότητα ανεπιθύμητων συστατικών στο διάλυμα του ολικού γενωμικού DNA, μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της αντίδρασης πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις στα δείγματα εκείνα όπου κρίθηκε ότι ήταν απαραίτητες.

2.2.2 Πολλαπλασιασμός τμήματος της περιοχής ελέγχου (mtDNA)

Το τμήμα της περιοχής ελέγχου που στοχεύτηκε μέσω της PCR περιελάμβανε ολόκληρη την περιοχή I (ETAS ή CR-I ή HVI), που χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβλητότητα. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR, οι θέσεις στις οποίες προσδένονται καθώς και το μέγεθος της αλληλουχίας που παράγουν παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 3.1**. Οι εκκινητές αυτοί αναπτύχθηκαν από τους Kasapidis *et al.* (2005) βάσει δημοσιευμένων αλληλουχιών της περιοχής ελέγχου διαφόρων ειδών λαγόμορφων.

Πίνακας 3.1 Το όνομα και οι σύνθεση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό τμήματος της περιοχής ελέγχου του mtDNA, το μέγεθος του κομματιού που παράγουν και οι θέσεις πρόσδεσής τους ως προς το μιτοχονδριακό γονιδίωμα του Ευρωπαϊκού λαγού και του συγγενικού ως προς αυτό αγριοκούνελου.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος	Θέση Πρόσδεσης	
			<i>L. europaeus</i> (AJ421471)	<i>O. cuniculus</i> (AJ001588)
Le.L-Dloop	5'-AATTCTCTTTAAACTATTCCTCTGC-3'	511bp	15417-15440	15435-15458
Le.H-Dloop	5'-AAGAACCAGATGCCAGTTATAG-3'		15907-15928	15930-15951

Για την απόκτηση αλληλουχιών υψηλής ποιότητας, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR (**Πίνακα 3.2**), τόσο ως προς τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται, όσο και ως προς το θερμοκρασιακό καθεστώς της αντίδρασης.

Πίνακας 3.2: Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των επιμέρους αντιδραστηρίων και το θερμοκρασιακό καθεστώς της αντίδρασης PCR για το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Τελικές συγκεντρώσεις για κάθε αντίδραση PCR	Συνθήκες		
	Στάδιο	Θ°C	Χρόνος
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq : 1X			
MgCl ₂ : 3mM	Προεπώαση	94°C	2'
dNTPs: 0.15mM	Αποδιάταξη	94°C	1'
Εκκινητής Le.L-Dloop: 0.1μM	Σύνδεση	57°C	1'
Εκκινητής Le.H-Dloop: 0.1μM	Επιμήκυνση	72°C	1'
Taq: 0.5 u	Τελικό Βήμα	72°C	5'
Συνολικός όγκος: 20μl	Κύκλοι	35	

2.2.3 Προσδιορισμός της αλληλουχίας της D-loop

Μετά τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του τμήματος στόχου και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής του στην αντίδραση της PCR, ακολούθησε ο καθαρισμός του με τη βοήθεια σειράς χημικών αντιδραστηρίων (kit) της Qiagen (Qiaquick PCR Purification Kit). Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής σύστασης ήταν άμεσος (απευθείας από το διάλυμα της PCR) και πραγματοποιήθηκε με την αλληλούχιση και των δύο κλώνων του προϊόντος της PCR, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές με αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν και στην αντίδραση πολυμερισμού.

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε μετά από αντίδραση αλληλούχισης με τη χρήση του ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems) και την ηλεκτροφόρηση στη συνέχεια του προϊόντος που προέκυψε σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης (PE-ABI 3700), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι αλληλουχίες που παρήχθησαν, ελέγχθηκαν ως προς τη ποιότητα και τη πιστότητά τους. Η ποιότητα των αλληλουχιών ελέγχθηκε λαμβάνοντας υπόψη την ένταση, την καθαρότητα, αλλά και την οξύτητα των κορυφών του εκάστοτε χρωματογραφήματος με τη βοήθεια του προγράμματος Chromas (v.1.45). Μόνο οι υψηλότερης ποιότητας αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν στις περαιτέρω αναλύσεις. Η πιστότητα των αλληλουχιών αυτών, εκτιμήθηκε αναζητώντας στη βάση γενετικών δεδομένων (NCBI) ομόλογες αλληλουχίες (BLAST) με υψηλό ποσοστό ομοιότητας. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η επιβεβαίωση του οργανισμού από τον οποίο προήλθαν οι αλληλουχίες αυτές και επομένως η ανίχνευση τυχών επιμολύνσεων των δειγμάτων με γενετικό υλικό άλλων οργανισμών.

2.3 Φυλογενετικές Αναλύσεις

2.3.1 Στοιχίση των αλληλουχιών

Η στοιχίση (ή ευθυγράμμιση) των αλληλουχιών και η φυλογενετική ανάλυση συνδέονται άρρηκτα μεταξύ τους, δεδομένου ότι μια «αξιόπιστη» φυλογένεση στηρίζεται

στην εκτίμηση της εξελικτικής συνάφειας (συγγένειας) των υπό μελέτη αλληλουχιών, και η οποία με τη σειρά της βασίζεται στην σωστή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών αυτών (Felsenstein 2004).

Η στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αποτελεί το πρώτο βασικό και κρίσιμο βήμα σε όλες της μελέτες μοριακής εξέλιξης (Hickson *et al.* 2000). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι όσο αυξάνεται η μεταξύ των αλληλουχιών διαφοροποίηση, τόσο δυσκολότερη καθίσταται η δημιουργία αξιόπιστης στοίχισης, η οποία να αντανakλά τις ιστορικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών και επομένως και των ταξινομικών ομάδων που χαρακτηρίζουν.

Η στοίχιση των υπό μελέτη αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTALX (Thompson *et al.* 1997). Οι καταλληλότερες τιμές των παραμέτρων στοίχισης για τις υπό μελέτη αλληλουχίες ήταν οι ακόλουθες: pairwise: gap opening=10, gap extension=0,1, multiple: gap opening=10, gap extension=0,2, delay divergent sequences=30%, DNA transition weight=0,5 οι οποίες αποτελούν και τις προεπιλεγμένες από το πρόγραμμα τιμές. Το επαγόμενο από το παραπάνω πρόγραμμα, πρότυπο στοίχισης ελέγχθηκε συνέχεια με το μάτι με απώτερο στόχο την βελτίωσή αυτής.

2.3.2 Έλεγχος ομοπλασίας

Η ύπαρξη πολλαπλών μεταλλαγών σε μια νουκλεοτιδική θέση οδηγεί στην εμφάνιση κορεσμού, ο οποίος με τη σειρά του αυξάνει την πιθανότητα ομοπλασίας, φαινόμενο ανεπιθύμητο στις φυλογενετικές αναλύσεις, αφού αποκρύπτει τις «πραγματικές» εξελικτικές σχέσεις των αλληλουχιών. Στο mtDNA των ζώων, ο ρυθμός που συμβαίνουν μεταπτώσεις είναι μεγαλύτερος από εκείνου των μεταστροφών. Αρχικά, οι μεταπτώσεις συσσωρεύονται γραμμικά σε σχέση με τη γενετική απόσταση των αλληλουχιών, αλλά γρήγορα, λόγω πολλαπλών αντικαταστάσεων στην ίδια θέση, παρατηρείται κορεσμός. Αντίθετα, οι μεταστροφές συσσωρεύονται με μικρότερο ρυθμό και η συσσώρευσή τους είναι γραμμική ακόμα και για μεγάλες γενετικές αποστάσεις.

Ο έλεγχος ύπαρξης κορεσμού (και ενδεχόμενης ομοπλασίας) στο υπό μελέτη τμήμα της περιοχής ελέγχου του mtDNA, πραγματοποιήθηκε αναπαριστώντας γραφικά τον απόλυτο αριθμό των μεταπτώσεων και των μεταστροφών, που παρουσιάζονται στις μεταξύ ζευγών αλληλουχιών συγκρίσεις και των αντίστοιχων γενετικών αποστάσεων (μοντέλο Tamura & Nei: Tamura & Nei 1993) με τη βοήθεια του προγράμματος DAMBE (v. 5.0.5) (Xia & Xie 2001). Φαινόμενα κορεσμού υποδεικνύονται από τυχόν αποκλίσεις του συνόλου των αντικαταστάσεων (των μεταπτώσεων και μεταστροφών σε κάθε νουκλεοτιδική θέση), από τη γραμμική σχέση. Αναλυτικότερα, η γραμμική συσχέτιση των παραπάνω παραμέτρων είναι

ενδεικτική της απουσίας του φαινομένου του κορεσμού, ενώ η ασυμπτωτική συσχέτιση είναι ενδεικτική ύπαρξης κορεσμού στις υπό μελέτη αλληλουχίες.

2.3.3 Εκτίμηση αριθμού απλοτύπων και νουκλεοτιδικής ποικιλότητας

Ο αριθμός των απλοτύπων εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Arlequin (v. 3.11, Excoffier *et al.* 2005). Σύμφωνα με αυτό δημιουργείται αρχικά ένας πίνακας γενετικών αποστάσεων, όπου τα άτομα εκείνα που χαρακτηρίζονται από μηδενική γενετική απόσταση φέρουν ουσιαστικά τον ίδιο απλότυπο. Επιπλέον, με τη χρήση του προγράμματος DNASP (v. 4.0, Rozas *et al.* 2003), πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση των τιμών νουκλεοτιδικής ποικιλότητας ανά νουκλεοτιδική θέση (π, Nei 1987) για τα άτομα τις Ελλάδας και της Κύπρου.

2.3.4 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ ζευγών των υπό μελέτη αλληλουχιών εκτιμήθηκαν βάσει του μοντέλου των Tamura & Nei (TrN, Tamura & Nei 1993) με τη βοήθεια του φυλογενετικού προγράμματος MEGA v3.1 (Kumar *et al.* 2004). Το μοντέλο αυτό θεωρείται το καταλληλότερο απλό μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης για την περιγραφή του προτύπου εξέλιξης και την εκτίμηση γενετικών αποστάσεων αλληλουχιών της περιοχής ελέγχου του mtDNA. Η καταλληλότητά του αυτή έγκειται στο γεγονός ότι λαμβάνονται υπόψη τα φαινόμενα εκείνα που χαρακτηρίζουν το πρότυπο εξέλιξης του τμήματος αυτού, όπως το πλεόνασμα των μεταστροφών, οι άνισες συχνότητες νουκλεοτιδίων και οι μεταβολές του ρυθμού αντικατάστασης στις διαφορετικές νουκλεοτιδικές θέσεις (Tamura & Nei 1993).

Για την καλύτερη δυνατή παρουσίαση των εξελικτικών σχέσεων που διέπουν τα άτομα του είδους, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίησή τους σύμφωνα με τη γεωγραφική τους προέλευση (ομαδοποίηση ατόμων από σαφώς οριοθετημένες γεωγραφικές περιοχές, όπως νησιά ή περιοχών απομονωμένων σχετικά από άλλες) και ο υπολογισμός στη συνέχεια των μεταξύ τους γενετικών αποστάσεων. Η ομοιογένεια (ή ετερογένεια) των παραπάνω ομαδοποιήσεων εκτιμήθηκε βάσει της μέσης τιμής των ανά ζεύγη γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων της κάθε ομαδοποίησης (ενδο-ομαδική ή ενδο-πληθυσμιακή διαφοροποίηση). Επιπρόσθετα για το σύνολο των γενετικών αποστάσεων που προαναφέρθηκαν, εκτιμήθηκαν και οι αντίστοιχες διορθωμένες ως προς την ενδο-ομαδική ποικιλότητα, γενετικές αποστάσεις (net average nucleotide divergence). Η εκτίμηση των διορθωμένων αυτών γενετικών αποστάσεων έγινε με το φυλογενετικό πρόγραμμα MEGA σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο $dA = dXY - (dX + dY) / 2$, όπου dXY είναι η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των ομάδων X και Y, και dX και dY οι μέσες ενδο-ομαδικές γενετικές αποστάσεις των ομάδων X και Y αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ μεγαλύτερων ομαδοποιήσεων, όπως αυτές προέκυψαν από

την τοπολογία των φυλογενετικών δένδρων που παρήχθησαν κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή, αλλά και από αναλύσεις δικτύου απλοτύπων, όπως αυτό παρουσιάστηκε στη μελέτη των Kasapidis *et al.* (2005). Αναλυτικές περιγραφές του συνόλου των ομαδοποιήσεων και των μεταξύ τους γενετικών αποστάσεων δίνονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων του κεφαλαίου αυτού.

2.3.5 Απομόνωση λόγω απόστασης (Isolation by distance)

Ο όρος «απομόνωση λόγω απόστασης» (“isolation by distance”, IBD) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Sewall Wright (1938, 1940) για την περιγραφή προτύπων πληθυσμιακής γενετικής ποικιλότητας που προκύπτουν από περιορισμένη γονιδιακή ροή στο χώρο (συσσώρευση γενετικής διαφοροποίησης σε τοπικό επίπεδο, υπό συνθήκες περιορισμένης γεωγραφικά διασποράς). Το θεωρητικό υπόβαθρο της IBD αναπτύχθηκε στη συνέχεια και από άλλους, όπως οι Malecot (1968), Kimura & Weiss (1964), Maguyama (1971) και Nagylaki (1976). Η IBD ορίζεται ως η μείωση της γενετικής ομοιότητας μεταξύ πληθυσμών με την αύξηση της μεταξύ τους γεωγραφικής απόστασης. Στατιστικοί έλεγχοι του φαινομένου της IBD μπορούν να διεξαχθούν έχοντας ως δομική μονάδα τους πληθυσμούς μιας περιοχής ή τα άτομα αυτής, υπολογίζοντας αρχικά έναν πίνακα γενετικών ομοιοτήτων ή αποστάσεων και έναν πίνακα γεωγραφικών αποστάσεων ανά ζεύγη δομικών μονάδων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου του Mantel (Mantel test) για την εξακρίβωση του κατά πόσο η συσχέτιση των δύο αυτών πινάκων είναι τυχαία ή όχι.

Για τον έλεγχο ύπαρξης του προτύπου IBD στα υπό μελέτη άτομα του Ευρωπαϊκού λαγού χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα IBDWS (Isolation by Distance Web Service, <http://ibdws.sdsu.edu/>, Jensen *et al.* 2005). Το πρόγραμμα αυτό επιτρέπει τη χρήση του Mantel test για τον έλεγχο της σχέσης μεταξύ δύο πινάκων (σε αυτήν την περίπτωση του πίνακα των γενετικών αποστάσεων με αυτόν των γεωγραφικών αποστάσεων) και πραγματοποιεί εκτίμηση της κλίσης και του συντελεστή παλινδρόμησης της σχέσης αυτής χρησιμοποιώντας την μέθοδο «μειωμένου κύριου άξονα» (reduced major axis, RMA). Η τελευταία θεωρείται πιο αμερόληπτη από ότι η γραμμική παλινδρόμηση, σε περιπτώσεις όπου οι μετρήσεις της ανεξάρτητης κυρίως μεταβλητής εμπεριέχουν σφάλμα (Hellberg 1994). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, πολλοί είναι οι μελετητές που προτείνουν τον λογαριθμικό μετασχηματισμό (στη βάση του 10) των γενετικών ή/και των γεωγραφικών αποστάσεων πριν την εκπόνηση της ανάλυσης (Slatkin 1993, Hutchinson & Templeton 1999). Το πρόγραμμα IBDWS πραγματοποιεί το σύνολο των παραπάνω μετασχηματισμών με στόχο την καλύτερη δυνατή διεξαγωγή της ανάλυσης.

Ο έλεγχος IBD πραγματοποιήθηκε ορίζοντας το άτομο ως δομική μονάδα, βάσει των γενετικών αποστάσεων του μοντέλου TrN, και μόνο για τα άτομα εκείνα που καταλαμβάνουν

συνεχείς γεωγραφικές περιοχές. Αναλυτικότερα, έλεγχος πραγματοποιήθηκε για τρεις συνολικά ομάδες δεδομένων οι οποίες περιλαμβάνουν άτομα από α) την ηπειρωτική Ελλάδα, β) την Κρήτη και γ) την Κύπρο, αφού η κατανομή τους καλύπτει μεγάλης έκτασης γεωγραφικές περιοχές και ο αριθμός των δειγμάτων που έχουμε από αυτές θεωρείται επαρκής (και επομένως αμερόληπτος) για τη διεξαγωγή της παραπάνω ανάλυσης. Η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA. Ο πίνακας των γεωγραφικών αποστάσεων εκτιμήθηκε από τις γεωγραφικές συντεταγμένες των ατόμων, στη μορφή Ευκλείδειων αποστάσεων μεταξύ δύο σημείων πάνω σε σφαίρα (σύστημα αναφοράς WGS84) με τη βοήθεια του προγράμματος Geographic Distance Matrix Generator (v. 1.2.2, http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg).

2.3.6 Γεωγραφικά πρότυπα γενετικής διαφοροποίησης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο της σχέσης μεταξύ των γενετικών και των γεωγραφικών αποστάσεων, όπως η αυτοσυσχέτιση στο χώρο (spatial autocorrelation) και η παλινδρόμηση, αν και παρέχουν αξιόπιστη πληροφορία της πιθανής διαμόρφωσης του γενετικού τοπίου, αποτυγχάνουν στον προσδιορισμό συγκεκριμένων περιοχών στις οποίες παρουσιάζονται γενετικά φράγματα, δηλαδή περιοχών, όπου η υπό μελέτη μεταβλητή παρουσιάζει απότομη μεταβολή και επομένως εμφανίζει ασυνέχεια. Καταλληλότερες για τον εντοπισμό γενετικών φραγμάτων μεθοδολογίες είναι οι προσεγγίσεις που βασίζονται στην υπολογιστική γεωμετρία (computational geometry), αφού βάσει αυτών είναι δυνατός ο γεωγραφικός εντοπισμός των γενετικών φραγμάτων και της κατεύθυνσής τους.

Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του συνόλου των υπό μελέτη ατόμων για τα οποία ήταν γνωστές οι ακριβείς θέσεις δειγματοληψίας (εξαιρέση αποτελούν τα 4 άτομα από περιοχές της Βουλγαρίας) με τη βοήθεια του προγράμματος Barrier (v.2.2, Manni *et al.* 2004). Το πρόγραμμα αυτό παρέχει τη δυνατότητα οπτικοποίησης πάνω σε χάρτη της τάσης των δεδομένων, που στην περίπτωσή μας αποτελούν οι μεταξύ των ατόμων γενετικές αποστάσεις. Η χρήση του αλγόριθμου μέγιστης διαφοροποίησης του Monmonier (1973) επιτρέπει την εύρεση των ορίων (πλευρών) εκείνων που σχετίζονται με τον υψηλότερο ρυθμό μεταβολής των τιμών ενός πίνακα αποστάσεων (οι οποίες θα μπορούσαν να είναι γενετικές, μορφολογικές ή ο,τιδήποτε άλλο). Το πρώτο βήμα της ανάλυσης αυτής συνίσταται στη δημιουργία ενός γεωμετρικού δικτύου που συνδέει το σύνολο των ατόμων ή πληθυσμών (συνδέει ουσιαστικά τις δειγματοληπτικές τους θέσεις), βάσει της τριγωνοποίησης Delaunay (Brassel & Reif 1979). Η τριγωνοποίηση Delaunay αποτελεί τη γρηγορότερη μέθοδο σύνδεσης γειτονικών σημείων (τοποθεσίες) πάνω σε επίπεδο χάρτη, που γίνεται μέσω τριγώνων και αποτελεί τη δυική δομή του μωσαϊκού Voronoi (Voronoi 1908). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μια μορφή δικτύου να μπορεί να προκύψει από την άλλη. Αναλυτικότερα, το μωσαϊκό Voronoi (πολύγωνα) μπορεί να δημιουργηθεί βάσει της

τριγωνοποίησης Delaunay και αντιστρόφως. Μετά τη ολοκλήρωση της δημιουργίας του δικτύου ακολουθεί η αντιστοίχιση της κάθε πλευράς του δικτύου με την τιμή της απόστασης που χαρακτηρίζει τα δύο σημεία που τη δημιουργούν, η οποία στην παρούσα μελέτη, προσδιορίζεται από τον πίνακα των γενετικών αποστάσεων. Στη συνέχεια βάσει του αλγορίθμου μέγιστης διαφοροποίησης του Monmonier, γίνεται η αναγνώριση των ορίων εκείνων στα οποία οι μεταξύ των ατόμων (ή πληθυσμών) διαφοροποίηση είναι η μέγιστη. Το πρώτο όριο σχεδιάζεται κάθετα στις πλευρές της τριγωνοποίησης (ουσιαστικά πάνω στην πλευρά ενός πολυγώνου Voronoi), ξεκινώντας από την πλευρά εκείνη όπου η τιμή της γενετικής απόστασης είναι η μέγιστη (από το σύνολο των τιμών) και προχωρώντας δια μέσου γειτονικών πλευρών, ακολουθώντας και πάλι την κατεύθυνση που περιλαμβάνει τις υψηλότερες τιμές γενετικών αποστάσεων. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι τη στιγμή εκείνη όπου το σχηματιζόμενο φράγμα φτάνει είτε στα όρια του δικτύου (δηλαδή του χάρτη), είτε σε τμήμα του ιδίου (σχηματίζοντας θηλιά γύρω από σημείο ή σημεία) ή άλλου φράγματος. Στις περιπτώσεις εκείνες, όπου παρατηρείται η ίδια τιμή γενετικής απόστασης σε δύο πλευρές του δικτύου, επιλέγεται εκείνη που ακολουθείται από την πλευρά με την υψηλότερη τιμή. Τα φράγματα που υπολογίζονται είναι πολλαπλά και η εμφάνισή τους είναι ιεραρχημένη (από τα πιο ισχυρά στα λιγότερο ισχυρά ως προς τις τιμές των αποστάσεων).

Τρεις ομαδοποιήσεις ατόμων αναλύθηκαν βάσει της παραπάνω μεθοδολογίας. Η πρώτη περιελάμβανε το σύνολο των υπό μελέτη ατόμων, η δεύτερη τα άτομα της Κρήτης και η τρίτη τα άτομα της Κύπρου. Οι ομαδοποιήσεις αυτές επιλέχθηκαν βάσει της πυκνότητας και της ποσότητας των δειγματοληπτικών θέσεων, καθώς και της έκτασης την οποία καταλαμβάνουν, παράμετροι εξέχουσας σημασίας για την διεξαγωγή της παραπάνω ανάλυσης.

2.3.7 Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης

Για την επιλογή του μοντέλου νουκλεοτιδικής αντικατάστασης που περιγράφει καλύτερα το σύνολο των υπό ανάλυση δεδομένων, εφαρμόστηκε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT), η αντίστοιχη του κριτηρίου της ελάχιστης πληροφορίας (Akaike Information Criterion, AIC) και του κριτηρίου της Μπεϋζιανής πληροφορίας (Bayesian Information Criterion, BIC). Το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεκπεραίωση αυτών ήταν το ModelTest (v. 3.7, Posada & Crandall 1998). Για την εκτίμηση της πιθανότητας του καθενός από τα 56 μοντέλα εξέλιξης (νουκλεοτιδικής αντικατάστασης) ως προς το σύνολο των αλληλουχιών που αναλύθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το φυλογενετικό πακέτο PAUP (v.4.0b10, Swofford 2002).

2.3.8 Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης

Το σύνολο των δεδομένων υποβλήθηκαν σε ανάλυση Σύνδεσης Γειτόνων (ΣΓ, Neighbor-Joining), Μέγιστης Φειδωλότητας (ΜΦ, Maximum Parsimony), Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ΜΠ, Maximum Likelihood) και Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ, Bayesian Inference). Η ανάλυση ΜΣ επαναλήφθηκε δύο φορές και στην κάθε μια από αυτές «αναλύθηκαν» 8 ανεξάρτητες αλυσίδες με 10^7 επαναλήψεις (γενεές) σε κάθε αλυσίδα, οι πρώτες 10^6 εκ των οποίων αγνοήθηκαν ως περίοδος αστάθειας των τιμών πιθανοφάνειας (burn-in). Ο καθορισμός της περιόδου burn-in έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Tracer (v.1.4, Rambaut & Drummond 2004). Όλα τα φυλογενετικά δένδρα, πλην αυτού της ΜΣ, εξετάστηκαν ως προς τη στατιστική τους ισχύ με τη δοκιμασία bootstrap. Το πλήθος των ψευδοδειγμάτων στη δοκιμασία bootstrap ήταν 1.000 σε όλες τις μεθόδους εκτός της ΜΠ, όπου ο αριθμός τους περιορίστηκε στα 100, για καθαρά υπολογιστικούς λόγους. Τα φυλογενετικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτόν ήταν τα: MEGA (v 3.1, Kumar *et al.* 2004), PAUP (v.4.0b10, Swofford 2002), RAxML (v. 4.0.0, WebServer, Stamatakis 2006) και MrBayes (v. 3.0B4, Ronquist & Huelsenbeck 2003). Η οπτικοποίηση των παραγόμενων δένδρων βάσει των μεθόδων ΣΓ, ΜΦ και ΜΠ πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα TreeView (v. 1.6.6).

Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδες στο σύνολο των φυλογενετικών αναλύσεων ήταν αυτές των ειδών: *L. capensis mediterraneus* (εξελικτικά πιο συγγενικό στο υπό μελέτη είδος), και *L. corsicanus*, *L. granatensis* (πιο απομακρυσμένα taxa), όπως έχει δειχθεί από προγενέστερες μελετες (π.χ. Pierpaoli *et al.* 1999).

2.3.9 Έλεγχος ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού

Η ανακάλυψη του μοριακού ρολογιού, ενός δηλαδή σχετικά σταθερού ρυθμού μοριακής εξέλιξης, διεύρυνε την οδό προς την κατανόηση των μηχανισμών της μοριακής εξέλιξης και είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός από τα χρησιμότερα εργαλεία της βιολογίας. Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξή του οφείλονται σε παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ δύο ειδών αποτελεί συνάρτηση του χρόνου απόσχισής τους. Σύμφωνα με τους Kimura & Ohta (1971) η ύπαρξη ενός σταθερού και χαρακτηριστικού για κάθε τμήμα DNA ρυθμού εξέλιξης, οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στις ουδέτερες μεταλλάξεις (στις οποίες δεν επιδρά η φυσική επιλογή), αφού οι θνησιγόνες μεταλλάξεις απομακρύνονται γρήγορα εξαιτίας της δράσης της φυσικής επιλογής, ενώ εκείνες που προσδίδουν πλεονέκτημα είναι σχετικά σπάνιες. Ο ρυθμός συσσώρευσης των ουδέτερων μεταλλαγών επηρεάζεται μόνο από τον μεταλλακτικό ρυθμό και επομένως αναμένεται να είναι σχετικά σταθερός. Με άλλα λόγια, ο μακροπρόθεσμος ρυθμός της ουδέτερης μοριακής εξέλιξης ενός είδους είναι ο ίδιος με τον ουδέτερο ρυθμό μεταλλαγής

του DNA των ατόμων του είδους. Ωστόσο διαφορετικά τμήματα του DNA χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης. Ο Dickerson (1971) διατύπωσε την άποψη ότι η διαφορά αυτή μπορεί να ερμηνευτεί από το ποσοστό των ουδέτερων θέσεων στο εκάστοτε τμήμα DNA, με αποτέλεσμα όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό αυτό, τόσο υψηλότερος να είναι και ο ρυθμός της μοριακής εξέλιξης που το χαρακτηρίζει. Σύμφωνα με τη θεωρία της ουδετερότητας, δοσμένου ενός μεταλλακτικού ρυθμού και του ποσοστού των ουδέτερων θέσεων, ο ρυθμός εξέλιξης θα πρέπει να είναι σταθερός. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν δείξει εκτεταμένη διακύμανση του εξελικτικού ρυθμού. Σύμφωνα με την θεωρία της σχεδόν ουδετερότητας (nearly neutral theory, Ohta 2002) η μεταβλητότητα του εξελικτικού ρυθμού οφείλεται στις μεταβολές α) του μεταλλακτικού ρυθμού, β) του πληθυσμιακού μεγέθους και γ) των συντελεστών επιλογής. Οι παράγοντες αυτοί διαφέρουν μεταξύ των τμημάτων του DNA, των ειδών ή/και κατά τη διάρκεια του χρόνου, δημιουργώντας έτσι διακυμάνσεις του ρυθμού αντικατάστασης μεταξύ των ειδών (lineage effects) και επακόλουθης μεροληψίας των χρόνων απόκλισης στην περίπτωση που δεν ληφθούν υπόψη.

Αρκετές είναι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού μεταξύ ενός αριθμού αλληλουχιών. Αυτές κυμαίνονται από τις πιο απλές, που συνίστανται στην απλή διαίρεση των γενετικών αποστάσεων με έναν ρυθμό ο οποίος έχει εκτιμηθεί από κάποιο σημείο βαθμονόμησης (calibration point), έως τις πιο σύνθετες (Maximum Likelihood, Bayesian approaches) στις οποίες λαμβάνονται υπόψη περισσότερες παράμετροι (βλέπε παρακάτω). Η αξιοπιστία των μεθόδων αυτών βασίζεται στην ακρίβεια με την οποία γίνεται η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων και στην καταλληλότητα των ρυθμιστικών σημείων που χρησιμοποιούνται επομένως και του ρυθμού εξέλιξης που υπολογίζεται. Η επιλογή του μοντέλου νουκλεοτιδικής αντικατάστασης επιδρά σημαντικά στην ακρίβεια με την οποία γίνεται η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων και επομένως στην εγκυρότητα των εκτιμώμενων χρόνων απόκλισης. Η διακύμανση του ρυθμού εξέλιξης μεταξύ των γενεαλογιών αποτρέπει ουσιαστικά τη χρήση του σε άλλη γενεαλογική γραμμή από αυτή που έχει αρχικά εκτιμηθεί και την εκτίμηση των χρόνων απόκλισης, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκείνες που η δεύτερη γενεαλογική γραμμή είναι αρκετά απομακρυσμένη εξελικτικά από την πρώτη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, αν και η ύπαρξη ενός παγκόσμιου μοριακού ρολογιού δεν υφίσταται, ωστόσο κάλλιστα μπορούμε να αναφερθούμε σε μοριακό ρολόι που χτυπάει αμερόληπτα για μία ομάδα εξελικτικά συγγενικών ειδών, όπου η ετερογένεια του ρυθμού διαφοροποίησής τους δεν αναμένεται να είναι μεγάλη (Takezaki *et al.* 1995). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι μια από τις παραδοχές όλων των φυλογενετικών μεθόδων αποτελεί ο σταθερός εξελικτικός ρυθμός των μελετώμενων αλληλουχιών, χωρίς ωστόσο να δείχνουν όλες την ίδια ανοχή στις περιπτώσεις εκείνες που η συνθήκη αυτή παραβιάζεται (Nei & Kumar 2000).

Μέχρι σήμερα διάφορες είναι οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο α) του κατά πόσο μια γενεαλογική γραμμή εξελίσσεται με τον ίδιο ή διαφορετικό ρυθμό σε σχέση με κάποια άλλη και β) της ομοιογένειας ή όχι του εξελικτικού ρυθμού σε ένα σύνολο εξεταζόμενων αλληλουχιών. Στην πρώτη περίπτωση ο έλεγχος επιτυγχάνεται με τους Ελέγχους Σχετικού Ρυθμού (Relative Rate Test). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το Relative Rate Test των Margoliash (1963) και Sarich & Wilson (1973) και ο μη παραμετρικός έλεγχος σχετικού ρυθμού (Gu & Li 1992, Tajima 1993). Αυτή η προσέγγιση δεν λαμβάνει υπόψη κάποιο συγκεκριμένο μοντέλο και έτσι αγνοεί τις πολλαπλές αντικαταστάσεις, οι οποίες αλλοιώνουν την εικόνα των παρατηρούμενων αλλαγών. Στη δεύτερη περίπτωση, αντίθετα, χρησιμοποιούνται οι Έλεγχοι Ετερογένειας του Εξελικτικού Ρυθμού (Rate Heterogeneity Tests). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα Two-Cluster test και το Branch-length test των Takezaki *et al.* (1995), καθώς και ο έλεγχος του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, Felsenstein 1981, 1988).

Για τον έλεγχο της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού τόσο στο σύνολο των αλληλουχιών του είδους *L. europaeus*, όσο και σε επιμέρους ομαδοποιήσεις εντός αυτού («ανατολικός» και «δυτικός» κλάδος), εφαρμόστηκε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT) με τη βοήθεια του φυλογενετικού προγράμματος PAUP (v.4.0b10, Swofford 2002). Η μέθοδος αυτή αποτελεί ουσιαστικά έναν έλεγχο υποθέσεων. Συνίσταται στην σύγκριση της τιμής μέγιστης πιθανοφάνειας του φυλογενετικού δένδρου ΜΠ, κατά την οποία τα δεδομένα ερμηνεύονται από το μοντέλο πολλαπλών ρυθμών νουκλεοτιδικής αντικατάστασης (full model) με αυτή που προκύπτει από το μοντέλο ενός σταθερού ρυθμού (restricted model). Από αυτές εκτιμάται το στατιστικό του ελέγχου ($\chi^2=2 \times [(-\ln L_{\text{CLOCK}}) - (-\ln L_{\text{UNCONSTRAINED}})]$, $df = \text{αριθμός τελικών κόμβων} - 2$, Felsenstein 1981) δηλαδή ο λόγος των πιθανοφανειών (likelihood ratio, LR). Στην περίπτωση στατιστικής σημαντικότητας, το μοντέλο των πολλαπλών ρυθμών αντικατάστασης θεωρείται καταλληλότερο για την περιγραφή των δεδομένων σε σχέση με το μοντέλο ενός σταθερού ρυθμού αντικατάστασης απορρίπτοντας έτσι την υπόθεση ισχύος ενός μοριακού ρολογιού (Bromham & Penny 2003).

Οι έλεγχοι για την ύπαρξη μοριακού ρολογιού με τις μεθοδολογίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, αν και χρησιμοποιούνται ευρύτατα στον τομέα της φυλογένεσης, ωστόσο έχουν αποδειχθεί λιγότερο ισχυρές σε περιπτώσεις ανάλυσης μικρού μήκους αλληλουχιών ή τμημάτων DNA που χαρακτηρίζονται από χαμηλούς εξελικτικούς ρυθμούς. Εναλλακτική προσέγγιση στην προσπάθεια εύρεσης τμημάτων DNA που χαρακτηρίζονται από σταθερό ρυθμό εξέλιξης, αποτελεί η εκτίμηση των πολλαπλών ρυθμών αντικατάστασης των δεδομένων και η χρήση της πληροφορίας αυτής για τη δημιουργία διαστημάτων εμπιστοσύνης (ορίων) των πιθανών χρόνων απόκλισης (Bromham & Hendy 2000). Ωστόσο

κάτι τέτοιο απαιτεί αρκετά σημεία βαθμονόμησης, κάτι που στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν είναι εφικτό.

Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση αποτελεί η ακριβής περιγραφή του μοντέλου διακύμανσης του ρυθμού αντικατάστασης βάσει της φυλογένεσης (Sanderson 1997, Kishino *et al.* 2001). Οι Μπεϋζιανές μέθοδοι επιτρέπουν τη συσχέτιση των εξελικτικών ρυθμών μεταξύ των κόμβων ενός φυλογενετικού δένδρου σύμφωνα με δεδομένο, βάσει άλλων αναλύσεων, μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης.

Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των χρόνων απόκλισης και των ρυθμών αντικατάστασης των υπό μελέτη αλληλουχιών με το πρόγραμμα r8s (v. 1.71, Sanderson 1997, 2003) με τη χρήση μη παραμετρικών μεθόδων που χαλαρώνουν την προϋπόθεση ενός σταθερού ρυθμού εξέλιξης. Η ανάλυση αυτή βασίστηκε στο φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε βάσει της μεθόδου της Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (στο οποίο υπάρχει η πληροφορία εκτίμησης του μήκους των κλάδων του και επομένως του αριθμού των αντικαταστάσεων κατά μήκος του κάθε κλάδου). Ως σημείο βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε η χρονολογία εμφάνισης του γένους *Lepus*, η οποία σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων, έγινε 2.5-3 εκ. χρόνια πριν από σήμερα (Lopez-Martinez 1980). Η εκτίμηση των χρόνων απόκλισης αλλά και των ρυθμών αντικατάστασης πραγματοποιήθηκε με την μη παραμετρική προσέγγιση εξομάλυνσης του εξελικτικού ρυθμού (Nonparametric rate smoothing, NPRS: Sanderson 1997) θέτοντας ως κριτήριο ακαταλληλότητας την έντονη (τάχιση) μεταβολή του εξελικτικού ρυθμού μεταξύ γειτονικών κλάδων.

3. Αποτελέσματα

3.1 Περιγραφικά στοιχεία των αλληλουχιών που παράχθηκαν

Το μήκος των αλληλουχιών που παράχθηκαν κυμαίνεται από 309bp έως 467bp με την πλειοψηφία αυτών να έχουν μήκος 461bp. Στο σύνολο των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις η μικρότερη αλληλουχία είχε μήκος 290bp, ενώ η μεγαλύτερη 467bp με την πλειοψηφία αυτών να αποτελείται από 429bp.

Η μέση νουκλεοτιδική σύσταση του συνόλου των αλληλουχιών που αναλύθηκαν (σε παρένθεση η νουκλεοτιδική σύσταση εξαιρώντας τις αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδες) είναι: θυμίνη (T) 29,8% (29,8%), κυτοσίνη (C) 29,9% (30%), αδενίνη (A) 29,8% (29,7%) και γουανίνη (G) 10,4% (10,5%). Ενώ η συχνότητα της G είναι πολύ μικρή (10,4%), τα ποσοστά των υπόλοιπων βάσεων (A, T και C) είναι σχεδόν ταυτόσημα και κυμαίνονται από 29,8% έως 29,9%. Επομένως η νουκλεοτιδική σύσταση εμφανίζει ισχυρή μεροληψία εναντίον της γουανίνης (Bias C του Irwin *et al.* 1991), στοιχείο που είναι χαρακτηριστικό του μιτοχονδριακού DNA των θηλαστικών (Irwin *et al.* 1991).

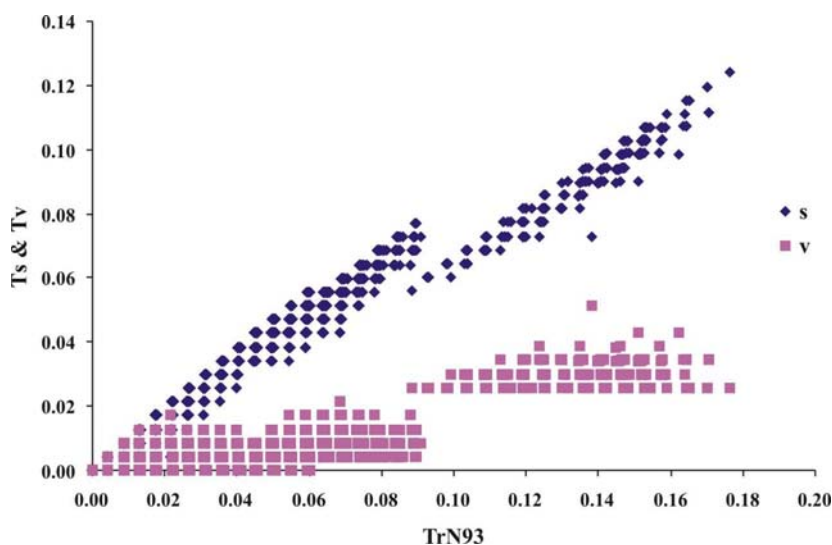
Αριθμός απλοτύπων

Από τις 90 νέες αλληλουχίες προέκυψαν 55 απλότυποι, 46 από τους οποίους είναι νέοι για το είδος, οι οποίοι έρχονται να προστεθούν στους 44 ήδη δημοσιευμένους απλότυπους από την ίδια γεωγραφικά περιοχή μελέτης (Kasapidis *et al.* 2005). Στο σύνολο των αλληλουχιών που συμπεριλήφθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις (143 OTUs εξαιρουμένων 3 που χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδα) παρατηρήθηκαν 99 απλότυποι. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι τα άτομα που φέρουν κοινούς απλοτύπους εντοπίζονται σε κοντινές γεωγραφικά περιοχές. Αναλυτικότερα, η πλειοψηφία των ατόμων με κοινούς απλοτύπους προέρχεται από τον ίδιο νομό (ή επαρχία για τα δείγματα της Κύπρου), ενώ ένας μικρός αριθμός απλοτύπων είναι κοινός μεταξύ γειτονικών νομών. Ο αριθμός των αλληλουχιών και των απλοτύπων ανά γεωγραφική περιοχή (νομό, επαρχία ή νησί), καθώς και οι γεωγραφικές περιοχές που παρουσιάζουν κοινούς απλοτύπους παρατίθενται στο **Παράρτημα I**. Ο συνολικός αριθμός των απλοτύπων για την περιοχή της Ελλάδας φτάνει τους 78 (στα 136 άτομα 57,35%) και για το νησί της Κύπρου τους 7 (στα 12 άτομα 58,33%). Η νουκλεοτιδική ποικιλότητα που εμφανίζουν τα άτομα της Ελλάδας ισούται με $\pi = 0,06627$ (SD $\pm 0,01682$), ενώ η αντίστοιχη τιμή για τα άτομα της Κύπρου ισούται με $\pi = 0,00393$ (SD $\pm 0,00088$).

Ανάλυση κορεσμού

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κορεσμού των αντικαταστάσεων απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.2**. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, τόσο οι μεταπτώσεις όσο και οι

μεταστροφές, συσσωρεύονται σχεδόν γραμμικά με την αύξηση της γενετικής απόστασης όταν αναφερόμαστε στο υπό εξέταση είδος *Lepus europaeus* (ενδοομάδα). Οι μεταστροφές ωστόσο, εμφανίζουν μικρή τάση κορεσμού στις περιπτώσεις εκείνες που πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ ατόμων του υπό μελέτη είδους και αυτών της παραομάδας (*L. capensis mediterraneus*, *L. corsicanus* και *L. granatensis*), όπου ο αριθμός των μεταστροφών παραμένει σταθερός ανεξάρτητα από την αύξηση της γενετικής απόστασης.



Εικόνα 3.2 Γράφημα ανάλυσης κορεσμού, όπου παρουσιάζεται η συχνότητα των μεταστροφών (μπλέ) και των μεταπτώσεων (ρόζ) ως προς τη γενετική απόσταση TrN93 (Tamura & Nei 1993).

Σε γενικές γραμμές, η ομοιότητα που παρατηρείται στον αριθμό και την κατανομή των μεταπτώσεων και των μεταστροφών και η παρουσία ισχυρής μεροληψίας της ελαφριάς αλυσίδας ως προς τη συχνότητα της γουανίνης είναι στοιχεία που υποδεικνύουν τη μιτοχονδριακή προέλευση του τμήματος αυτού.

3.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Οι γενετικές αποστάσεις που εκτιμήθηκαν τόσο εντός, όσο και μεταξύ των ομαδοποιήσεων των υπό μελέτη αλληλουχιών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.3**.

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών κυμαίνονται από 0,4% (διορθωμένη γενετική απόσταση: 0,2%) μεταξύ της Σάμου και της Μυτιλήνης έως 8,2% (διορθωμένη γενετική απόσταση: 7,8%), όπως αυτή παρατηρήθηκε μεταξύ της Χίου και της Ιταλίας. Υψηλές γενετικές αποστάσεις παρατηρούνται επίσης και μεταξύ περιοχών εντός της Ελλάδας, όπως αυτή της Σαμοθράκης με τη Λευκάδα (8,1% με διορθωμένη γενετική απόσταση: 7,9%), αλλά και μεταξύ της Σαμοθράκης και ατόμων από την ηπειρωτική Ελλάδα που ανήκουν στον «δυτικό» τύπο μιτοχονδριακού DNA (8% με διορθωμένη γενετική

Πίνακας 3.3 Οι εκτιμώμενες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των κύριων γεωγραφικών περιοχών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη, βάσει του μοντέλου των Tamura & Nei (κάτω τριγωνικός πίνακας) και οι διορθωμένες γενετικές αποστάσεις (net average nucleotide divergence, άνω τριγωνικός πίνακας) για τις αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου του mtDNA. Οι τιμές στη διαγώνιο αντιπροσωπεύουν την εντός των περιοχών διαφοροποίηση που παρατηρείται βάσει του ίδιου μοντέλου νουκλεοτιδικής αντικατάστασης. Οι έντονα τυπωμένοι αριθμοί αποτελούν τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές διαφοροποίησης που παρατηρήθηκαν μεταξύ και εντός των γεωγραφικών περιοχών.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 Δυτικός	0.016	0.053	0.011	0.011	0.026	0.010	0.019	0.016	0.018	0.018	0.057	0.057	0.065	0.072	0.054	0.048	0.048	0.002	0.013	0.015	0.015	0.035	0.115	0.134	0.156
2 Ανατολικός	0.064	0.006	0.056	0.058	0.061	0.060	0.063	0.050	0.050	0.053	0.013	0.017	0.024	0.025	0.016	0.030	0.006	0.053	0.050	0.055	0.050	0.063	0.101	0.173	0.165
3 Θάσος	0.020	0.059	-	0.026	0.033	0.029	0.033	0.025	0.031	0.030	0.061	0.060	0.059	0.075	0.058	0.051	0.053	0.016	0.030	0.034	0.032	0.049	0.124	0.138	0.168
4 Κεφαλονιά	0.020	0.062	0.027	0.003	0.021	0.008	0.024	0.017	0.022	0.021	0.062	0.061	0.071	0.074	0.060	0.056	0.053	0.013	0.016	0.015	0.012	0.021	0.110	0.135	0.176
5 Λευκάδα	0.037	0.067	0.035	0.025	0.005	0.029	0.032	0.025	0.030	0.029	0.065	0.066	0.075	0.079	0.063	0.054	0.056	0.030	0.034	0.036	0.036	0.023	0.125	0.148	0.171
6 Ζάκυνθος	0.018	0.063	0.029	0.009	0.031	-	0.025	0.022	0.022	0.020	0.066	0.065	0.075	0.080	0.062	0.059	0.055	0.012	0.014	0.017	0.013	0.028	0.122	0.143	0.171
7 Κωκιάδες	0.028	0.067	0.034	0.026	0.035	0.026	0.002	0.019	0.020	0.017	0.067	0.067	0.073	0.076	0.064	0.056	0.058	0.022	0.025	0.023	0.023	0.037	0.118	0.145	0.164
8 Πελοπόννησος	0.028	0.057	0.029	0.022	0.032	0.025	0.023	0.008	0.013	0.014	0.054	0.057	0.057	0.059	0.056	0.050	0.046	0.019	0.026	0.024	0.024	0.028	0.109	0.140	0.165
9 Κρήτη	0.028	0.055	0.033	0.025	0.034	0.024	0.023	0.019	0.004	0.003	0.055	0.055	0.063	0.069	0.051	0.050	0.046	0.020	0.022	0.024	0.022	0.038	0.112	0.134	0.152
10 Κρήθρα	0.028	0.058	0.032	0.024	0.033	0.022	0.020	0.020	0.007	0.004	0.058	0.058	0.067	0.072	0.055	0.048	0.049	0.019	0.024	0.025	0.025	0.041	0.117	0.129	0.153
11 Σάμος	0.066	0.021	0.061	0.062	0.064	0.068	0.066	0.069	0.069	0.061	0.001	0.002	0.028	0.029	0.021	0.029	0.008	0.055	0.056	0.059	0.057	0.061	0.116	0.170	0.174
12 Μυτιλήνη	0.066	0.021	0.061	0.063	0.070	0.066	0.069	0.062	0.057	0.060	0.004	0.002	0.034	0.034	0.020	0.035	0.007	0.054	0.055	0.059	0.056	0.068	0.111	0.170	0.174
13 Χίος	0.075	0.028	0.060	0.073	0.078	0.076	0.075	0.062	0.066	0.069	0.030	0.036	0.002	0.018	0.023	0.041	0.019	0.065	0.067	0.065	0.062	0.078	0.124	0.164	0.185
14 Σαμοθράκη	0.080	0.028	0.075	0.076	0.081	0.080	0.077	0.063	0.071	0.074	0.030	0.034	0.019	0.000	0.027	0.047	0.020	0.071	0.071	0.067	0.065	0.075	0.127	0.170	0.180
15 Ρόδος	0.067	0.023	0.062	0.065	0.069	0.066	0.068	0.063	0.057	0.060	0.025	0.025	0.029	0.031	0.008	0.039	0.007	0.051	0.057	0.058	0.056	0.072	0.107	0.157	0.184
16 Κύπρος	0.058	0.035	0.053	0.059	0.058	0.060	0.059	0.056	0.053	0.052	0.031	0.037	0.044	0.048	0.045	0.003	0.028	0.048	0.045	0.048	0.043	0.062	0.105	0.160	0.161
17 Β.Τερρανή	0.056	0.009	0.053	0.055	0.058	0.055	0.059	0.050	0.048	0.051	0.009	0.008	0.021	0.020	0.011	0.030	-	0.045	0.045	0.048	0.043	0.062	0.110	0.128	0.147
18 Βουλγαρία	0.019	0.065	0.025	0.023	0.041	0.021	0.032	0.032	0.031	0.030	0.064	0.064	0.075	0.080	0.064	0.059	0.054	0.018	0.012	0.005	0.016	0.040	0.110	0.128	0.147
19 Σερβία	0.027	0.059	0.036	0.023	0.043	0.021	0.032	0.036	0.030	0.032	0.063	0.062	0.074	0.077	0.067	0.068	0.051	0.031	0.012	0.005	0.003	0.042	0.118	0.145	0.162
20 Γερμανία	0.025	0.059	0.035	0.017	0.040	0.018	0.025	0.029	0.027	0.028	0.061	0.061	0.067	0.068	0.063	0.062	0.049	0.027	0.012	0.002	0.003	0.036	0.115	0.160	0.170
21 Αυστρία	0.032	0.062	0.041	0.022	0.047	0.022	0.032	0.037	0.033	0.035	0.067	0.066	0.071	0.074	0.069	0.071	0.052	0.034	0.018	0.007	0.018	0.035	0.104	0.152	0.162
22 Ιταλία	0.046	0.069	0.052	0.026	0.029	0.031	0.042	0.035	0.043	0.046	0.065	0.073	0.082	0.078	0.080	0.068	0.065	0.052	0.051	0.040	0.048	0.007	0.128	0.160	0.177
23 Lca	0.123	0.104	0.124	0.111	0.128	0.122	0.118	0.113	0.114	0.119	0.117	0.112	0.125	0.127	0.111	0.131	0.105	0.119	0.124	0.116	0.112	0.131	-	0.150	0.169
24 Lco	0.142	0.176	0.138	0.137	0.151	0.143	0.146	0.144	0.136	0.131	0.171	0.171	0.165	0.170	0.161	0.160	0.160	0.137	0.151	0.162	0.161	0.163	0.150	-	0.183
25 Lgr	0.164	0.168	0.168	0.177	0.173	0.171	0.165	0.168	0.154	0.155	0.168	0.175	0.186	0.180	0.188	0.171	0.161	0.156	0.168	0.171	0.171	0.180	0.169	0.183	-

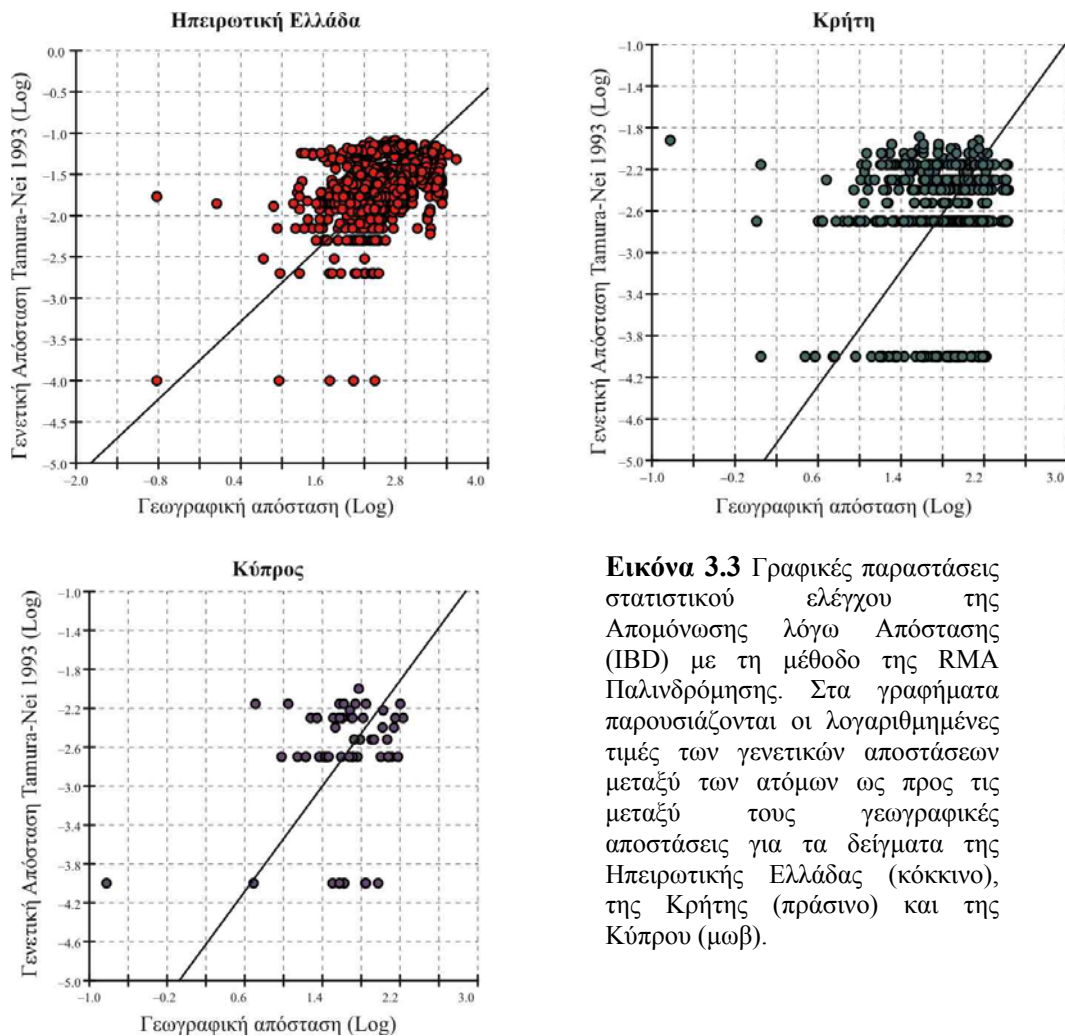
απόσταση: 7,2%). Ως προς τις διορθωμένες γενετικές αποστάσεις που εκτιμήθηκαν μεταξύ των ομαδοποιήσεων, η μικρότερη ήταν και πάλι η γενετική απόσταση μεταξύ των ομαδοποιήσεων της Σάμου με τη Μυτιλήνη όπως επίσης και μεταξύ της Βουλγαρίας και των ατόμων του δυτικού τύπου που κατανέμονται στην ηπειρωτική Ελλάδα (0,2%), ενώ η μεγαλύτερη μεταξύ της Ζακύνθου και της Σαμοθράκης (8%). Όσον αφορά τη διαφοροποίηση που παρατηρείται εντός των γεωγραφικών περιοχών, κυμαίνεται από 0% στο νησί της Σαμοθράκης έως 1,8% στην Βουλγαρία και την Αυστρία, ενώ φτάνει το 1,6% στα άτομα του «δυτικού» τύπου που κατανέμονται στην ηπειρωτική Ελλάδα. Οι γενετικές αποστάσεις των αλληλουχιών του είδους *L. europaeus* από τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδα *L. capensis mediterraneus* (Lme2), *L. corsicanus* (Lco5) και *L. granatensis* (Lgr1) είναι 11,9%, 14,9% και 16,6% αντιστοίχως. Η ενδοειδική διαφοροποίηση (όπως αυτή προκύπτει από το σύνολο των υπό μελέτη αλληλουχιών του είδους *L. europaeus*) φτάνει το 4%. Η διαφοροποίηση του είδους στην Ελλάδα φτάνει το 3,8% και στην Κύπρο το 0,3%. Τέλος, η διαφοροποίηση που παρατηρείται εντός του Δυτικού κλάδου ισούται με 2,4%, εντός του ανατολικού με 2,7%, ενώ η μέση γενετική απόσταση του ανατολικού από τον δυτικό κλάδο είναι 6,2%.

3.3 Απομόνωση λόγω απόστασης (Isolation by distance)

Σύμφωνα με τον στατιστικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στα άτομα της ηπειρωτικής Ελλάδας δεν παρατηρείται σημαντική συσχέτιση μεταξύ των γενετικών και των γεωγραφικών αποστάσεων ($Z=22.023,3754$, $r=0,2128$, $p=0,9820$). Αντίστοιχες τιμές παρατηρούνται και όταν πραγματοποιείται λογαρίθμηση των τιμών του ενός από τους δύο πίνακες ή και των δύο, γεγονός ενδεικτικό της μη συσχέτισης της παρατηρούμενης γενετικής απομόνωσης με τη γεωγραφική απόσταση των υπό μελέτη ατόμων.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης, τόσο για τα άτομα της Κρήτης, όσο και για τα άτομα της Κύπρου, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση των γενετικών με τις γεωγραφικές αποστάσεις ($Z=158,0392$, $r=0,0137$, $p=0,5450$ και $Z=12,6689$, $r=0,1054$, $p=0,7200$, αντίστοιχα) κάτι που ισχύει και μετά τη λογαρίθμηση (του ενός εκ των δύο ή και των δύο) των τιμών αυτών, αδυνατώντας να υποστηρίξουν ότι το παρατηρούμενο προτύπο απομόνωσης οφείλεται στην μεταξύ των ατόμων γεωγραφική απόσταση.

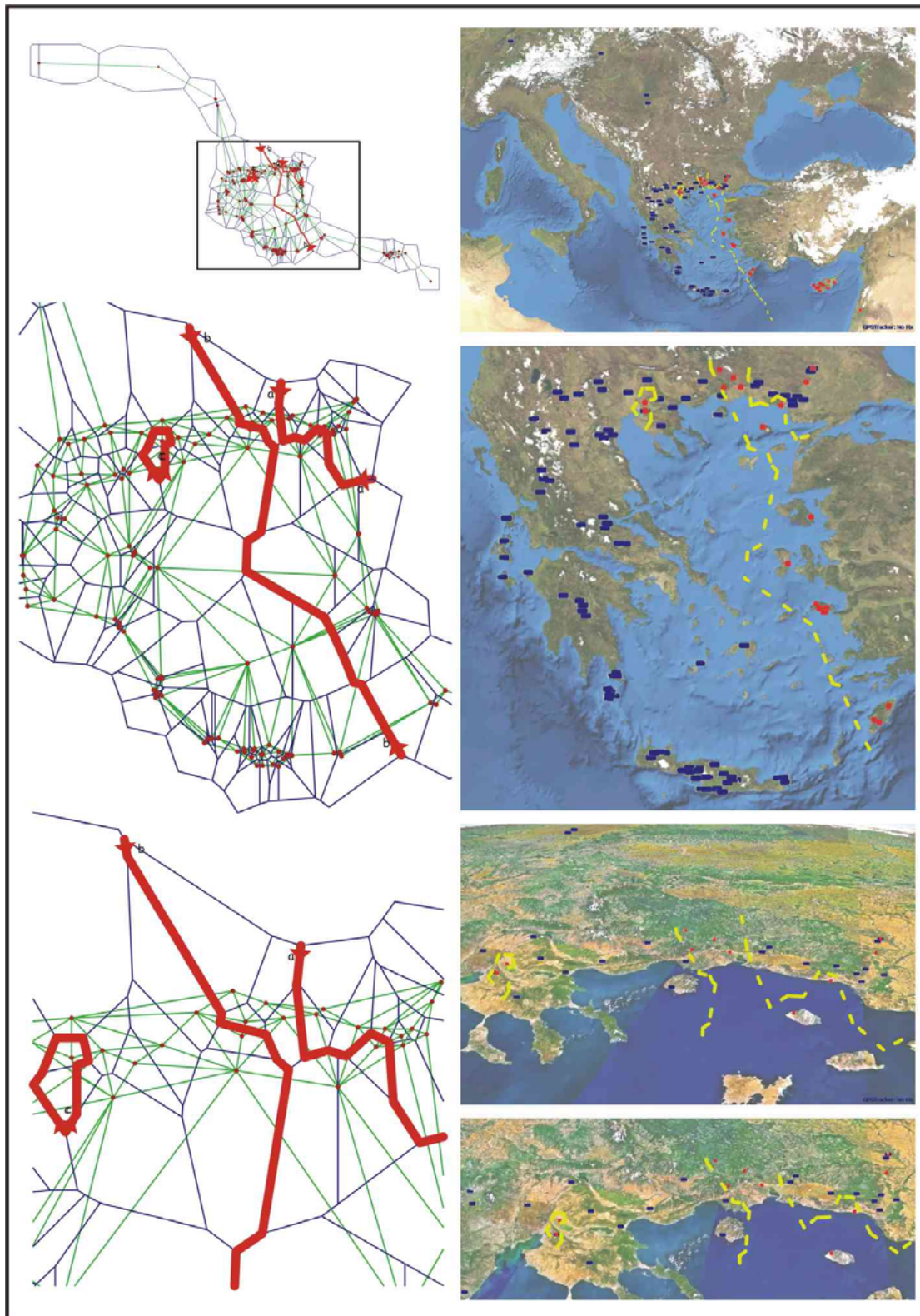
Οι γραφικές παραστάσεις της RMA παλινδρόμησης, βάσει των λογαριθμημένων τιμών των γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων των τριών ελέγχων που πραγματοποιήθηκαν, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.3**.



Εικόνα 3.3 Γραφικές παραστάσεις στατιστικού ελέγχου της Απομόνωσης λόγω Απόστασης (IBD) με τη μέθοδο της RMA Παλινδρόμησης. Στα γραφήματα παρουσιάζονται οι λογαριθμημένες τιμές των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων ως προς τις μεταξύ τους γεωγραφικές αποστάσεις για τα δείγματα της Ηπειρωτικής Ελλάδας (κόκκινο), της Κρήτης (πράσινο) και της Κύπρου (μπλε).

3.4 Γεωγραφικά πρότυπα γενετικής διαφοροποίησης (Barriers)

Κάθε γενετικό φράγμα εντοπίζει και τονίζει εκείνες τις γεωγραφικές περιοχές στις οποίες παρατηρείται μια ασυνέχεια, δηλαδή περιοχές στις οποίες οι πληθυσμοί (ή δειγματοληπτικές μονάδες) που βρίσκονται στην μια πλευρά αυτής είναι πιο όμοιοι από αυτούς της άλλης πλευράς. Ως συνέπεια αυτού, κάθε φράγμα αναμένεται να διασχίζει κάθετα τις πλευρές της τριγωνοποίησης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τις υψηλότερες τιμές του πίνακα των γενετικών αποστάσεων και αντιστοιχούν σε γειτονικές δειγματοληπτικές μονάδες (Manni & Guerard 2004). Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση ενός μεγάλου αριθμού φραγμάτων, από τα οποία παρουσιάζονται μόνο εκείνα που σχετίζονται με τις μεγαλύτερες τιμές γενετικών αποστάσεων. Αναλυτικότερα στην ομάδα των δεδομένων, που περιλαμβάνει το σύνολο των υπό μελέτη ατόμων, παρουσιάζονται τα τρία πρώτα γενετικά φράγματα όπως αυτά ανιχνεύτηκαν με σειρά ιεραρχίας (**Εικόνα 3.4**).



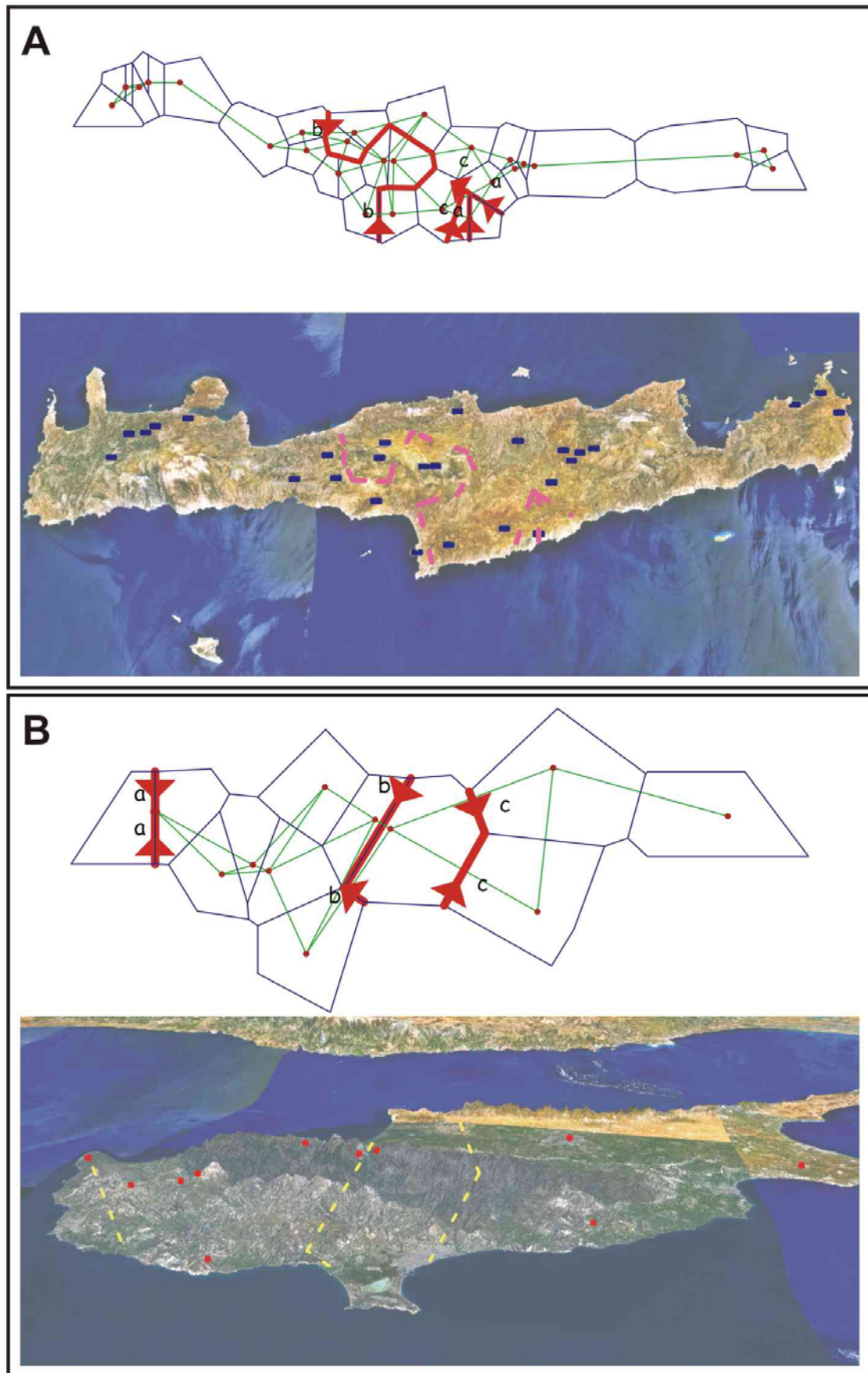
Εικόνα 3.4 Ανάλυση των γεωγραφικών προτύπων γενετικής διαφοροποίησης για το σύνολο των δεδομένων βάσει του προγράμματος Bapier. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όπως αυτά παράχθηκαν από το πρόγραμμα όπου με μπλε γραμμές αποτυπώνεται το μωσαϊκό Voronoi, ενώ με πράσινες η τριγωνοποίηση Delaunay. Οι κόκκινες κουκίδες αποτελούν τις δειγματοληπτικές περιοχές των ατόμων που αναλύθηκαν. Τα γενετικά φράγματα που ανιχνεύθηκαν εφάπτονται των πλευρών των πολυγώνων του μωσαϊκού Voronoi και παρουσιάζονται με κόκκινες

γραμμές στις άκρες των οποίων υπάρχουν βέλη. Τα γράμματα πάνω στο κάθε ένα από αυτά αντιστοιχούν στην ιεραρχία με την οποία εκτιμήθηκαν, ξεκινώντας από αυτό που εμπεριέχει τις μεγαλύτερες μεταβολές γενετικών αποστάσεων (α). Στη δεξιά στήλη παρουσιάζονται οι αντίστοιχες γεωγραφικές θέσεις των ατόμων (με μπλε χρώμα ο «δυτικός» τύπος και με κόκκινο χρώμα ο «ανατολικός» τύπος) και των γενετικών φραγμάτων (κίτρινες γραμμές), όπως αυτές προκύπτουν από την προβολή τους πάνω σε τρισδιάστατο χάρτη που δημιουργήθηκε από την ανάλυση δορυφορικών φωτογραφιών με τη βοήθεια του προγράμματος NASA World Wind. Εξαιτίας του τρισδιάστατου χάρτη οι θέσεις, τόσο των δειγματοληπτικών σημείων όσο και των γενετικών φραγμάτων παρουσιάζονται υπό την οπτική γωνία βάσει της οποίας δημιουργήθηκε η εικόνα.

Το πρώτο στην ιεραρχία φράγμα εντοπίζεται στην περιοχή, όπου οι δύο αυτοί τύποι mtDNA συνυπάρχουν (Β. Α. Ελλάδα διαμέρισμα Θράκης). Το δεύτερο φράγμα παρουσιάζεται στο όριο κατανομής του «ανατολικού» με τον «δυτικό» τύπο mtDNA (από τη Θράκη έως το Ισραήλ). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα δύο αυτά φράγματα ορίζουν περιοχή εντός της οποίας υπάρχουν μόνο άτομα «ανατολικού» τύπου, ενώ τα άτομα που βρίσκονται εκτός αυτής χαρακτηρίζονται από «δυτικού» τύπου mtDNA. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει τη σημαντικότητα της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε, αφού βάσει αυτής κατέστη δυνατός ο εντοπισμός του χωροταξικού προτύπου συνύπαρξης των δύο τύπων Ευρωπαϊκού λαού στην περιοχή. Το τρίτο φράγμα διαχωρίζει μια μικρή ομάδα ατόμων «ανατολικού» τύπου και εντοπίζεται στον νομό Θεσσαλονίκης. Τέλος, τα επόμενα στην ιεραρχία γενετικά φράγματα, ανιχνεύθηκαν στα σύνορα της Ελλάδας με την Ευρωπαϊκή Τουρκία όπου και παρατηρούνται άτομα «ανατολικού» τύπου mtDNA.

Τα τρία πρώτα φράγματα για την περιοχή της Κρήτης και της Κύπρου παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.5A** και **B** αντίστοιχα. Τα γενετικά φράγματα που παρουσιάζονται σε κατώτερο ιεραρχικό επίπεδο στο σύνολο των αναλύσεων, δημιουργούνται από μικρότερες μεταβολές της παραμέτρου (γενετικές αποστάσεις TrN) με αποτέλεσμα να μην χαρακτηρίζονται από τον ίδιο βαθμό σημαντικότητας.

Τα γενετικά φράγματα στο σύνολό τους φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με το ανάγλυφο της έκτασης στην οποία παρατηρούνται. Στην περιοχή συνύπαρξης των δύο μορφών mtDNA (Θράκη και Μακεδονία), τα άτομα του «ανατολικού» τύπου καταλαμβάνουν περιοχές χαμηλότερου υψομέτρου και ομαλότερης κλίσης από αυτές που καταλαμβάνουν τα άτομα του «δυτικού» τύπου. Αντίστοιχα, τα γενετικά φράγματα της Κρήτης και της Κύπρου παρατηρούνται σε περιοχές με μεγάλη κλίση και άγριο ανάγλυφο (πλαγιές του Ψηλορείτη και των Αστερουσίων για την Κρήτη και πλαγιές της οροσειράς του Τρόodos για την Κύπρο), υποδεικνύοντας τη δράση των ορεινών όγκων ως εμπόδια στη μετακίνηση των λαγών, επιτρέποντας πιθανά μόνο μικρού βαθμού γονιδιακή ροή μεταξύ αυτών.



Εικόνα 3.5 Ανάλυση των γεωγραφικών προτύπων γενετικής διαφοροποίησης στα άτομα της Κρήτης (A) και της Κύπρου (B) βάσει του προγράμματος Barrier. Στο άνω τμήμα κάθε πλαισίου,

παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όπως αυτά παράχθηκαν από το πρόγραμμα, όπου με μπλε γραμμές αποτυπώνεται το μωσαϊκό Voronoi, ενώ με πράσινες η τριγωνοποίηση Delaunay. Οι κόκκινες κουκίδες αποτελούν τις δειγματοληπτικές περιοχές των ατόμων που αναλύθηκαν. Τα γενετικά φράγματα που ανιχνεύθηκαν εφάπτονται των πλευρών των πολυγώνων του μωσαϊκού Voronoi και παρουσιάζονται με κόκκινες γραμμές στις άκρες των οποίων υπάρχουν βέλη. Τα γράμματα πάνω στο κάθε ένα από αυτά αντιστοιχούν στην ιεραρχία με την οποία εκτιμήθηκαν, ξεκινώντας από αυτό που εμπεριέχει τις μεγαλύτερες μεταβολές γενετικών αποστάσεων (α). Στο κάτω τμήμα κάθε πλαισίου παρουσιάζονται οι αντίστοιχες γεωγραφικές θέσεις των ατόμων και των γενετικών φραγμάτων (ροζ γραμμές για την Κρήτη και κίτρινες για την Κύπρο), όπως αυτές προκύπτουν από την προβολή τους πάνω σε τρισδιάστατο χάρτη που δημιουργήθηκε από την ανάλυση δορυφορικών φωτογραφιών με τη βοήθεια του προγράμματος NASA World Wind. Εξαιτίας του τρισδιάστατου χάρτη οι θέσεις τόσο των δειγματοληπτικών σημείων, όσο και των γενετικών φραγμάτων, παρουσιάζονται υπό την οπτική γωνία βάσει της οποίας δημιουργήθηκε η εικόνα.

3.5 Φυλογενετικές αναλύσεις

Συνολικά ευθυγραμμίστηκαν 479 νουλεοτιδικές θέσεις 146 αλληλουχιών (143 του είδους *L. europaeus* και 3 ειδών που χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδες). Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις αλληλουχίες του υπό μελέτη είδους, παρατηρήθηκαν 116 (24,2%) πολυμορφικές θέσεις, 76 εκ των οποίων (15,87%) είναι πληροφοριακές σύμφωνα με το κριτήριο της φειδωλότητας. Οι αντίστοιχες τιμές όταν συμπεριληφθούν και τα άτομα της παραομάδας είναι 142 (29,64%) και 87 (18,16%).

Το φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε από την ανάλυση της Σύνδεσης-Γειτόνων (ΣΓ), βάσει του μοντέλου TrN, παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.6**.

Η μη σταθμισμένη (un-weighted), όσον αφορά τους χαρακτήρες, ανάλυση μέγιστης φειδωλότητας (Maximum Parsimony, ΜΦ) των 87 πληροφοριακών θέσεων (76 για την ενδοομάδα) έδωσε περισσότερα από 300 εξίσου φειδωλά δέντρα, το μήκος των οποίων ισούται με 317 εξελικτικά βήματα (δείκτης ομοπλασίας, HI=0,454). Η τοπολογία του δέντρου της ΜΦ είναι παρόμοια με αυτή που προέκυψε από τη μέθοδο ΣΓ, όσον αφορά τους κύριους κλάδους και υποκλάδους του δέντρου. Η μόνη διαφορά παρατηρείται στον υποκλάδο που περιλαμβάνει τα άτομα της Σάμου και της Μυτιλήνης, όπου στην ανάλυση της μέγιστης φειδωλότητας η Μυτιλήνη συνιστά μια μονοφυλετική ομάδα (τιμή bootstrap 52%), ενώ στη ΣΓ όχι (**Εικόνα 3.6**).

Η ορθότητα των δενδρογραμμάτων που παράγει η μέθοδος της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ΜΠ) και της Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ) εξαρτάται από την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου νουκλεοτιδικής αντικατάστασης. Συνεπώς, το πρώτο βήμα στις αναλύσεις της ΜΠ και της ΜΣ είναι η επιλογή του καταλληλότερου, βάσει των δεδομένων, μοντέλου αντικατάστασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης στο Modeltest, το μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης που

ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα μας είναι το HKY85 (Hasegawa, Kishino, Yano 1985) ($-\ln L=2517,34$) με ποσοστό αμετάβλητων νουκλεοτιδικών θέσεων $I=0,47$ και παράμετρο γάμμα για τις μεταβλητές θέσεις $\alpha=0,7709$ (HKY85+I+G). Οι συχνότητες των νουκλεοτιδίων για τις μεταβλητές θέσεις είναι $A=0,3204$, $C=0,2946$, $G=0,1060$ και $T=0,2791$ και ο λόγος των μεταπτώσεων προς τις μεταστροφές ισούται με $5,1093$.

Η ανάλυση της Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ) οδήγησε σε ίδιας τοπολογίας φυλογενετικά δένδρα και στις 4 ανεξάρτητες εφαρμογές, ενώ ελάχιστοι ήταν οι κόμβοι εκείνοι που παρουσίασαν μικρές διαφορές στις τιμές των εκ των υστέρων πιθανοτήτων στις δύο ανεξάρτητες εφαρμογές του προγράμματος που πραγματοποιήθηκαν. Στην **Εικόνα 3.7** απεικονίζεται το συναινετικό δέντρο (50% majority rule tree) από τα $8,9 \cdot 10^4$ δένδρα που απέμειναν μετά την απόρριψη των πρώτων 11.000 δέντρων, που αποτελεί το διάστημα που χρειάστηκε μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή της πιθανοφάνειας ($-\ln L$) (burn-in). Η μέση τιμή των $\ln L$ των δέντρων αυτών ισούται με $-2781,669$.

Οι παράμετροι που προαναφέρθηκαν παραπάνω ενσωματώθηκαν στο πρόγραμμα PAUP* για την εκπόνηση της ανάλυσης της ΜΠ. Η αναζήτηση του δένδρου με τη μεγαλύτερη πιθανότητα πραγματοποιήθηκε με την ευρετική μέθοδο αναζήτησης και τη χρήση του αλγορίθμου αναδιάταξης κλάδων tree bisection and reconnection (TBR). Το δέντρο με τη μεγαλύτερη πιθανοφάνεια είχε τιμή $-\ln L=2228,67$. Εξαιτίας της έντονα χρονοβόρας, ως προς την υπολογιστική της διεκπεραίωση, μεθόδου της ΜΠ, η αξιοπιστία των κλάδων μέσω της δοκιμασίας bootstrap, ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί δεδομένης της ταχύτητας του αλγορίθμου που χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα. Για το λόγο αυτό, η ανάλυση της ΜΠ πραγματοποιήθηκε και με το πρόγραμμα RAxML (Stamatakis 2006, <http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/>), το οποίο χρησιμοποιεί ένα «υψηλής ταχύτητας» αλγόριθμο ΜΠ. Με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατή η πραγματοποίηση μιας σχετικά διεξοδικής ανάλυσης για την εύρεση του φυλογενετικού δένδρου με την μέγιστη δυνατή πιθανότητα και η εκτίμηση της αξιοπιστίας των κόμβων του με την διεξαγωγή 100 επαναλήψεων bootstrap, σε πραγματικό χρόνο. Το μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης που χρησιμοποιείται από το RAxML είναι το GTR το οποίο αποτελεί το πολυπλοκότερο μοντέλο, που σαφώς περιλαμβάνει και το HKY85. Το σύνολο των ελεύθερων παραμέτρων του μοντέλου αυτού (ρυθμός ετερογένειας, παράμετρος α και οι 4 διακριτές κατηγορίες ρυθμών αντικατάστασης) εκτιμήθηκαν από το πρόγραμμα και επομένως δεν ορίστηκαν από τον χρήστη, γεγονός που θα περιόριζε τον χώρο αναζήτησης για το «καλύτερο» δένδρο. Σύμφωνα με τις απαιτήσεις του προγράμματος είναι δυνατή η ανάλυση μόνο των διαφορετικών απλοτύπων (γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα μικρές διαφορές στην εκτίμηση των συχνοτήτων των νουκλεοτιδικών βάσεων σε σχέση με αυτές που εκτιμήθηκαν από το σύνολο των αλληλουχιών). Οι τιμές των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.4**. Το φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε έχει παρόμοια τοπολογία με αυτή του

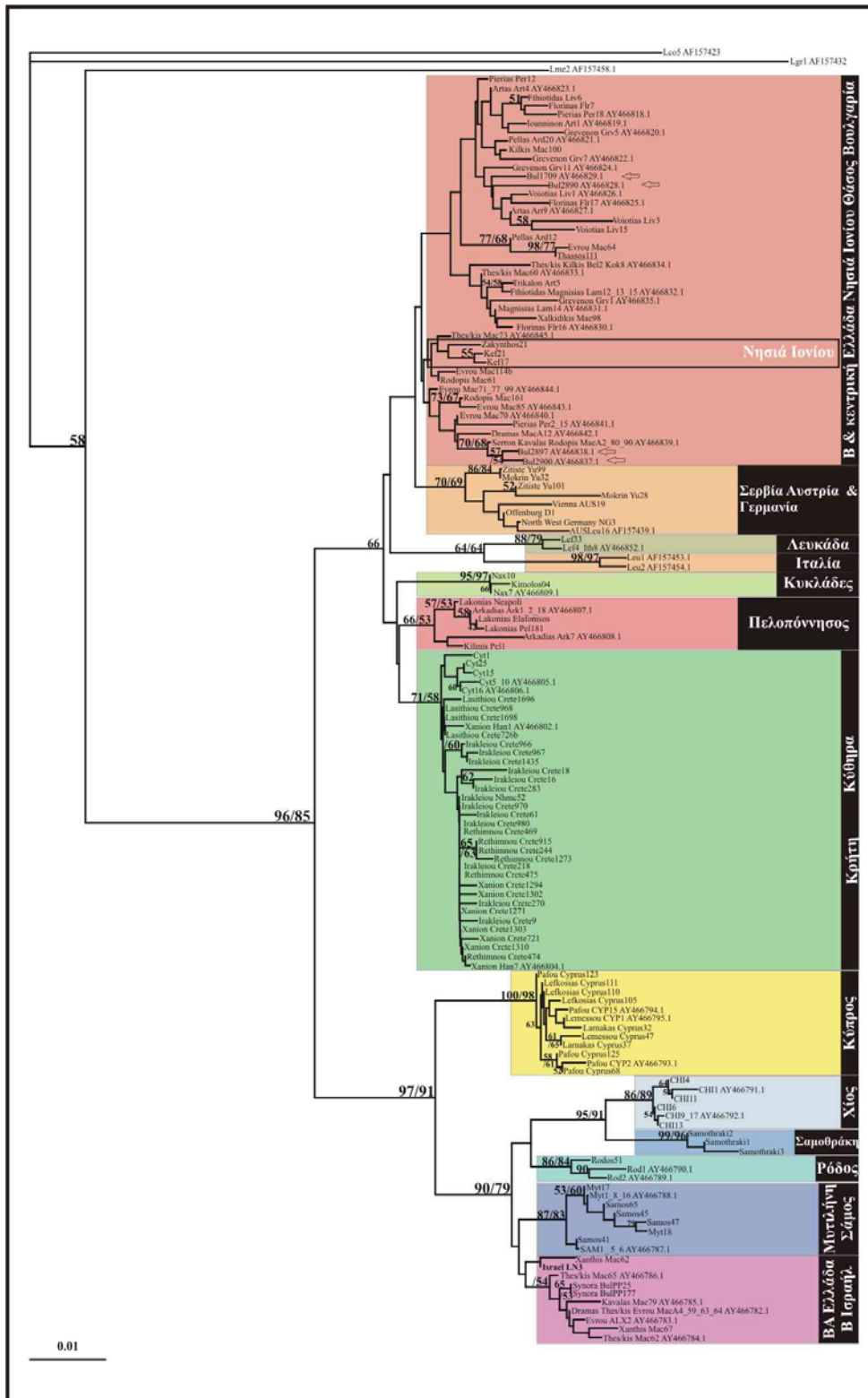
δένδρου που προέκυψε βάσει της μεθόδου ΜΣ και για αυτό κρίθηκε σκόπιμο να παρουσιαστούν μόνο οι τιμές στατιστικής υποστήριξης των κόμβων του παράλληλα με το δένδρο της ΜΣ στην **Εικόνα 3.7**.

Πίνακας 3.4 Παράμετροι που εκτιμήθηκαν στα πλαίσια της ανάλυσης Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ΜΠ) βάσει του προγράμματος RAxML

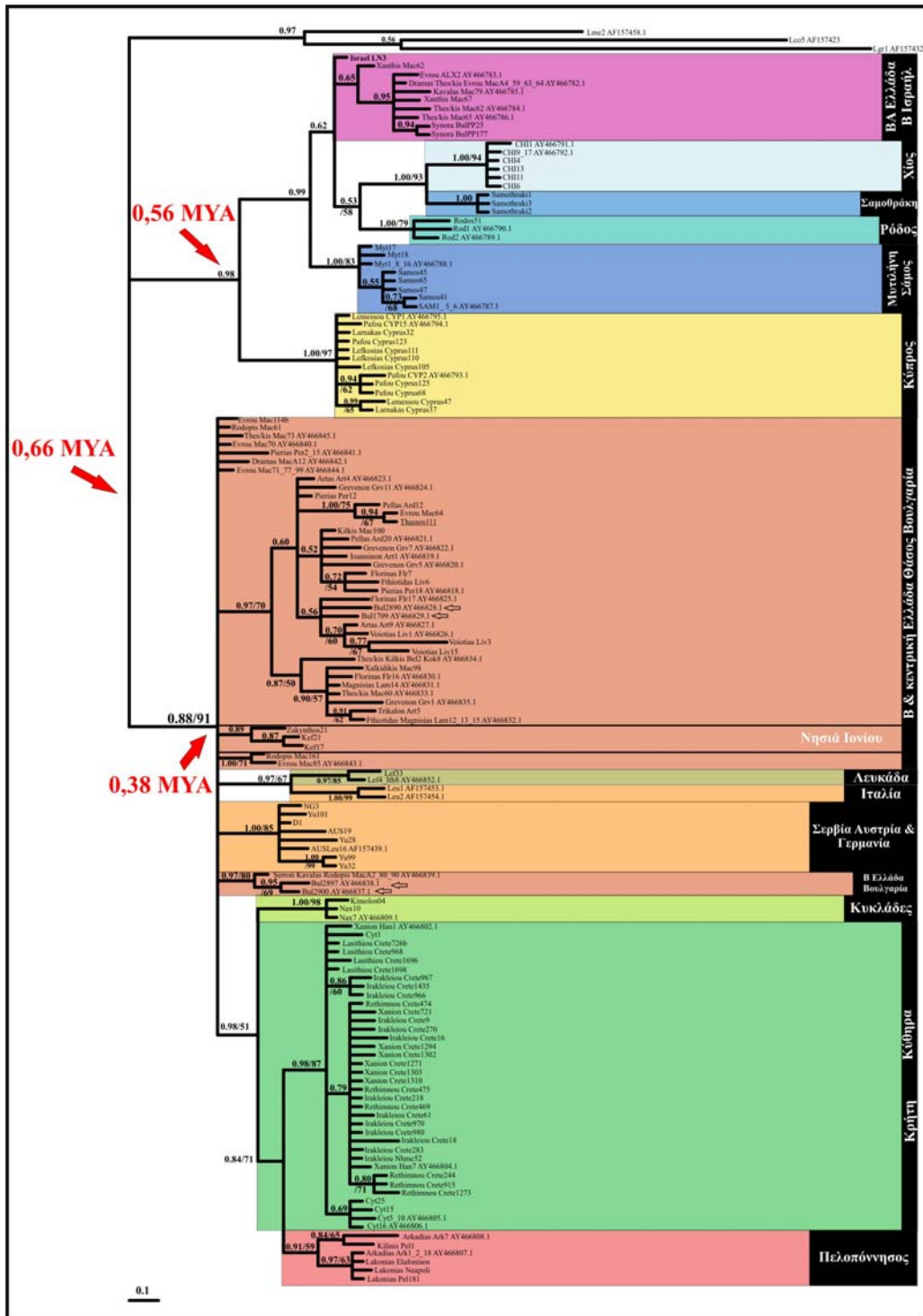
Συχνότητες νουκλεοτιδικών βάσεων	Εκτιμήσεις παραμέτρων του μοντέλου
p(A): 0,297881	alpha: 0,462470
p(C): 0,300335	invar: 0,352373
p(G): 0,104041	Tree-Length: 0,509030
p(T): 0,297743	rate a<->c: 2,241633
	rate a<->g: 26,138399
	rate a<->t: 1,581125
ML Optimization Likelihood: -2224,120214	rate c<->g: 0,000017
	rate c<->t: 16,299783
	rate g<->t: 1,000000

3.6 Περιγραφή της τοπολογίας των φυλογενετικών δένδρων

Όλες οι φυλογενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν συγκλίνουν σε μια κοινή τοπολογία με κύριο χαρακτηριστικό την ισχυρή μονοφυλετικότητα των υπό μελέτη δειγμάτων του είδους [τιμή bootstrap (b.s.) 85-96%, και τιμή posterior probability (p.p.) 0,88] και τη σαφή διάκριση δύο κύριων κλάδων. Ο ένας από αυτούς συμπίπτει με τον «ανατολικό» κλάδο των Kasapidis *et al.* (2005) και αποτελείται από άτομα που κατανέμονται στα νησιά του ανατολικού Αιγαίου, την Κύπρο, σε περιοχές της βορειο-ανατολικής Ελλάδας (Θράκη και Μακεδονία) και το Ισραήλ (b.s. 91-97%, p.p. 0,98). Ο δεύτερος κλάδος αποτελείται από τα άτομα της υπόλοιπης Ελλάδας και της Ευρώπης συμπίπτοντας με τον «δυτικό τύπο» των Kasapidis *et al.* (2005) (b.s. 66-91%, p.p.0,88). Εντός του «δυτικού κλάδου» παρατηρείται ξεκάθαρος διαχωρισμός μεταξύ γεωγραφικά απομακρυσμένων και/ή απομονωμένων ομάδων ατόμων, όπως αυτών της κεντρικής (Γερμανία, Αυστρία) και νοτιοανατολικής (Σερβία) Ευρώπης, των Κυκλάδων, της Πελοποννήσου και της ομάδας που αποτελείται από τα άτομα της Κρήτης και των Κυθήρων (**Εικόνες 3.6** και **3.7**). Δύο από τα τέσσερα άτομα της Βουλγαρίας σχετίζονται με τα γεωγραφικά εγγύτερα άτομα της βορειοανατολικής Ελλάδας (Σέρρες, Καβάλα, Ροδόπη) με υψηλή στατιστική υποστήριξη (b.s. 68-80%, p.p. 0,97), ενώ τα άλλα δύο με μεγάλο βαθμό αβεβαιότητας (b.s.< 50%, p.p. 0,56) με άτομα της βορειοδυτικής (Γρεβενά, Φλώρινα, Άρτα) και κεντρικής (Βοιωτία) Ελλάδας.



Εικόνα 3.6 Φυλογενετικό δένδρο Σύνδεσης Γειτόνων (ΣΓ). Η τοπολογία του είναι παρόμοια με αυτή του φυλογενετικού δένδρου της Μέγιστης Φειδωλότητας (ΜΦ). Οι αριθμοί επάνω στους κόμβους αντιστοιχούν στην στατιστική υποστήριξη αυτών (%) μετά από 1000 ψευδοεπαναλήψεις βάσει των NJ/MP μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν. Παρουσιάζονται μόνο οι τιμές εκείνες που είναι >50%.



Εικόνα 3.7 Φυλογενετικό δένδρο Μπεύζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ). Η τοπολογία του είναι παρόμοια με το δένδρο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ΜΠ). Οι αριθμοί επάνω στους κλάδους αντιστοιχούν στις εκ των υστέρων πιθανότητες της ΜΣ και στις τιμές στατιστικής υποστήριξης (bootstrap, 100 ψευδοεπαναλήψεις) της ΜΠ αντίστοιχα (ΜΣ/ΜΠ). Μόνο τιμές μεγαλύτερες από 0.5 και 50% αντίστοιχα παρουσιάζονται. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τους χρόνους (εκ. χρόνια πριν από σήμερα, ΜΥΑ) των αντίστοιχων γενεαλογικών γραμμών, όπως αυτοί εκτιμήθηκαν με το πρόγραμμα r8s.

Τα άτομα της Κρήτης και των Κυθίων συνιστούν μια μονοφυλετική ομάδα (b.s. 58-87%, p.p. 0,98), η οποία συνδέεται με άτομα της Πελοποννήσου (σχέση που υποστηρίζεται σημαντικά μόνο βάσει των μεθόδων ΜΠ και ΜΣ), ενώ εξωτερικό κλάδο αυτών αποτελούν τα άτομα των Κυκλάδων (σχέση η οποία και πάλι υποστηρίζεται σημαντικά μόνο βάσει των μεθόδων ΜΠ και ΜΣ). Αξίζει να σημειωθεί η απόλυτη συμφωνία όλων των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση των ατόμων της Λευκάδας (b.s. 79-88%, p.p.0,97) με άτομα αυτόχθονων λαών της Ιταλίας (b.s. 97-99%, p.p.1,00) με μέτρια στατιστική υποστήριξη (b.s. 64-67%), αλλά υψηλή τιμή της εκ των υστέρων πιθανότητας (p.p. 0,97).

Όσον αφορά στον «ανατολικό» κλάδο, οι ομαδοποιήσεις που παρουσιάζονται αντικατοπτρίζουν σε μεγάλο βαθμό τη γεωγραφική προέλευση των ατόμων σε επίπεδο νησιού. Τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου ομαδοποιούνται με άτομα «ανατολικού τύπου» της Βορειοανατολικής Ελλάδας (b.s. 79-90%, p.p. 0,99), ενώ η Κύπρος εμφανίζεται ως παραομάδα αυτών (b.s. 91-97%, p.p. 0,98). Εντός των κλάδων που περιλαμβάνουν τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου, είναι εμφανής η εξελικτική συγγένεια της Χίου με τη Σαμοθράκη (b.s. 91-95%, p.p. 1,00). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η μοναδική διαθέσιμη αλληλουχία ενός ατόμου από το βόρειο Ισραήλ εντοπίζεται στον κλάδο που περιλαμβάνει άτομα από τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου και τη Βόρειο-ανατολική Ελλάδα.

Εστιάζοντας στα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από τις επιμέρους μεθοδολογίες, θα γίνει προσπάθεια περιληπτικής περιγραφής των κύριων διαφορών που παρατηρήθηκαν μεταξύ αυτών. Τα φυλογενετικά δένδρα που παρήχθησαν με τις μεθόδους ΣΓ και ΜΦ είναι παρόμοια. Μοναδική μεταξύ τους διαφορά αποτελεί η ομαδοποίηση κάποιων ακραίων κλάδων με χαμηλή ωστόσο στατιστική υποστήριξη. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με το δένδρο της ΜΦ τα άτομα της Μυτιλήνης ομαδοποιούνται με οριακή στατιστική υποστήριξη (52%) με τα άτομα της Σάμου, γεγονός που δεν παρατηρείται στο φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε με τη μέθοδο της ΣΓ. Η στατιστική υποστήριξη του «ανατολικού κλάδου» είναι υψηλότερη σύμφωνα με το δένδρο της ΣΓ. Αντιθέτως, η μονοφυλετικότητα του «δυτικού» κλάδου δεν υποστηρίζεται σημαντικά βάσει των αντίστοιχων τιμών του δένδρου ΜΦ.

Το φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε από την ανάλυση ΜΠ παρέχει υψηλότερη στατιστική υποστήριξη στον «δυτικό» τύπο από ότι στον «ανατολικό», σε αντίθεση με όλες τις υπόλοιπες μεθόδους, αφού ο «ανατολικός τύπος» δεν εμφανίζεται ως ένας κλάδος αλλά διαχωρίζεται άμεσα στους υποκλάδους, όπως αυτοί προκύπτουν και από τις δύο προηγούμενες μεθοδολογίες.

Τέλος, στο φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της ΜΣ, η υποστήριξη και των δύο κλάδων του είδους είναι υψηλή, ενώ παράλληλα προσδιορίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια οι σχέσεις που διέπουν τις ομαδοποιήσεις εντός του «δυτικού» κλάδου. Αναλυτικότερα για τον «δυτικό» κλάδο παρουσιάζεται για πρώτη φορά

ισχυρά υποστηριζόμενη η ομαδοποίηση των νησιών του Ιονίου (p.p. 0,89), καθώς και αυτή των πληθυσμών της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Θάσου και της Βουλγαρίας. Τέλος, οι πληθυσμοί της Κρήτης και των Κυθίων αποτελούν αδελφή ομάδα με αυτούς της Πελοποννήσου (p.p. 0,84), όπως αυτό παρατηρήθηκε και στην ανάλυση της ΜΠ, ενώ ο κλάδος που ενώνει την ομαδοποίηση αυτή με πληθυσμούς των Κυκλάδων εμφανίζεται για πρώτη φορά με τόσο υψηλή υποστήριξη (p.p. 0,98).

3.7 Έλεγχος ομοιογένειας εξελικτικού ρυθμού

Η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών απορρίπτει τη μηδενική υπόθεση της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού στο φυλογενετικό δέντρο ΜΠ που παράγεται από το σύνολο των υπό μελέτη αλληλουχιών (εξαιρώντας την παραομάδα) της περιοχής ελέγχου του mtDNA, αφού η τιμή του LRT είναι:

$$\Delta=2*[-\ln L_{\text{CLOCK}}-(-\ln L_{\text{UNCONSTRAINED}})]=2*[2440,37-(2228,253)]= 424,24$$

και δεδομένου ότι ο αριθμός των εξεταζόμενων αλληλουχιών είναι 135, οι βαθμοί ελευθερίας (β.ε.= n-2, όπου n ο αριθμός των αλληλουχιών) είναι 133 και η κρίσιμη τιμή της κατανομής χ^2 είναι $\chi_{\text{critical}}= 160,9147$ (Muse & Weir 1992).

Αντιθέτως, όταν η παραπάνω δοκιμασία πραγματοποιήθηκε για το σύνολο των αλληλουχιών του «δυτικού» τύπου, δεν ήταν δυνατό να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση και επομένως η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται από ομοιογένεια εξελικτικού ρυθμού. Αναλυτικότερα, η τιμή του LRT είναι:

$$\Delta=2*[-\ln L_{\text{CLOCK}}-(-\ln L_{\text{UNCONSTRAINED}})]=2*[1759,67-(1705,53)]= 108,28$$

Με τον αριθμό των εξεταζόμενων αλληλουχιών να ισούται με 101, τους βαθμούς ελευθερίας με 99 και την κρίσιμη τιμή της κατανομής χ^2 να είναι $\chi_{\text{critical}}= 123,2252$ (Muse & Weir 1992).

Η υπόθεση ομοιογένειας εξελικτικού ρυθμού δεν ήταν δυνατό να απορριφθεί επίσης και όταν η δοκιμασία αυτή πραγματοποιήθηκε για το σύνολο των αλληλουχιών του «ανατολικού» τύπου, με την τιμή του LRT να είναι:

$$\Delta=2*[-\ln L_{\text{CLOCK}}-(-\ln L_{\text{UNCONSTRAINED}})]=2*[1005,004-(989,4)]= 31,208$$

και δεδομένου ότι ο αριθμός των εξεταζόμενων αλληλουχιών είναι 42, οι βαθμοί ελευθερίας είναι 40 και η κρίσιμη τιμή της κατανομής χ^2 είναι $\chi_{\text{critical}}= 55,7584$ (Muse & Weir 1992).

Η έλλειψη γνώσεων των γεωλογικών γεγονότων που έλαβαν χώρα στην υπό μελέτη περιοχή κατά τη χρονική περίοδο από την εμφάνιση του είδους μέχρι τα τελευταία χιλιάδες χρόνια, καθώς επίσης και η απουσία πληροφορίας από πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού που κατανέμονται στα παράλια της Μικράς Ασίας (και που πιθανά αποτέλεσαν πληθυσμούς – πηγή για τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου), καθιστά αδύνατη τη ρύθμιση ενός τοπικού μοριακού ρολογιού για τον κάθε τύπο mtDNA. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία εκτίμησης των χρόνων απόκλισης μεταξύ των κύριων γενεαλογιών, όπως αυτές προκύπτουν από το σύνολο των φυλογενετικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Ωστόσο, η χρήση της Μπεϋζιανής μεθόδου μέσω του προγράμματος r8s, επέτρεψε την εκτίμηση των χρόνων απόκλισης των βασικότερων κόμβων του φυλογενετικού δένδρου που προέκυψε από την ανάλυση της ΜΣ. Θέτοντας ως σημείο βαθμονόμησης τη χρονολογία εμφάνισης του γένους *Lepus* (η οποία σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων, έγινε πριν από 2,5-3 εκ. χρόνια, Lopez-Martinez 1980), ο διαχωρισμός των δύο τύπων mtDNA εκτιμήθηκε πριν από 660.000 χρόνια. Η διαφοροποίηση του «ανατολικού» τύπου προηγήθηκε αυτής του «δυτικού» και πραγματοποιήθηκε περίπου 560.000 χρόνια πριν από σήμερα, ενώ αυτή του «δυτικού» τύπου στα 380.000 πριν από σήμερα (Εικόνα 3.7).

4 Συζήτηση

4.1 Γενικά στοιχεία

Αριθμός πολυμορφικών θέσεων

Οι πολυμορφικές θέσεις που χαρακτηρίζουν τις αλληλουχίες των ατόμων της Ελλάδας και της Κύπρου ανέρχονται στο 23,17% (111/479bp σε 148 αλληλουχίες), ποσοστό παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε σε μικρότερο αριθμό ατόμων από την Ελλάδα, την Κύπρο και την Ευρώπη στη μελέτη των Kasapidis *et al.* (2005) (21,7% σε 101 αλληλουχίες). Αντιθέτως, σε αντίστοιχη μελέτη πληθυσμών της κεντρικής Ευρώπης και της Ιταλίας από τους Pierpaoli *et al.* (1999), το ποσοστό των πολυμορφικών θέσεων είναι κατά πολύ μικρότερο (9,55% σε 41 αλληλουχίες), γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στο μικρότερο δειγματοληπτικό μέγεθος, αν και μετέπειτα ανάλυση σχεδόν διπλάσιου αριθμού δειγμάτων (Pierpaoli *et al.* 2003) από τις ίδιες περιοχές έδωσε αντίστοιχο αριθμό πολυμορφικών θέσεων (9,86%).

Αριθμός απλοτύπων

Ο αριθμός των απλοτύπων για την περιοχή ελέγχου του mtDNA του Ευρωπαϊκού λαού από τις περιοχές της Ελλάδας και σε μικρότερο βαθμό της Κύπρου είναι ο υψηλότερος που έχει παρατηρηθεί ποτέ για το είδος. Αναλυτικότερα, το ποσοστό των απλοτύπων (αριθμός απλοτύπων/αριθμός ατόμων*100) για την Ελλάδα φτάνει το 53,42% (78 απλότυποι/146 άτομα) και για την Κύπρο το 58,53% (7 απλότυποι/12 άτομα). Τα ποσοστά αυτά ωστόσο δεν είναι αμερόληπτα, αφού επηρεάζονται τόσο από το δειγματοληπτικό μέγεθος, όσο και από την έκταση και τις ιδιαιτερότητες της περιοχής δειγματοληψίας. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των δύο μελετών των Pierpaoli *et al.* (1999, 2003) όπου στην πρώτη περιλαμβάνονταν 41 άτομα Ευρωπαϊκού λαού από περιοχή της Ιταλίας, ενώ στη δεύτερη προστέθηκαν ακόμα 31 άτομα από την ίδια δειγματοληπτική περιοχή. Έτσι, ενώ το ποσοστό των απλοτύπων της πρώτης μελέτης είναι υψηλό και φτάνει το 53,65% (22 απλότυποι/41 άτομα), στη δεύτερη αποδείχθηκε ότι πρόκειται για λανθασμένη εκτίμηση της ποικιλότητας της περιοχής, δεδομένου ότι η προσθήκη των 31 ατόμων δεν αποκάλυψε νέους για την περιοχή απλοτύπους, μειώνοντας έτσι το συνολικό ποσοστό 34,5% (22 απλότυποι/72 άτομα). Αιτία σύμφωνα με τους παραπάνω συγγραφείς αποτελούν οι μετατοπίσεις πληθυσμών από άλλες περιοχές της Ευρώπης (Pierpaoli *et al.* 1999, 2003). Αντίστοιχο παράδειγμα αποτελούν και τα ποσοστά των απλοτύπων για το ενδημικό είδος της Ιταλίας *L. corsicanus*. Το ποσοστό των απλοτύπων μειώνεται από το 50% (13 απλότυποι/26 άτομα) (Pierpaoli *et al.* 1999) στο 33,87% (21 απλότυποι/62 άτομα) (Pierpaoli *et al.* 2003). Από την άλλη πλευρά υψηλότερα ποσοστά έχουν παρατηρηθεί σε πληθυσμούς της Ιταλίας για τα είδη

L. capensis mediterraneus (75%) και *L. timidus* (84,2%), όμως οι τιμές βασίζονται σε μικρό αριθμό ατόμων (9 απλότυποι/12 άτομα και 16 απλότυποι/19 άτομα, αντίστοιχα) (Pierpaoli *et al.* 1999, 2003). Η υπερεκτίμηση του ποσοστού των απλοτύπων θα μπορούσε να ισχύει και στην περίπτωση της Κύπρου, αφού ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκε από το νησί είναι εξίσου μικρός. Στη Σαρδηνία σε 42 άτομα λαγού (*Lepus sp.*) παρατηρήθηκαν 17 απλότυποι (40,47%, Scandura *et al.* 2007), ενώ στο Αφρικάνικο είδος *L. saxatilis* το ποσοστό ανέρχεται στο 41,14% (65 απλότυποι/158 άτομα, Kryger *et al.* 2004), ενώ στο είδος των βόρειων ακτών της Αφρικής (*Lepus sp.*) η ανάλυση 28 ατόμων αποκάλυψε 8 απλοτύπους (28,57%, Ben Slimen *et al.* 2006). Τέλος, αντίστοιχες τιμές για αρκτικά είδη λαγών αποκαλύπτουν υψηλά ποσοστά απλοτύπων μόνο για τον ορεσίβιο λαγό (*L. timidus*) που φτάνει το 85,5% (59 απλότυποι/69 άτομα). Αντιθέτως για το είδος *L. othus* το ποσοστό αυτό ισούται με 16,4% (10 απλότυποι/61 άτομα), ενώ για τον αρκτικό λαγό (*L. arcticus*) φτάνει το 50% (31 απλότυποι/62 άτομα) (Waltari & Cook 2005). Συνοψίζοντας, λοιπόν, με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, τα είδη εκείνα που φαίνεται να φέρουν μεγαλύτερο αριθμό απλοτύπων από αυτούς που παρατηρούνται σε πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού της Βαλκανικής, είναι είτε ενδημικά είτε καλύπτουν μεγάλης έκτασης γεωγραφικές περιοχές.

Γενετικές αποστάσεις για την περιοχή ελέγχου

Βάσει των γενετικών αποστάσεων, η γενετική ποικιλότητα και ετερογένεια που χαρακτηρίζει τις περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου είναι υψηλή τόσο σε ενδοειδικό όσο και σε διαειδικό επίπεδο. Οι μέσες ενδοειδικές γενετικές αποστάσεις που έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα είδη του γένους κυμαίνονται από 1,2% έως 7,7% (Ben Slimen *et al.* 2006). Οι λαγοί της Ελλάδας και της Κύπρου εμφανίζουν μέση ενδοειδική απόσταση λίγο μεγαλύτερη από τον μέσο της διακύμανσης για το γένος και ισούται με 4,3% (SE \pm 0,7). Η διαφοροποίηση που παρατηρείται στα άτομα του ανατολικού τύπου είναι παρόμοια με αυτή του δυτικού τύπου (2,7 και 2,4% αντιστοίχως). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι συγκριτικά με τον Ευρωπαϊκό λαγό μεγαλύτερες μέσες ενδοειδικές γενετικές αποστάσεις εμφανίζουν το *L. timidus*, τα δείγματα του οποίου προέρχονται από το μεγαλύτερο τμήμα κατανομής του (Σουηδία, Νορβηγία, Σκωτία, Ρωσία και Κίνα), το *L. capensis* από τη Νότιο Αφρική και τα είδη που εντοπίζονται στην Ασία (Κίνα).

Βάσει των αντίστοιχων μέσων διαειδικών γενετικών αποστάσεων η ελάχιστη τιμή παρατηρείται μεταξύ των ειδών *L. timidus* και *L. arcticus* (5,0%), ενώ η μέγιστη μεταξύ των *L. coreanus* και *L. capensis* της Νοτίου Αφρικής (17,2%). Η διαφοροποίηση των ατόμων του Ευρωπαϊκού λαγού από περιοχές της Βαλκανικής και του Βόρειου Ισραήλ (Kasapidis *et al.* 2005) από άτομα άλλων ειδών του γένους *Lepus* κυμαίνεται από 10.7% (με το *Lepus sp.* της Τυνησίας και της Αιγύπτου) έως 16% (με το *L. capensis* της Νοτίου Αφρικής) (Ben Slimen *et al.* 2006).

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι η γενετική διαφοροποίηση των δύο τύπων mtDNA της Βαλκανικής και της Κύπρου είναι αρκετά υψηλή (6,2%) υπερβαίνοντας την ελάχιστη τιμή διαειδικών γενετικών αποστάσεων που έχει παρατηρηθεί μεταξύ ειδών του γένους *Lepus*. Η σαφής γενετική διάκριση των δύο τύπων mtDNA οφείλεται πιθανώς στην ιστορική απομόνωσή τους και θα μπορούσε να αποτελέσει το πρώτο στάδιο στην διαδικασία της δημιουργίας νέων ταξινομικών μονάδων (π.χ. είδη ή υποείδη). Αν και ενδεικτική, η σύγκριση των παραπάνω γενετικών αποστάσεων δεν μπορεί να θεωρηθεί αμερόληπτη, αφού οι μεταξύ των ειδών εκτιμήσεις αλλά και αυτές εντός του είδους, εξαρτώνται άμεσα από α) τον αριθμό των αλληλουχιών που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση, β) την έκταση και την καταλληλότητα της δειγματοληπτικής περιοχής (του βαθμού στον οποίο αντιπροσωπεύει την κατανομή και επομένως την ποικιλότητα του είδους), γ) την πυκνότητα των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από αυτή και δ) τον ορισμό των ομαδοποιήσεων.

Εκτιμήτριες μικρότερου βαθμού μεροληψίας αποτελούν οι μεταξύ των ατόμων γενετικές αποστάσεις. Η μεγαλύτερη μεταξύ των ατόμων γενετική απόσταση φτάνει το 10,3% και παρατηρείται τόσο μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους από περιοχές της Ελλάδας [ενός ατόμου από τον νομό Βοιωτίας (Liv15) με ένα άτομο από το νησί της Σαμοθράκης (Samothraki3)], όσο και μεταξύ ατόμων του είδους που κατανέμονται στη ΒΑ Ελλάδα (BulPP25 και BulPP177) από το άτομο του είδους *L. c. mediterraneus* που χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα. Αυτός ο βαθμός διαφοροποίησης κατατάσσεται στις υψηλότερες τιμές που έχουν ποτέ παρατηρηθεί μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους από το σύνολο των μέχρι σήμερα δεδομένων της περιοχής ελέγχου του mtDNA για διάφορα είδη του γένους *Lepus* (Ben Slimen *et al.* 2006). Τα είδη που εμφανίζουν υψηλότερες τιμές διαφοροποίησης είναι α) το *L. timidus* (11%), β) το *L. capensis* (Κίνα) (18,9%), γ) το *L. oiostolus* (13,7%), δ) το *L. comus* (18,6%) και ε) το *L. capensis* (Νότιος Αφρική) (14,5%). Η υψηλή μεταξύ των ατόμων διαφοροποίηση που παρατηρείται στο είδος *L. timidus* θα μπορούσε να θεωρηθεί αναμενόμενη, τόσο βάσει του μεγάλου εύρους γεωγραφικών περιοχών που καλύπτουν τα δείγματά του, όσο και βάσει ενδείξεων της πολυφυλετικότητάς του, όπως αυτή προκύπτει από τη μελέτη των Waltari *et al.* (2004). Αντιθέτως, η απουσία μέχρι σήμερα φυλογενετικών μελετών των υπόλοιπων ειδών που παρουσιάζουν υψηλές μεταξύ των ατόμων τους τιμές δεν επιτρέπει την ερμηνεία τους.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών τύπων είναι πολύ υψηλή, σε βαθμό που ενέχει υπόνοιες διακριτών ταξινομικών μονάδων, χωρίς ωστόσο να είναι δυνατός, με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, ο προσδιορισμός της βαθμίδας στην οποία ανήκουν. Αντιθέτως, προκαταρκτική μελέτη ενός αριθμού μορφολογικών χαρακτήρων στους δύο τύπους λαγών, απέτυχε στο να διακρίνει διαγνωστικούς, για τις δύο αυτές ομάδες, χαρακτήρες (προσωπική επικοινωνία με F. Suchentrunk), γεγονός που χρήζει περαιτέρω μελέτης.

4.2 Απομόνωση λόγω απόστασης

Γνωρίζοντας την γενετική δομή που εμφανίζουν οι πληθυσμοί του είδους στην Ελλάδα και την Κύπρο, τόσο βάσει του mtDNA (Kasapidis *et al.* 2005, παρούσα μελέτη), όσο και βάσει του πυρηνικού τους DNA (μικροδορυφορικές αλληλουχίες Αντωνίου 2002), ένα αρκετά ασφαλές συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι αν και αποτελεί είδος με μεγάλη δυνατότητα μετακίνησης, η διασπορά μεταξύ των πληθυσμών του είναι περιορισμένη. Κύρια αίτια της μειωμένης γονιδιακής ροής που παρατηρείται θα μπορούσαν να αποτελούν τόσο η δράση μηχανισμών γεωγραφικής απομόνωσης, όσο και η συμπεριφορά των ατόμων του είδους. Η αδυναμία εντοπισμού ενός προτύπου απομόνωσης λόγω απόστασης (IBD) σε πληθυσμούς της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Κρήτης και της Κύπρου φαίνεται να αντιτίθεται στις θεωρητικές προβλέψεις πληθυσμών που κατανέμονται συνεχώς σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές. Η προσεκτικότερη, ωστόσο, μελέτη των μηχανισμών εκείνων που δημιουργούν το φαινόμενο της IBD οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αντίθεση αυτή είναι φαινομενική. Σύμφωνα με τον Slatkin (1993), ο εντοπισμός προτύπων απομόνωσης λόγω απόστασης είναι εφικτός μόνο σε κατάσταση ισορροπίας της γονιδιακής ροής (διασποράς) με την τυχαία γενετική παρέκκλιση ή σε καταστάσεις πολύ κοντινές σε αυτή, σύμφωνα πάντα με το ισχύον πρότυπο διασποράς. Η απουσία προτύπου IBD σε είδη τα οποία αναμένεται να εντοπιστεί, βάσει στοιχείων που προκύπτουν από άλλες μελέτες (π.χ. από πληροφορία που παρέχεται από μελέτες διασποράς και από γενικές γνώσεις της φυσικής ιστορίας του είδους), αποτελεί ουσιαστικά ένδειξη ότι οι πληθυσμοί του είδους απέχουν πολύ από την κατάσταση ισορροπίας και είναι πολύ πιθανό να εποίκισαν πρόσφατα την περιοχή την οποία καταλαμβάνουν. Εναλλακτικά, οι τάσεις διασποράς του είδους είναι λιγότερο γνωστές από όσο πιστευόταν (Slatkin 1993). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η αδυναμία εντοπισμού ενός προτύπου IBD στα δεδομένα μας είναι πιθανό να οφείλεται στην πρόσφατη εποίκηση του είδους στην περιοχή της Βαλκανικής. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται ακόμα περισσότερο αν αναλογιστούμε την πρόσφατη ιστορία γένους (και επομένως και του είδους), βάσει του αρχείου των απολιθωμάτων (πρώτη εμφάνιση απολιθωμάτων του γένους πριν από 2,5-3 εκατ. χρόνια, Lopez-Martinez 1980).

Παράλληλα, ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να συνεισφέρει στη διαφοροποίηση των πληθυσμών ενός είδους απουσία προτύπου IBD, είναι η κοινωνικό-οικολογική συμπεριφορά των ατόμων του είδους, όπως αναφέρεται και από τους Mamuris *et al.* (2001) στη μελέτη πληθυσμών του είδους της Στερεάς Ελλάδας. Η απουσία στατιστικά σημαντικής απομόνωσης των ηπειρωτικών πληθυσμών ως αποτέλεσμα της μεταξύ τους γεωγραφικής απόστασης, έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον Ελλαδικό χώρο (Mamuris *et al.* 2001, Mamuris *et al.* 2002, Kasapidis *et al.* 2005) και στην Ευρώπη (π.χ. Suchentrunk *et al.* 2000).

4.3 Γεωγραφικά πρότυπα γενετικής διαφοροποίησης

Τα γενετικά φράγματα που εκτιμήθηκαν αποκαλύπτουν ζώνες έντονης διαφοροποίησης, που έχουν άμεση συνάφεια με το ανάγλυφο του τοπίου στο οποίο εντοπίζονται και ενδέχεται να αντικατοπτρίζουν προτιμήσεις των πληθυσμών του είδους σε συγκεκριμένους τύπους ενδιαιτημάτων (συμβάλλοντας στη διαμόρφωση της συμπεριφοράς του).

Από την τρισδιάστατη απεικόνιση των περιοχών, όπου παρατηρούνται τα ισχυρότερα γενετικά φράγματα (**Εικόνες 3.4 και 3.5**) είναι εμφανές ότι οι απότομες (μεγάλης κλίσης και απόκρημνες) πλαγιές των βουνών αποτελούν αδιαμφισβήτητα φράγματα στη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών αποτρέποντας ή επιτρέποντας μικρού βαθμού επικοινωνία μεταξύ αυτών. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις οικολογικές συνήθειες του είδους, αφού ο Ευρωπαϊκός λαγός προτιμά ανοικτά ενδιαιτήματα με περιορισμένη δασοκάλυψη, όπως οι ορεινές περιοχές με ελαφριά κλίση, νοτιο-ανατολική έκθεση, έδαφος μέτριας ανάμειξης, μικρό αριθμό δένδρων και μεγάλο αριθμό θάμνων (όπως φαίνεται και από τη μεγαλύτερη πυκνότητα λαγών στις περιοχές αυτές Charman & Flux 1990, Jansson *et al.* 2007).

Επιπρόσθετα, τα γενετικά φράγματα αντικατοπτρίζουν την ιστορία και εξέλιξη του είδους στην περιοχή της Βαλκανικής, αφού αποτελούν ενδείξεις της φύσεως των περιοχών που αποτέλεσαν καταφύγια για το είδος κατά τη διάρκεια των Παγετωδών περιόδων του Πλειστοκαίνου και του βαθμού της μεταξύ τους γονιδιακής ροής.

Αν και η ύπαρξη της ζώνης επαφής των δύο τύπων μιτοχοδριακού DNA έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Kasapidis *et al.* 2005), η απεικόνισή της, όπως αυτή προέκυψε μέσω της ανάλυσης των γενετικών φραγμάτων (**Εικόνα 3.4**), έδωσε τη δυνατότητα γεωγραφικού καθορισμού και διατύπωσης υποθέσεων που αφορούν τη δημιουργία της. Σύμφωνα με τα δεδομένα των Kasapidis *et al.* (2005), η περιοχή συνύπαρξης των δύο τύπων mtDNA εκτείνεται από την ανατολική Μακεδονία-Θράκη έως τη Βουλγαρία. Στη προαναφερθείσα εργασία, η διάκριση των ατόμων της Βουλγαρίας σε «ανατολικού» και «δυτικού» τύπου βασίστηκε τόσο σε δεδομένα αλληλούχησης, όσο και στη γονοτύπηση θραυσμάτων της περιοχής ελέγχου του mtDNA (RFLPs). Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα που φέρουν «ανατολικού» τύπου mtDNA ανιχνεύθηκαν μόνο μέσω RFLPs. Ωστόσο, όλα τα άτομα της Βουλγαρίας που αλληλουχήθηκαν είναι «δυτικού» τύπου. Επομένως, ο προσδιορισμός ενός μικρού αριθμού ατόμων ως «ανατολικού» τύπου βασίστηκε στην παρουσία μιας περιοριστικής θέσης που αναγνωρίζεται από το ένζυμο *XbaI* (Kasapidis *et al.* 2005). Με την προσθήκη ενός μεγαλύτερου αριθμού αλληλουχιών και την προσεκτικότερη μελέτη της αλληλουχίας που αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο, διαπιστώθηκε ότι η θέση αυτή δεν είναι διαγνωστική για τους δύο τύπους mtDNA, αφού δεν παρατηρείται μόνο στα άτομα «ανατολικού» τύπου (π.χ. παρατηρείται σε πληθυσμούς της Σερβίας που

χαρακτηρίζονται από «δυτικό» τύπο mtDNA) και δεν χαρακτηρίζει το σύνολο των ατόμων του «ανατολικού» τύπου (π.χ. δεν χαρακτηρίζει τα άτομα της Κύπρου, Σαμοθράκης, Χίου). Τα στοιχεία αυτά φαίνεται να αντίκεινται στην υπόθεση των Kasapidis *et al.* (2005) κατά την οποία στην περιοχή της Βουλγαρίας παρατηρούνται λαγοί και των δύο τύπων mtDNA αναθεωρώντας έτσι τη ζώνη επαφής τους ως χώρο που περιλαμβάνει μόνο περιοχές της ανατολικής Μακεδονίας-Θράκης, των ανατολικών συνόρων της χώρας με την Ευρωπαϊκή Τουρκία, καθώς και πεδινών περιοχών του νομού Θεσσαλονίκης. Η έλλειψη ωστόσο δειγμάτων από την περιοχή της Ανατολίας καθώς και δεδομένων αλληλουχιών από περισσότερα άτομα πληθυσμών της Βουλγαρίας δεν επιτρέπει τον ακριβή, προς τα ανατολικά και βόρεια αντιστοίχως, καθορισμό των ορίων και της έκτασης της ζώνης αυτής.

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα δημοσιευμένα δεδομένα, λαμβάνοντας υπόψη τη γεωγραφική κατανομή των δύο τύπων mtDNA στην περιοχή της Βαλκανικής και την μοναδική περιοχή συνύπαρξής τους (Θράκη), ένα αρκετά πιθανό σενάριο θα ήταν η ζώνη επαφής τους να παρουσιάζεται κάθετα στον άξονα Ανατολής-Δύσης ως αποτέλεσμα συνάντησης των εκ διαμέτρου αντίθετων κατευθύνσεων διασποράς των δύο διαφοροποιημένων ομάδων (ο «δυτικός» τύπος με κατεύθυνση ανατολική και ο «ανατολικός» με δυτική). Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει, αφού δεν παρατηρείται μια ζώνη επαφής με κατεύθυνση βορρά-νότου, ενώ η ασυνεχής κατανομή των γενετικών φραγμάτων που εντοπίστηκαν είναι ενδεικτική της πολυπλοκότητας που τη χαρακτηρίζει χωρίς ωστόσο να επιτρέπει τον σαφή προσδιορισμό των ορίων της. Τα δύο πρώτα στην ιεραρχία φράγματα (στην περιοχή της βορειοανατολικής Ελλάδας) σχηματίζουν έναν νοητό διάδρομο εντός του οποίου παρατηρούνται μόνο άτομα «ανατολικού» τύπου, ενώ εξωτερικά αυτού μόνο άτομα του «δυτικού» τύπου. Η περιοχή στην οποία παρατηρούνται τα άτομα «ανατολικού» τύπου χαρακτηρίζεται από χαμηλό υψόμετρο και μικρή κλίση, ενώ οι περιοχές που καταλαμβάνονται από άτομα «δυτικού» τύπου χαρακτηρίζονται από μέτριο έως υψηλό υψόμετρο. Το τρίτο στην ιεραρχία φράγμα εντοπίζεται στην περιοχή του νομού Θεσσαλονίκης, εντός του οποίου παρατηρούνται μόνο άτομα του «ανατολικού» τύπου που καταλαμβάνουν και πάλι πεδινές περιοχές. Στην περιοχή αυτή τα άτομα του «δυτικού» τύπου καταλαμβάνουν τόσο περιοχές μικρού, όσο και περιοχές μεγάλου υψομέτρου.

Αντίστοιχο πρότυπο διαχωρισμού παρατηρείται στη Κρήτη και στη Κύπρο. Πιο συγκεκριμένα στη Κρήτη, τα γενετικά φράγματα εντοπίζονται στα όρια των νοτιο-ανατολικών ορεινών περιοχών του Ψηλορείτη και των Αστερουσίων και χωρίζουν τα άτομα εκείνα που κατανέμονται στις πεδινές εκτάσεις από αυτά που κατανέμονται σε μεγαλύτερο υψόμετρο (**Εικόνα 3.5Α**). Στη Κύπρο, η κατανομή των γενετικών φραγμάτων συμπίπτει και πάλι με τις απότομες μεταβολές του αναγλύφου (απόκρημνες πλαγιές, φαράγγια). Η λεπτομερέστερη μελέτη αυτών απαιτεί ωστόσο έναν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων εξαιτίας

του έντονα ορεινού χαρακτήρα του νησιού (**Εικόνα 3.5B**). Συνοψίζοντας, αυτό που μπορεί να διατυπωθεί με ασφάλεια είναι ότι τα γενετικά φράγματα συμπίπτουν με περιοχές έντονης μεταβολής του αναγλύφου στο σύνολο των περιοχών που μελετήθηκαν, υποδεικνύοντας τον ουσιαστικό ρόλο που διαδραμάτισαν και διαδραματίζουν στην διασπορά του είδους. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι αρκετά πιθανό περιοχές με μικρή ή μέτρια κλίση και εύκολη πρόσβαση να αποτέλεσαν τους δρόμους εποίκισης του είδους προς τη Βαλκανική χερσόνησο.

Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται και στην Ιταλία, όπου οι πιο έντονα διαφοροποιημένοι πληθυσμοί του Ευρωπαϊκού λαγού παρατηρούνται σε απομονωμένες ορεινές περιοχές της βόρειας (Mount Cusna), κεντρικής (Abruzzo National Park) και νότιας (Mount Pollino) Ιταλίας (Pierpaoli *et al.* 1999, 2003). Οι πληθυσμοί αυτοί θεωρούνται από τους συγγραφείς υπολείμματα μιας από τις πρώτες εποίκισεις (πρώτο κύμα εποίκισης) του είδους στη νοτιοδυτική Ευρώπη, που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου. Χωρίς να είναι δυνατή η απόρριψη ή η επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, υποδεικνύεται η επιρροή του αναγλύφου στην διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους στην Ιταλική χερσόνησο, συνιστώντας φράγμα της γονιδιακής ροής.

4.4 Τοπολογία φυλογενετικών δέντρων και ταξινομικές αναθεωρήσεις

Βάσει της παραομάδας που χρησιμοποιήθηκε το *L. europaeus* εμφανίζεται μονοφυλετικό και χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο κύριων γενεαλογικών γραμμών (ανατολικός και δυτικός κλάδος), όπου παρατηρείται σημαντική αντιστοιχία μεταξύ αυτών και της γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με αντίστοιχα που έχουν παρατηρηθεί σε άλλες ομάδες θηλαστικών, ως επακόλουθο των έντονων εξελικτικών διεργασιών που έδρασαν και συνεχίζουν να δρουν στην περιοχή της Βαλκανικής χερσονήσου (βλέπε Κεφάλαιο I Εισαγωγή). Αν και στο παρελθόν είχαν διεξαχθεί αντίστοιχες μελέτες του είδους στην περιοχή της Ελλάδας (Mamuris *et al.* 2001, Mamuris *et al.* 2002, Suchentrunk *et al.* 2003, Kasapidis *et al.* 2005), ο περιορισμένος αριθμός δειγμάτων και πληθυσμών που περιλάμβαναν και ο διαφορετικός τύπος αναλύσεων δεν επέτρεψε την λεπτομερή απεικόνιση και ερμηνεία των εξελικτικών σχέσεων που διέπουν τους πληθυσμούς του, παρά μόνο των κυριότερων χαρακτηριστικών τους.

Η τοπολογία του δέντρου της **Εικόνας 3.7** και η διαφοροποίηση των λαγών της νότιας Βαλκανικής σε δύο κύριους φυλογενετικούς κλάδους (ανατολικός και δυτικός) υποδεικνύουν ότι η ιστορία του είδους στο χώρο αυτό δεν είναι μια απλή υπόθεση εποίκισης και διασποράς. Φαίνεται ότι κάθε κλάδος έχει διαφορετική εξελικτική ιστορία, τόσο ως προς τα μονοπάτια εποίκισης που χρησιμοποίησε, όσο και ως προς το χρόνο παραμονής τους στην περιοχή, όπως διαπιστώνεται και στη συνέχεια με τους εκτιμώμενους χρόνους απόσχισης, του αρχείου των απολιθωμάτων και των επιδράσεων των Παγετώνων του Πλειστοκαίνου.

Εντός του δυτικού κλάδου, οι απλότυποι της κεντρικής Ευρώπης διακρίνονται από αυτούς της Ελλάδας (γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Kasapidis *et al.* 2005), επιτρέποντας τη διατύπωση της υπόθεσης σύμφωνα με την οποία η εποίκηση της κεντρικής Ευρώπης δεν πραγματοποιήθηκε μόνο από τα καταφύγια των νότιων χερσονήσων της Ευρώπης (Ιβηρική, Ιταλική, Βαλκάνια), αλλά και από άλλα καταφύγια (βλέπε παρακάτω). Αντίστοιχα σαφής είναι η διάκριση των πληθυσμών της Κύπρου εντός του ανατολικού κλάδου.

Συγκρίνοντας αντίστοιχες μελέτες του είδους που έχουν πραγματοποιηθεί μπορούμε με βεβαιότητα να αποφανθούμε για το έντονο φυλογεωγραφικό πρότυπο που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί του είδους στη Βαλκανική χερσόνησο (συμπεριλαμβανομένης και της Κύπρου). Στην πλειοψηφία των μελετών που έχουν διεξαχθεί για άλλες περιοχές της Ευρώπης (Melo-Ferreira *et al.* 2005, Wu *et al.* 2005, Fredsted *et al.* 2006, Thulin *et al.* 2006a), οι πληθυσμοί του Ευρωπαϊκού λαγού εμφανίζουν ακτινωτή εξέλιξη, στοιχείο ενδεικτικό της πρόσφατης εμφάνισης και διασποράς του είδους στις περιοχές αυτές. Στην περιοχή της Ρωσίας, η φυλογενετική ανάλυση ατόμων του είδους από δύο περιοχές δεν αποκάλυψε κάποιο ιδιαίτερο φυλογεωγραφικό πρότυπο (Wu *et al.* 2005). Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικό της κατάστασης του είδους στην περιοχή αυτή, αφού ο στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η φυλογένεση ολόκληρου του γένους *Lepus* με αποτέλεσμα τόσο ο αριθμός των δειγματοληπτικών σταθμών, όσο και ο αριθμός των ατόμων που αναλύθηκαν να είναι πολύ μικρός. Παράλληλα, η εικόνα που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί του *L. europaeus* στην περιοχή αυτή, περιπλέκεται ακόμα περισσότερο, λόγω φαινομένων υβριδισμού του με συμπάτριους πληθυσμούς του ορεσίβιου λαγού (Thulin *et al.* 2006a). Στην Ιβηρική, παρά την υψηλή ενδοειδική διαφοροποίηση που παρατηρείται δεν είναι δυνατή η εξαγωγή φυλογεωγραφικών συμπερασμάτων, αφού αυτή στο μεγαλύτερο ποσοστό της οφείλεται σε φαινόμενα υβριδισμού μεταξύ των ειδών *L. europaeus* και *L. timidus* ή/και *L. granatensis* (Melo-Ferreira *et al.* 2005).

Ενδεικτικό της διαφορετικής εξελικτικής ιστορίας (διαφορετικών προσαρμογών και εξελικτικών πιέσεων) των δύο φυλογενετικών κλάδων της Βαλκανικής είναι οι διαφορετικοί ρυθμοί εξέλιξης (αποτελέσματα ελέγχου ομοιογένειας εξελικτικού ρυθμού). Οι Kasapidis *et al.* (2005) χρησιμοποιώντας το μέσο ρυθμό διαφοροποίησης της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδρίου στα 12,4% ανά εκατομμύριο χρόνια (Pierpaoli *et al.* 1999), εκτίμησαν ότι η απόσχιση των δύο κλάδων έλαβε χώρα 105.000 έως 490.000 χρόνια πριν από σήμερα. Ο μέσος χρόνος σύγκλισης των απλοτύπων του κάθε κλάδου, σύμφωνα με την ίδια μελέτη, εκτιμήθηκε στα 275.000 χρόνια πριν από σήμερα για τον ανατολικό τύπο και στα 226.000 χρόνια πριν από σήμερα για τον δυτικό τύπο. Ωστόσο, η αξιοπιστία της χρονολόγησης αυτής αμφισβητείται από το γεγονός ότι η υπόθεση ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού απορρίπτεται στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Ο χρόνος απόκλισης, όπως αυτός

εκτιμήθηκε χωρίς την αποδοχή της ισχύος του μοριακού ρολογιού, είναι παλαιότερος και φτάνει τα 660.000 χρόνια πριν από σήμερα. Το ίδιο ισχύει και εντός των δύο κύριων κλάδων (για τους οποίους ισχύει η ομοιογένεια του εξελικτικού ρυθμού), όπου βάσει της παραπάνω μεθοδολογίας εκτιμήθηκαν να είναι πολύ παλαιότεροι από αυτούς των Kasapidis *et al.* (2005), συμφωνώντας ωστόσο ως προς την μεγαλύτερη σε χρόνο διαφοροποίηση του ανατολικού κλάδου σε σχέση με τον δυτικό τύπο mtDNA.

Όμως τι γίνεται εντός των κύριων κλάδων που σχηματίζονται; Είναι σε θέση τα δεδομένα να μας δώσουν ξεκάθαρο φυλογενετικό ή φυλογεωγραφικό πρότυπο; Παρατηρώντας κανείς τις μικρότερες ομάδες απλοτύπων, π.χ. εντός του δυτικού κλάδου και τις περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας, αυτό που θα διαπιστώσει είναι μια ασάφεια στις σχέσεις των ατόμων και στις περισσότερες των περιπτώσεων τα δέντρα έχουν τη μορφή «χτένας». Οδηγούμαστε δηλαδή σε καταστάσεις πολυτομιών. Οι πολυτομίες στη φυλογενετική ανάλυση συνήθως θεωρούνται αδυναμία επίλυσης των φυλογενετικών σχέσεων στο συγκεκριμένο κόμβο του δέντρου, λόγω χαμηλής διακριτικής ικανότητας των δεδομένων («μαλακές» πολυτομίες). Ταχείες κλαδογενέσεις είναι πιθανό να εμφανίζονται ως πολυτομίες, αν το μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι σχετικά μικρό. Σε κάποιες, όμως, περιπτώσεις μια πολυτομία μπορεί να είναι πραγματική («σκληρή» πολυτομία) αν αντιπροσωπεύει σχεδόν ταυτόχρονο διαχωρισμό κάποιων ταξινομικών μονάδων, λόγω π.χ. κοινού βικαριανιστικού γεγονότος (Maddison 1989). Πάντως, η επίλυση της βιολογικής υπόστασης των πολυτομιών περιπλέκεται από το γεγονός ότι η πολυτομία αντιπροσωπεύει τη μηδενική υπόθεση για τη φυλογενετική αναπαράσταση (όλες οι ταξινομικές μονάδες ισαπέχουν) και συνεπώς δεν μπορεί να αποδειχθεί. Θεωρητικά σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις πολυτομιών εντός των δύο κλάδων, η αδυναμία επίλυσης των φυλογενετικών σχέσεων οφείλεται στη χαμηλή διακριτική ικανότητα των δεδομένων. Οι διαφοροποιήσεις που εμφανίζονται στην περιοχή ελέγχου (που χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό διαφοροποίησης) είναι παρά πολύ μικρές έως και μηδαμινές. Για να προσεγγιστούν οι σχέσεις των ειδών αυτών σε πληθυσμιακό επίπεδο, απαιτείται η ανάπτυξη διαφορετικού τρόπου προσέγγισης όπως οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες (βλέπε επόμενο κεφάλαιο) που ως γνωστό έχουν πολύ μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και είναι σε θέση να ταυτοποιούν ακόμα και σε επίπεδο ατόμου.

Σε αντίθεση με τη επιβεβαίωση της μονοφυλετικότητας του είδους, τα παραγόμενα φυλογενετικά πρότυπα δεν συμφωνούν με τις ομαδοποιήσεις σε επίπεδο υποείδους, όπως αυτές έχουν περιγραφεί για την Ελλάδα και την Κύπρο βάσει μορφολογίας, θέτοντας υπό αμφισβήτηση την υποειδική ταξινόμηση του είδους. Αν και ορισμένες μονοφυλετικές ομαδοποιήσεις που παρατηρούνται σε λαγούς των νησιών του Αιγαίου (π.χ. Ρόδος, Κρήτη) και της Κύπρου συμπίπτουν με το εύρος κατανομής των υποειδών που έχουν περιγραφεί σε αυτές, ωστόσο η σύμπτωση αυτή είναι φαινομενική, ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς τον

νησιώτικο χαρακτήρα τους και τις προσαρμογές που έχουν αναπτύξει κατά την παραμονή τους σε αυτά. Η απουσία, λοιπόν, καθολικής ισχύς των μορφολογικών χαρακτήρων που χρησιμοποιήθηκαν για την διάκριση των υποειδών, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι χαρακτήρες δεν είναι διαγνωστικοί σε επίπεδο υποειδών και ως εκ τούτου τα υποείδη αυτά δεν μπορούν να γίνουν αποδεκτά. Η ταύτιση ενός μικρού αριθμού υποειδών με τις φυλογενετικές ομαδοποιήσεις θα μπορούσε να αποδοθεί στην πλαστικότητα των μορφολογικών χαρακτήρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταξύ τους διάκριση, ενώ οι διαφορετικές μορφές του ευρωπαϊκού λαγού θα μπορούσαν αν χαρακτηριστούν ως διαφορετικοί οικοφαινότυποι, οι οποίοι ορίζονται ως φαινότυποι των ειδών που φέρουν προσαρμογές σχετιζόμενες με το περιβάλλον ή το ενδιαίτημα στο οποίο ζουν, χωρίς να υπάρχει αντιστοίχιση με τις πραγματικές γενετικές τους αποστάσεις. Άλλωστε δεν είναι λίγοι σήμερα οι επιστήμονες που αποδέχονται την άποψη των Wilson & Brown (1953), ότι το υποείδος αποτελεί έννοια τόσο αυθαίρετη, που θα έπρεπε να εγκαταλειφθεί. Η απουσία εξελικτικής σημασίας από την έννοια του υποείδους, αφού ουσιαστικά δεν αντιπροσωπεύει ανεξάρτητες εξελικτικές γενεαλογίες, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η συστηματική είναι μια επιστήμη, η οποία είναι άμεσα συνυφασμένη με την εξέλιξη, αφού η τελική της αποστολή είναι ο προσδιορισμός των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των ταξινομικών μονάδων, είναι στοιχεία που ευνοούν την άποψη της κατάργησης της έννοιας του υποείδους (τουλάχιστον με τον μέχρι σήμερα ορισμό του).

4.5 Ιστορική Βιογεωγραφία-Φυλογεωγραφικό σενάριο

Η εξελικτική ιστορία του είδους στον Ευρωπαϊκό χώρο και ιδιαίτερα στον ευμετάβλητο χώρο της Βαλκανικής είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παλαιογεωγραφική της ιστορία και τις Παγετώδεις περιόδους του Πλειστοκαίνου. Είναι πολύ πιθανό η περιοχή αυτή να αποτέλεσε καταφύγιο για το είδος κατά τη διάρκεια των Παγετώνων, όπως συνέβη και με πολλά άλλα είδη οργανισμών (ζώα και φυτά) (Taberlet & Bouvet 1994, Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 1999, Manceau *et al.* 1999, Hewitt 2001, Seddon *et al.* 2001, Orth *et al.* 2002, Seddon *et al.* 2002, Deffontaine *et al.* 2005, Sommer & Benecke 2005, Dubey *et al.* 2006). Στην περιοχή της Βαλκανικής χερσονήσου το *L. europaeus* εμφανίζει έντονη φυλογεωγραφική δομή και μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα συγκριτικά με τους ομοειδικούς πληθυσμούς της βόρειας και κεντρικής Ευρώπης, της Ιβηρικής (αποκλείοντας τα άτομα εκείνα που θεωρούνται υβρίδια από διασταυρώσεις του είδους με τον ορεσίβιο λαγό) και της Ιταλίας. Είναι χαρακτηριστικό ότι, ενώ οι περιοχές της νότιας Ευρώπης, που έδρασαν ως καταφύγια κατά της Παγετώδεις περιόδους, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενδημικών ειδών λαγών (Ιβηρική χερσόνησος: *L. granatensis*, *L. castroviejoi*, Ιταλία: *L. corsicanus*), στα Βαλκάνια εντοπίζεται μόνο το *L. europaeus* (μη ενδημικό). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις ενδείξεις υψηλότερης εξελικτικής συγγένειας των ενδημικών ειδών της Ευρώπης με

τον ορεσίβιο λαγό και του Ευρωπαϊκού λαγού με τα Αφρικανικά είδη λαγόμορφων (Pierpaoli *et al.* 1999), ενισχύει την υπόθεση ότι η εποίκηση της Ευρώπης πραγματοποιήθηκε από διαφορετικές γενεαλογικές γραμμές λαγόμορφων, με το *L. europaeus* να αποτελεί το τελευταίο χρονικά είδος που την εποίκησε (Pierpaoli *et al.* 1999, 2003, Melo-Ferreira *et al.* 2007).

Η υπόθεση αυτή σε συνδυασμό με την τοπολογία του φυλογενετικού δέντρου της **Εικόνας 3.7**, τους εκτιμώμενους χρόνους διαφοροποίησης και του αρχείου των απολιθωμάτων οδηγούν στη διατύπωση ενός πιθανού σεναρίου εποίκησης της Βαλκανικής χερσονήσου και της διαφοροποίησης των δύο διακριτών τύπων mtDNA, το οποίο περιγράφεται παρακάτω.

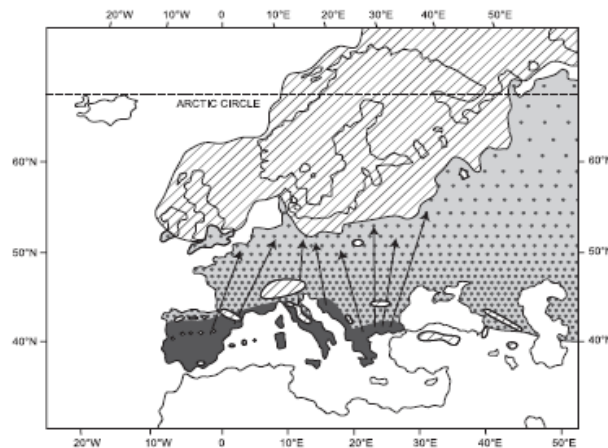
Λαμβάνοντας υπόψη την Β. Αμερικανική προέλευση του γένους (Matthee *et al.* 2004) είναι πιθανό η διασπορά του είδους *L. europaeus* στην Ευρώπη να πραγματοποιήθηκε μέσω της Ασίας. Άλλωστε τα απολιθώματα, ηλικίας κατώτερου και μέσου Πλειστοκαίνου (1-0,5 εκ. χρ. πριν από σήμερα), που έχουν βρεθεί στην Ιβηρική χερσόνησο, αφορούν μόνο το είδος *L. granatensis*, υποδεικνύοντας την ακόμα πιο πρόσφατη χρονικά εισβολή του *L. europaeus* στην Ιβηρική από περιοχές της κεντρικής Ευρώπης (Lopez-Martinez 1977). Ωστόσο θεωρείται ότι ο Ευρωπαϊκός λαγός είχε ήδη εκτεταμένη εξάπλωση στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια του ανώτερου Πλειστοκαίνου (Ben Slimen *et al.* 2005), γεγονός που υποστηρίζεται και από γενετικά δεδομένα (Melo-Ferreira *et al.* 2007). Λαμβάνοντας υπόψη την ιστορική (φυσική) κατανομή του *L. europaeus*, η οποία εκτείνονταν ανατολικά μόνο μέχρι τα Ουράλια Όρη (Corbet & Hill 1986) και την πρόσφατη επέκτασή του προς την ανατολή, η οποία σχετίζεται με μετατοπίσεις και με τη διάνοιξη των Υπερσιβηρικών σιδηροδρομικών γραμμών (Thenius 1980), είναι πολύ πιθανό ο πρόγονος του Ευρωπαϊκού λαγού, που έδωσε γένεση στους δύο μιτοχονδριακούς κλάδους (ανατολικό και δυτικό) να προσέγγισε την περιοχή της Ευρώπης από περιοχές της Ασίας, χρησιμοποιώντας μονοπάτια νοτιότερα των Ουράλιων Ορέων, τα οποία χαρακτηρίζονταν από ευνοϊκότερες για την επιβίωσή του συνθήκες από ό,τι τα βορειότερα αυτών.

Ο Ευρωπαϊκός λαγός κατά τη διασπορά του από την Ασία προς την Ευρώπη είναι βέβαιο ότι ήρθε αντιμέτωπος με τις Παγετώδεις περιόδους του Πλειστοκαίνου. Η επιβίωσή του κατά τις περιόδους αυτές θα πρέπει να έγινε σε περιοχές προφυλαγμένες από τις δριμείες συνθήκες (καταφύγια για το είδος). Ο χρόνος απόσχισης των δύο φυλογενετικών κλάδων που εποίκησαν τη Βαλκανική και τη Μικρά Ασία εκτιμάται περίπου στα 660.000 χρόνια πριν από σήμερα (μέσο Πλειστόκαινο), δηλαδή στο όριο μετάβασης από την πρότερη Μεσοπαγετώδη στην Γκύντζιο Παγετώδη περίοδο. Σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων, τα παλαιότερα αξιόπιστα ευρήματα του είδους εντοπίζονται στην περιοχή του Καυκάσου και χρονολογούνται από το κατώτερο και μέσο Πλειστόκαινο (Averianov & Baryschnikov 1992, cf. Averianov *et al.* 2003 από Ben Slimen *et al.* 2005). Επομένως η ύπαρξη πληθυσμών

Ευρωπαϊκού λαγού στην περιοχή του Καυκάσου, σε συνδυασμό με τον χαρακτηρισμό του ως καταφύγιο για μεγάλο αριθμό ζωικών και φυτικών ειδών (Gerasimov et al. 1975 από Zimina 1978, Taberlet & Bouvet 1994, Taberlet et al. 1998, Manceau et al. 1999, Seddon et al. 2001, Orth et al. 2002, Seddon et al. 2002, Deffontaine et al. 2005, Sommer & Benecke 2005, Dubey et al. 2006), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο Καύκασος έπαιξε το ρόλο καταφύγιου και για τον Ευρωπαϊκό λαγό, συμβάλλοντας στη διαφοροποίηση των δύο μεγάλων κλάδων. Η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί είτε κατά την παραμονή του είδους στα καταφύγια αυτά είτε κατά την αποχώρησή του από αυτά και την επιλογή διαφορετικών, από τον κάθε κλάδο, μεταναστευτικών οδών προς την Ευρώπη. Γνωρίζοντας ωστόσο ότι ο Καύκασος χαρακτηρίζεται από πολλές κορυφές μεγάλου υψομέτρου (μέγιστο υψόμετρο 5.633 μέτρα, Zimina 1978), καθώς και από περιοχές με έντονα διαφοροποιημένες συνθήκες, η διαφοροποίηση των δύο τύπων mtDNA είναι πιθανό να πραγματοποιήθηκε κατά την απομόνωση του προγονικού πληθυσμού σε περιοχές του Καυκάσου (καταφύγια), οι οποίες έπαψαν να επικοινωνούν μεταξύ τους, εξαιτίας των δυσμενών συνθηκών της Παγετώδους περιόδου που ακολούθησε. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι κατά τις Παγετώδεις περιόδους του Τεταρτογενούς, το ορεινό τμήμα του βόρειου Καυκάσου καλύπτονταν από παγετώνες, που σκέπαζαν τις κορυφές του και εκτεινόταν μέχρι τα όρια των Ευρωπαϊκών πεδιάδων, χωρίς ωστόσο να τις καλύπτουν. Αποτέλεσμα αυτού ήταν η συνεχής ύπαρξη ενός χερσαίου κομματιού, που δεν καλύπτονταν από πάγο, εκτεινόταν από τις περιοχές του Καυκάσου μέχρι το νοτιότερο τμήμα του παγετώνα της Ευρώπης (Fennoscandinavian) (Εικόνα 3.8) και χαρακτηριζόταν πιθανώς από συνθήκες ευνοϊκές για την επιβίωση πολλών ζωικών και φυτικών οργανισμών (Zimina 1978, Hewitt 2000, Bhagwat & Willis 2008). Συνεπώς, υποθέτουμε την εποίκιση του Καυκάσου από μια προγονική μορφή του *L. europaeus* και στη συνέχεια την απομόνωση και διαφοροποίηση των πληθυσμών που κατανέμονταν στις βόρειες παρυφές από αυτούς που κατανέμονταν στις νότιες, εξαιτίας των παγετώνων. Μετά το πέρας της Παγετώδους περιόδου, οι κλιματολογικές συνθήκες ευόησαν την διασπορά των διαφοροποιημένων πια ομάδων, που εποίκησαν την Ευρώπη ακολουθώντας διαφορετικά μεταναστευτικά μονοπάτια. Η ομάδα από τις νότιες παρυφές του Καυκάσου κινήθηκε προς τη Δύση διασχίζοντας περιοχές νότια της Μαύρης Θάλασσας, δίνοντας γένεση στον ανατολικό κλάδο, ενώ η ομάδα του βόρειου τμήματος του Καυκάσου προσέγγισε την Ευρώπη από περιοχές βόρεια της Μαύρης Θάλασσας και διαφοροποιήθηκε σε αυτό που ονομάζουμε σήμερα δυτικό τύπο. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η Μαύρη Θάλασσα, όσο και η θάλασσα του Μαρμαρά διατηρούσαν σημαντικό όγκο νερού κατά τη διάρκεια των παγετώνων, ενώ οι διακυμάνσεις της στάθμης τους ήταν μικρότερου βαθμού και όχι απόλυτα συγχρονισμένες με αυτές που παρατηρήθηκαν στην Ανατολική Μεσόγειο (Aksu et al. 1999). Η προγενέστερη χρονικά διαφοροποίηση του «ανατολικού» τύπου (βλέπε χρόνους απόσχισης) σε σχέση με το δυτικό μπορεί να ερμηνευθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι α)

οι περιοχές νότια του Καυκάσου και της Μαύρης Θάλασσας χαρακτηρίζονταν από ηπιότερες κλιματολογικές συνθήκες σε σχέση με τις περιοχές βόρεια αυτών, β) η διασπορά προς την Ευρώπη μέσω των περιοχών βόρεια της Μαύρης Θάλασσας εμποδίζονταν από τα στρώματα πάγου (ice sheet) και το μόνιμα παγωμένο έδαφος (permafrost) που εκτεινόταν ως τις περιοχές αυτές (Hewitt 2000, Bhagwat & Willis 2008) και γ) η μετάβαση από τις Μεσοπαγετώδεις στις Παγετώδεις περιόδους δεν ήταν συγχρονισμένη για τις περιοχές ολόκληρου του πλανήτη (η μετάβαση σχετιζόταν με το τοπικό περιβάλλον και την ιστορία της κάθε περιοχής). Σύμφωνα με τις μεταβολές στη σύνθεση των ειδών, η προηγούμενη Μεσοπαγετώδης περίοδος ολοκληρώθηκε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές για τις περιοχές της βόρειας και νότιας Ευρώπης (Tzedakis 2003, Tzedakis *et al.* 2003a). Επομένως, η επέκταση του νότιου κλάδου θα μπορούσε να ήταν ταχύτερη από αυτή του βόρειου, αφού ο πρώτος συνάντησε λιγότερα εμπόδια στην προς τη Δύση διασπορά του.

Η διαφοροποίηση του «ανατολικού» τύπου συμπίπτει με το πέρασμα από τη μεσοπαγετώδη περίοδο, που ακολούθησε τη Γκύντζιο στην επόμενη Παγετώδη περίοδο, κατά



Εικόνα 3.8 Περιοχές της Ευρώπης που καλύπτονταν από στρώμα πάγου (ice sheet) κατά τις Παγετώδεις περιόδους του Πλειστοκαίνου (διαγραμμισμένες περιοχές). Κατά τη διάρκεια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου, το μεγαλύτερο τμήμα της βόρειας και δυτικής Ευρώπης καλύπτονταν από μόνιμα παγωμένο έδαφος (ανοιχτό γκρι), ενώ οι νότιες χερσόνησοι της Ευρώπης (σκούρο γκρι) έδρασαν ως καταφύγια για έναν μεγάλο αριθμό ειδών. Οι κουκίδες αντιστοιχούν στη διαβάθμιση των καταφυγίων που υπήρξαν στον βορρά και σχετίζονται με τις περιβαλλοντικές διαβαθμίσεις βορρά-νότου. Τα βέλη είναι ενδεικτικά των ακόμα βορειότερων περιοχών που έδρασαν ως καταφύγια για μεγάλο αριθμό ειδών (Bhagwat & Willis 2008).

την οποία κατάφερε πιθανώς να επιβιώσει σε καταφύγιο/α της Ανατολίας. Αν και δεν έχουμε στην κατοχή μας δείγματα λαγών από περιοχές της Μικράς Ασίας για να μπορέσουμε να επιβεβαιώσουμε τον μιτοχονδριακό τύπο στον οποίο ανήκουν, η στενή σχέση (και πιθανή γονιδιακή ροή) πληθυσμών της Ανατολίας με πληθυσμούς του Ισραήλ (Sert *et al.* 2005) και ο «ανατολικός» τύπος mtDNA που παρατηρείται στο άτομο του Ισραήλ (Kasapidis *et al.* 2005,

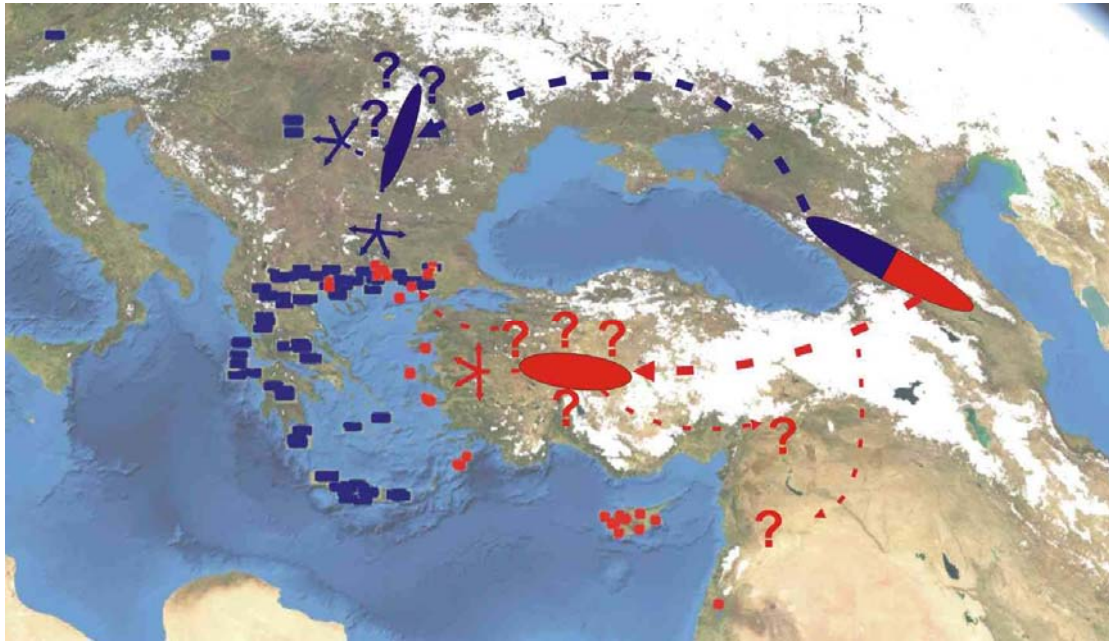
παρούσα μελέτη), αυξάνει την πιθανότητα τα άτομα της Ανατολίας να είναι και αυτά «ανατολικού» τύπου. Επιπρόσθετα οι λαγοί της Ανατολίας, σύμφωνα με τη μελέτη των Sert et al. (Sert et al. 2005), παρουσιάζονται πιο συγγενικοί με τους Ελληνικούς πληθυσμούς από ότι με τους υπόλοιπους Ευρωπαϊκούς που αναλύθηκαν. Η έλλειψη ωστόσο δειγμάτων και λεπτομερούς πληροφορίας για τα καταφύγια της Ανατολίας, καθώς και των συνθηκών που επικρατούσαν σε αυτά, δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για το κατά πόσο η διαφοροποίηση που παρατηρείται σήμερα εντός του «ανατολικού» τύπου οφείλεται α) στην παραμονή του σε πολλαπλά καταφύγια της Ανατολίας ή β) στη μετέπειτα διασπορά του σε περιοχές κατά μήκος της Μικράς Ασίας και των νησιών του Ανατολικού Αιγαίου, τα οποία, ως γνωστό, κατά τη διάρκεια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου αποτελούσαν μια ενιαία χερσαία μάζα (Perissoratis & Conispoliatis 2003). Τέλος, η εποίκιση της βορειοανατολικής Θράκης και της Ευρωπαϊκής Τουρκίας από τον «ανατολικό» κλάδο είναι πιθανό να έγινε μέσω των στενών των Δαρδανελίων ή/και του Βοσπόρου, τα οποία κατά τις Παγετώδεις περιόδους, συνιστούσαν γέφυρες ξηράς που συνέδεαν τις εκατέρωθεν περιοχές (Aksu et al. 1999, Perissoratis & Conispoliatis 2003).

Η διαφοροποίηση που παρατηρείται εντός του «δυτικού» τύπου εκτιμάται περίπου στα 380.000 χρόνια πριν από σήμερα, δηλαδή στο όριο μετάβασης της τέταρτης στη σειρά μεσοπαγετώδους-παγετώδους περιόδου. Σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση αυτού φαίνεται να έπαιζαν διάφορα καταφύγια της νότιας και ανατολικής Ευρώπης, όπως τα Καρπάθια, που έχουν αποδεδειγμένα αποτελέσει καταφύγιο για έναν μεγάλο αριθμό ειδών (Taberlet & Bouvet 1994, Taberlet et al. 1998, Seddon et al. 2001, Seddon et al. 2002, Sommer & Benecke 2005, Dubey et al. 2006). Η στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των δειγμάτων που προέρχονται από τη Σερβία, τη Γερμανία και την Αυστρία σε σχέση με τα υπόλοιπα άτομα του δυτικού τύπου, καθώς και η έλλειψη διακριτότητας των λαγών της Βουλγαρίας από αυτούς της Ελλάδας θα μπορούσε να είναι ενδεικτική των διαφορετικών κυμάτων εποίκισης που ξεκίνησαν από το καταφύγιο ή τα καταφύγια των Καρπαθίων. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα η περιοχή αυτή, κατά τη διάρκεια της τελευταίας μεσοπαγετώδους περιόδου, καλυπτόταν από δάση που εκτεινόταν (με ασυνεχές πιθανώς πρότυπο) μέσω των βόρειων περιοχών της Μολδαβίας έως τις περιοχές γύρω από τα Καρπάθια και την Ουγγαρία (Berger 1992, Zagwijn 1992, Willis et al. 2000, Sommer & Benecke 2005). Σύμφωνα επίσης με το αρχείο των απολιθωμάτων, η πρώτη εμφάνιση του είδους *L. europaeus* σε περιοχές της ανατολικής Γερμανίας εκτιμάται κατά τη Ρίσσιο-Βούρμιο μεσοπαγετώδη, δηλαδή μετά την υποχώρηση του στρώματος από πάγο (Saalian), περίπου 100.000-130.000 χρόνια πριν από σήμερα (van Kolfschoten 2000). Η χρονική αυτή περίοδος έπεται του εκτιμώμενου (βλέπε παραπάνω) χρόνου διαφοροποίησης του δυτικού κλάδου, υποστηρίζοντας την υπόθεση της ύπαρξης καταφυγίων για τον Ευρωπαϊκό λαγό στην οροσειρά των Καρπαθίων.

Η υπόθεση ύπαρξης πολλαπλών καταφυγίων για τους λαγούς στην περιοχή των Καρπαθίων και η εποίκηση από αυτά διαφορετικών περιοχών της Ευρώπης (π.χ. άλλο καταφύγιο εποίκησε την περιοχή της Βουλγαρίας και άλλο τις περιοχές της Σερβίας και της Γερμανίας) ερμηνεύει σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών βάσει αλλοενζύμων και mtDNA-RFLPs (Suchentrunk *et al.* 2000 και Vara *et al.* 2002, Djan *et al.* 2006 αντιστοίχως). Επιπρόσθετα, η εποίκηση κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους από καταφύγια βόρειων και ανατολικών περιοχών είναι πιο πιθανή για είδη ζώων που διαθέτουν προσαρμογές που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν σε ανοικτά ενδιαιτήματα και ως εκ τούτου θα επηρεάζονται λιγότερο από την εξαφάνιση των δασικών περιοχών κατά τις Παγετώδεις περιόδους του Τεταρτογενούς από ότι άλλα είδη που δεν διαθέτουν τις προσαρμογές αυτές (Deffontaine *et al.* 2005).

Το γεγονός αυτό δεν θα πρέπει σε καμία περίπτωση να θεωρηθεί ότι μειώνει τη σημαντικότητα της Βαλκανικής ως καταφύγιο κατά τις Παγετώδεις περιόδους. Το ποσοστό ωστόσο της γενετικής δεξαμενής της Ελλάδας που εποίκησε την κεντρική Ευρώπη δεν είναι γνωστό. Η ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από αντιπροσωπευτικές περιοχές της Ευρώπης θα μπορούσε να απαντήσει στο ερώτημα αυτό.

Η υποθετική αλληλουχία γεγονότων που αναφέρθηκε παραπάνω για την ερμηνεία του παρατηρούμενου προτύπου διαφοροποίησης του Ευρωπαϊκού λαγού της Βαλκανικής (**Εικόνα 3.9**) είναι αντίστοιχη με Πλειστοκαινικά πρότυπα διασποράς που έχουν παρατηρηθεί σε πολλά είδη θηλαστικών με εξίσου πρόσφατη ιστορία. Παραδείγματα αποτελούν είδη του γένους *Mus* (*Mus macedonicus* και *Mus spicilegus*, Orth *et al.* 2002), ο σκαντζόχοιρος *Erinaceus concolor* (Seddon *et al.* 2001, Seddon *et al.* 2002), η μυγαλή *Crocidura suaveolens* (Dubey *et al.* 2006), η αρκούδα *Ursus arctos* (Taberlet & Bouvet 1994, Taberlet *et al.* 1998, Sommer & Benecke 2005), είδη του γένους *Capra* (Manceau *et al.* 1999) και ο κοκκινόραχος μικρόωτος ποντικός ή δασοσκαπτοποντικός *Clethrionomys glareolus* (Deffontaine *et al.* 2005).



Εικόνα 3.9 Σχηματική απεικόνιση του πιθανού σεναρίου διαφοροποίησης και επέκτασης των δύο μιτοχονδριακών τύπων λαγού. Με κόκκινο παρουσιάζεται ο «ανατολικός» και με μπλέ ο «δυτικός» τύπος.

Ζώνη επαφής

Όσον αφορά στο γεωγραφικό πρότυπο της συνύπαρξης των δύο μιτοχονδριακών τύπων στην περιοχή της βορειοανατολικής Ελλάδας, η υπόθεση που μπορεί να διατυπωθεί είναι η ακόλουθη. Όπως διαπιστώθηκε από την παρουσία των γενετικών φραγμάτων (**Εικόνα 3.4**), η κατανομή του «ανατολικού» τύπου παρουσιάζεται διακεκομμένη και όχι ενιαία αφού οι απλοτύποι του παρατηρούνται α) στα σύνορα της Ελλάδας με την Ευρωπαϊκή Τουρκία, β) σε μια χερσαία ζώνη που περιβάλλεται από τον ορεινό όγκο της Ροδόπης και γ) σε δύο περιοχές του νομού Θεσσαλονίκης. Στις περιοχές ενδιάμεσα αυτών που προαναφέρθηκαν, παρατηρούνται μόνο λαγοί «δυτικού» τύπου. Η εύρεση δύο απλοτύπων «ανατολικού» τύπου στα σύνορα της Ελλάδας με την Ευρωπαϊκή Τουρκία είναι ενδεικτική της ύπαρξής τους στο τμήμα αυτό, χωρίς ωστόσο να γνωρίζουμε αν από αυτή απουσιάζει ο «δυτικός» τύπος ή απαντάται σε χαμηλότερες συχνότητες.

Σύμφωνα με πολυάριθμες γεωλογικές μελέτες ήταν πολλές οι περιπτώσεις εκείνες κατά τις οποίες οι οροσειρές της Μεσογείου καλύπτονταν από παγετώνες κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου (Hughes *et al.* 2007 και εκεί αναφορές). Ο Tzedakis και οι συνεργάτες του (Tzedakis *et al.* 2003b, Tzedakis *et al.* 2006) αναλύοντας τη χρονοστρωματογραφία και τις τάσεις που παρουσίαζε η βλάστηση στη λεκάνη απορροής στους Φιλίππους (τμήμα της εσωτερικής πεδιάδας της Δράμας που περιβάλλεται από το όρος Παγγαίο στα νότιο-νοτιοδυτικά, τη Λεκάνη στα βορειοδυτικά και το Φαλακρό στα βόρεια) απέδειξαν ότι τα τελευταία 1,35 εκ. χρόνια οι οροσειρές της ευρύτερη περιοχής μελέτης καλύπτονταν από παγετώνες, οι

οποίοι οδήγησαν στον περιορισμό της δασώδους έκτασης της περιοχής. Η σφοδρότερη περίοδος αυτών εκτιμήθηκε περίπου 427.000-474.000 χρόνια πριν από σήμερα και επηρέασε ολόκληρη τη βόρεια και ανατολική Ευρώπη. Ωστόσο ακόμα και οι μικρότερης ισχύος περιπτώσεις, ήταν αρκετές φορές τόσο δριμυιές, που προκαλούσαν συστολές πληθυσμών της νότιας Ευρώπης (Tzedakis *et al.* 2006). Μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη βλάστηση διαφόρων περιοχών σχετίζονται άμεσα με τα εκάστοτε τοπικά περιβαλλοντικά καθεστάτα (Tzedakis 2000) και τους ιστορικούς παράγοντες της περιοχής (Tzedakis & Bennett 1995), ενώ συνιστούν σε μικρότερο βαθμό αποτέλεσμα επιρροών από πολύ απομακρυσμένες ως προς αυτά περιοχές (Tzedakis *et al.* 2003a).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να ερμηνεύσουν την τμηματική παρουσία λαγών «ανατολικού» τύπου στη βορειοανατολική Ελλάδα ως αποτέλεσμα της σφοδρής παγετώδους περιόδου που επηρέασε την περιοχή πριν από 427.000-474.000 χρόνια. Δεδομένου του χρόνου διαφοροποίησης του «ανατολικού» τύπου είναι πολύ πιθανό αυτός να εποίκισε τις περιοχές της ΒΑ Ελλάδας και Ευρωπαϊκής Τουρκίας πριν την προαναφερόμενη παγετώδη περίοδο και να συρρικνώθηκε κατά τη διάρκεια αυτής στις περιοχές που παρατηρείται σήμερα. Στην επακόλουθη επέκτασή του κατά τη μεσοπαγετώδη που ακολούθησε, ήρθε πιθανώς αντιμέτωπος με τον «δυτικό» τύπο, ο οποίος κατέβαινε από τον βορρά, οδηγώντας στο σημερινό πρότυπο κατανομής των δύο τύπων λαγού στην περιοχή.

Ένα ενδιαφέρον ερώτημα που παραμένει αναπάντητο είναι το κατά πόσο οι δύο αυτές διαφοροποιημένες ομάδες υβριδίζουν στη φύση και αν η διασπορά τους είναι εν εξελίξει στις μέρες μας ή αποτελεί μια παγειωμένη κατάσταση, η φύση της οποίας είναι δυναμική και βασίζεται στον μεταξύ τους ανταγωνισμό. Η ύπαρξη ανταγωνισμού μεταξύ των δύο τύπων mtDNA θα μπορούσε να ερμηνεύσει τις διαφορετικής φύσεως περιοχές που καταλαμβάνουν οι δύο αυτές ομάδες όταν βρεθούν σε συμπάτρια κατάσταση. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα ο «ανατολικός» τύπος περιορίζεται στις πεδινές περιοχές και ο «δυτικός» στις ορεινότερες. Αντίστοιχες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί για τα συμπάτρια είδη *L. europaeus* και *L. corsicanus* στην Ιταλία, όπου ο ενδημικός λαγός της Ιταλίας ζει σε περιοχές υψηλότερου υψομέτρου από τον Ευρωπαϊκό λαγό (Angelici *et al.* 2000). Πιθανή ερμηνεία σύμφωνα με τους συγγραφείς αποτελεί ο μηχανισμός δυναμικού διαχωρισμού των οικολογικών θώκων, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του διαειδικού ανταγωνισμού (Ricklefs 1980). Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη επιλογή των οικολογικών θώκων παύει να υφίσταται όταν τα είδη αυτά δεν είναι συμπάτρια, αφού παρατηρούνται τόσο σε μικρά όσο και σε μεγάλα υψόμετρα χωρίς να δείχνουν κάποια ιδιαίτερη προτίμηση. Αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση όπου οι πληθυσμοί του ορεσίβιου και του Ευρωπαϊκού λαγού είναι συμπάτριοι. Και σε αυτή την περίπτωση, ο Ευρωπαϊκός λαγός καταλαμβάνει περιοχές χαμηλότερου υψομέτρου από ότι ο ορεσίβιος (Flux 1981, Thulin 2003).

Εποίκιση των νησιών του Αιγαίου από τον Ευρωπαϊκό λαγό

Όσον αφορά στην παρουσία πληθυσμών Ευρωπαϊκού λαγού στα νησιά, δύο είναι οι πιθανοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να ερμηνευθεί. Για τα νησιά εκείνα που συνδέονταν με φυσικές γέφυρες ξηράς με τις γειτονικές σε αυτά ηπειρωτικές περιοχές, η πιθανότητα να εποικίστηκαν «φυσικά» είναι μεγάλη. Ωστόσο, τα νησιά τα οποία είναι απομονωμένα από τις ηπειρωτικές περιοχές για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από το χρόνο ύπαρξης του είδους στην περιοχή, όπως η Κύπρος και η Κρήτη, η εποικισή τους θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί α) φυσικά με την προϋπόθεση ότι τα άτομα λαγού κολύπησαν έως αυτά ή ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσουν ενδιάμεσους σταθμούς ξηράς μέχρι να φτάσουν σε αυτά και β) μέσω της μεταφοράς τους σε αυτά από τον άνθρωπο από διακριτούς γενετικά πληθυσμούς των γειτονικών ηπειρωτικών περιοχών.

Η εποίκιση των Ανατολικών νησιών του Αιγαίου μπορεί με μεγάλη βεβαιότητα να ειπωθεί ότι πραγματοποιήθηκε με φυσική διασπορά του είδους στις περιοχές αυτές. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται σήμερα μεταξύ των νησιών αυτών θα μπορούσε να οφείλεται α) στην διαφοροποίηση των πληθυσμών που έδρασαν ως πηγή για του νησιώτικους πληθυσμούς, β) στα αλληπάλληλα κύματα εποικίσις από την ηπειρωτική περιοχή εξαιτίας των συνεχών απομονώσεων και επανασυνδέσεων τους με την Μικρά Ασία κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου λόγω ευστατισμού και γ) στο νησιωτισμό των περιοχών αυτών (τυχαία γενετική παρέκκλιση, στενωπός, φαινόμενο ιδρυτή, φυσική επιλογή η οποία διαφέρει από νησί σε νησί). Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τη μελέτη των ακτογραμμών της Ελλάδας πριν από 21.500 χρόνια, σύμφωνα με την οποία η Θάσος και η Σαμοθράκη αποτελούσαν ψηλά βουνά της ηπειρωτικής περιοχής (1.225 μέτρα και 1.731 μέτρα αντιστοίχως), ενώ τα υπόλοιπα νησιά του ανατολικού Αιγαίου ενώνονται με τη Μικρά Ασία (Perissoratis & Conispoliatis 2003). Η έναρξη της ανόδου της στάθμης της θάλασσας προκάλεσε σταδιακή απομόνωση των νησιών από την ηπειρωτική περιοχή (ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του καθενός, όπως το ανάγλυφο της γύρω από αυτό περιοχής και τις εκάστοτε τεκτονικές κινήσεις) με τα νησιά Θάσος, Μυτιλήνη και Σάμος να αποκόπτονται τελευταία (Perissoratis & Conispoliatis 2003). Η καθυστερημένη, σε σχέση με τα υπόλοιπα νησιά, αποκοπή τους από την ηπειρωτική περιοχή είναι εμφανής και στα αποτελέσματα ανάλυσης του mtDNA της παρούσας μελέτης. Αναλυτικότερα, η Θάσος παρουσιάζεται πιο συγγενική με τη γειτονική σε αυτή ηπειρωτική περιοχή ενώ τα νησιά Μυτιλήνη και Σάμος πιο συγγενικά μεταξύ τους, αντικατοπτρίζοντας ουσιαστικά την για μεγαλύτερο χρόνο επικοινωνία των πληθυσμών τους με αυτούς της βόρειας Ελλάδας και της Μικράς Ασίας, αντίστοιχα, από ότι τα υπόλοιπα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου.

Όσον αφορά στους πληθυσμούς λαγού της Κρήτης και των Κυθήρων αυτό που μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα είναι ότι προήλθαν από πληθυσμούς της Πελοποννήσου με τους οποίους παρουσιάζουν και τη μεγαλύτερη εξελικτική συγγένεια. Δύο είναι οι πιθανοί

τρόποι με τους οποίους μπορεί να πραγματοποιήθηκε η εποίκιση των νησιών αυτών. Σύμφωνα με τον πρώτο, οι λαγοί έφτασαν μέσω της εκ προθέσεως μεταφοράς τους από τον άνθρωπο. Συνεπώς, η διαφοροποίηση που παρουσιάζουν οι λαγοί της Πελοποννήσου από αυτούς της Κρήτης (1,9%) και από αυτούς των Κυθήρων (2%) θα πρέπει να πραγματοποιήθηκε τα τελευταία 10.000 χρόνια και ως εκ τούτου θα χαρακτηρίζονταν από εξελικτικό ρυθμό ίσο με 190% και 200% αντιστοίχως ανά εκατομμύριο χρόνια. Λαμβάνοντας υπόψη τον εξελικτικό ρυθμό που εκτιμήθηκε για το είδος από τους Pierpaoli *et al.* (1999), ο οποίος ισούται με 12,4% ανά εκατ. χρόνια και είναι κατά πολύ μικρότερος από αυτόν που αναφέρθηκε βάσει της υπόθεσης ανθρωπόχωρης μεταφοράς του είδους, η πρώτη παρουσία του είδους στην Κρήτη θα μπορούσε να εκτιμάται περίπου στα 154.000 χρόνια πριν από σήμερα ενώ για τα Κύθηρα στα 162.000 χρόνια πριν από σήμερα. Επομένως εναλλακτικό σενάριο της παρουσίας του είδους στα νησιά αυτά αποτελεί η φυσική διασπορά του από τις ακτές της Πελοποννήσου έχοντας ως ενδιάμεσο σταθμό (stepping stone) τα Κύθηρα και τις γύρω από αυτό νησίδες, πορεία που ακολούθησαν αρκετά φυτοφάγα είδη θηλαστικών κατά τη διάρκεια του μέσου και ανωτέρου Πλειστοκαίνου. Η δεύτερη αυτή υπόθεση στηρίζεται επίσης και από ενδείξεις επικοινωνίας της Κρήτης (μέσω *stapping stones*) με την ηπειρωτική περιοχή κατά το κατώτερο και αρχή του μέσου αλλά ιδιαίτερα κατά το ανώτερο μέσο Πλειστόκαινο (Dermitzakis & De Vos 1987, Marra 2005), περίοδο που σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε εποίκιση του Ελλαδικού χώρου από τον «δυτικό» τύπο. Επιπλέον, ο λαγός αποτελεί φυτοφάγο θηλαστικό και ως εκ τούτου η φυσιολογία του δεν είναι απαγορευτική ως προς την εποίκιση περιοχών που χωρίζονται από υδάτινες μάζες, ιδιαίτερα όταν ενδιάμεσα αυτών παρουσιάζονται νησίδες ξηράς που χρησιμεύουν ως ενδιάμεσους σταθμούς ανάπαυσης και ανάκτησης δυνάμεων. Ωστόσο βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης δεν είναι δυνατή η απόρριψη ή η αποδοχή καμιάς υπόθεσης από αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Αντίστοιχες υποθέσεις μπορούν να διατυπωθούν και για την ερμηνεία της παρουσίας πληθυσμών λαγού στο νησί της Κύπρου. Πιθανή πηγή για τους πληθυσμούς του νησιού θα μπορούσαν να αποτελούν αυτοί που καταλάμβαναν τις γειτονικές ως προς το νησί περιοχές της Ανατολίας. Σύμφωνα με την παλαιογεωγραφική ιστορία του νησιού και την απουσία ενδείξεων προγενέστερης επικοινωνίας του μέσω φυσικών γεφυρών ξηράς με τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές (Marra 2005), η ανθρωπόχωρη μεταφορά του ίσως να μοιάζει πιο πιθανή. Ωστόσο η έλλειψη δειγμάτων από την Ανατολία δεν επιτρέπει τη διασαφήνιση της εξελικτικής ιστορίας του είδους στο νησί.

4.6 Ενδείξεις μετατοπίσεων πληθυσμών, διείσδυσης γονιδιώματος και διαχειριστικές πρακτικές

Διείσδυση γονιδιώματος (Introgression)

Η ανάλυση της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδρίου έδειξε ότι δεν υπάρχει ένδειξη διείσδυσης γονιδιώματος στα άτομα του Ευρωπαϊκού λαγού από άλλα είδη λαγόμορφων, που εντοπίζονται στην Ευρώπη. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από τη μελέτη των Ben Slimen *et al.* (2006), όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ελέγχου του mtDNA από το σύνολο των ειδών του γένους *Lepus*, που έχουν κατατεθεί στην βάση γενετικών δεδομένων GenBank. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τους πληθυσμούς του είδους στην Ιταλία, οι οποίοι δεν παρουσιάζουν ενδείξεις διείσδυσης γονιδιώματος από είδη του γένους της νότιας Ευρώπης και της Αφρικής (Pierpaoli *et al.* 1999). Η απουσία ένδειξης διείσδυσης γονιδιώματος από κάποιο είδος του γένους στον Ευρωπαϊκό λαγό της Βαλκανικής θα μπορούσε να οφείλεται στην εποίκιση από το είδος περιοχών στις οποίες απουσίαζαν άλλα είδη λαγόμορφων, δεδομένου ότι συμπάτριοι πληθυσμοί του είδους με άλλα είδη του γένους (π.χ. με το είδος *L. timidus* στη Σουηδία, Thulin *et al.* 1997, Thulin & Tegelstrom 2002) είναι δυνατό να υβριδίζουν. Στο φαινόμενο ωστόσο του υβριδισμού φαίνεται ότι δεν συμβάλλει μόνο η συμπάτρια κατάσταση δύο ειδών, αλλά και η πυκνότητά τους στην περιοχή (Thulin & Tegelstrom 2002).

Μετατοπίσεις πληθυσμών

Ο Ευρωπαϊκός λαγός αν και αποτελεί είδος που έχει μεταφερθεί εκτεταμένα από τον άνθρωπο από την αρχή της συνύπαρξής τους δεν παρουσιάζει ενδείξεις μετατοπισμένων πληθυσμών στα υπό μελέτη άτομα της Ελλάδας και της Κύπρου. Εξάιρεση αποτελούν οι λαγοί της Λευκάδας, οι οποίοι εμφανίζουν μεγαλύτερη γενετική συνάφεια με άτομα λαγού της Ιταλίας από ό,τι με λαγούς από τις υπόλοιπες περιοχές που μελετήθηκαν. Οι επιπτώσεις των δράσεων της εκ προθέσεως μετατόπισης ατόμων λαγού δεν φαίνεται να έχουν επηρεάσει, σε μεγάλο βαθμό, τις αυτόχθονες γενετικές δεξαμενές του είδους στον Ελλαδικό χώρο, όπως παρατηρούν και οι Mamuris *et al.* (2001) και Kasapidis *et al.* (2005). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται α) στην προσαρμογή των ατόμων σε διαφορετικούς τύπους ενδιαιτημάτων-βιότοπων, β) στις διαφορές στην στρατηγική αναπαραγωγής μεταξύ εκτρεφόμενων και αυτόχθονων πληθυσμών, γ) στην περιορισμένης έκτασης μετακίνηση των ατόμων ενός πληθυσμού και δ) στο μικρό ποσοστό εκτρεφόμενων ατόμων που καταφέρνουν να επιβιώσουν στη φύση μετά την απελευθέρωσή τους (Mamuris *et al.* 2001). Η απουσία ενδείξεων ανάμειξης αλλόχθονων γενετικών δεξαμενών για την πλειοψηφία των υπο μελέτη πληθυσμών επιβεβαιώνεται επίσης και από τα αποτελέσματα ανάλυσης πυρηνικού DNA (Αντωνίου 2002 και Κεφάλαιο IV).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Mamuris *et al.* (2001) δεν κατέστη δυνατή η εύρεση εκτρεφόμενων ατόμων στις γειτονικές περιοχές στις οποίες απελευθερώθηκαν, γεγονός που αποδόθηκε στη μικρή μεταξύ των περιοχών γονιδιακή ροή και επομένως στη, μικρών αποστάσεων, διασπορά των ατόμων. Αντίστοιχο αποτέλεσμα είχαν και οι απελευθερώσεις Ευρωπαϊκού λαγού στη Σικελία κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων (τουλάχιστον 10.000 άτομα μέχρι το 1995, Lo Valvo *et al.* 1997 από Angelici *et al.* 2000), οι οποίες μέχρι σήμερα δεν έχουν επιτύχει την εγκαθίδρυση του είδους στο νησί (Angelici *et al.* 2000).

Η αποτελεσματικότητα διαδικασιών αποκατάστασης πληθυσμών μέσω απελευθερώσεων αμφισβητείται επίσης και για περιοχές της ηπειρωτικής Ιταλίας (Angelici *et al.* 2000), όπου έχουν πραγματοποιηθεί κατά το παρελθόν, προκαλώντας την μείωση της πυκνότητας και ίσως την εξαφάνιση του υποείδους *L. e. meridiei*. Πιθανή αιτία αποτελεί ο υβριδισμός του με άτομα που είχαν εισαχθεί από περιοχές της βόρειας και ανατολικής Ευρώπης και της νοτίου Αμερικής (Αργεντινή, Ουρουγουάη). Στις δράσεις αυτές οφείλεται και η μείωση της πυκνότητας του ενδημικού είδους της Ιταλίας (*L. corsicanus*) πιθανώς λόγω δια-ειδικού ανταγωνισμού (Angelici 1995 από Angelici *et al.* 2000, Angelici & Luiselli 2001).

Το γεγονός ότι η επίδραση των μετατοπίσεων πληθυσμών λαγού στον Ελλαδικό χώρο, τουλάχιστον με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, δεν έχει επηρεάσει σε ανιχνεύσιμο βαθμό τις γενετικές δεξαμενές των αυτόχθονων πληθυσμών, δεν θα πρέπει να μας καθησυχάζει. Αντιθέτως, οι μετατοπίσεις και απελευθερώσεις λαγών θα πρέπει να σταματήσουν έτσι ώστε να διατηρηθούν ανέπαφα τα αυτόχθονα αποθέματα Ευρωπαϊκού λαγού της χώρας μας ιδιαίτερα μετά από τη διαπίστωση της ποικιλότητας την οποία φέρουν.

Διαχειριστικές πρακτικές - ορισμός Σημαντικών Εξελικτικών Μονάδων (ESUs)

Οι ορισμοί που αφορούν στην πληθυσμιακή διακριτότητα και το πώς αυτή γίνεται αντιληπτή στην πράξη με απώτερο σκοπό την άμεση εφαρμογή τους σε διαχειριστικές πρακτικές, αποτελούν δυναμικές εκφάνσεις των βιολογικών επιστημών και ως εκ τούτου μεταβάλλονται και ωριμάζουν παράλληλα με την εξέλιξη αυτών. Τα κριτήρια βάσει των οποίων ορίζονται οι εξελικτικά και επομένως διαχειριστικά σημαντικές μονάδες έχουν περάσει από ένα πιο θεωρητικό σε ένα πιο πρακτικό επίπεδο, το οποίο εκ των πραγμάτων δεν θα μπορούσε να είναι πολυπαραγοντικό, αλλά απλά να συμπεριλαμβάνει τις βασικότερες και τις πιο ισχυρά υποστηριζόμενες ενδείξεις της εποχής στην οποία διατυπώθηκαν. Οι πληθυσμιακές μονάδες που χρήζουν διαχείρισης θα πρέπει να ορίζονται με σαφήνεια βάσει των χαρακτηριστικών εκείνων που ενισχύουν την δυνητική επιβίωση του είδους (Crandall *et al.* 2000). Η αναγκαιότητα επομένως έγκειται στη διατήρηση της λειτουργικής ποικιλότητας, η οποία συνδέεται άμεσα με την ιστορική κληρονομιά που αυτή φέρει. Σε μια ολιστική προσέγγιση της έννοιας του είδους, η ταξινομική αυτή μονάδα συνίσταται από πληθυσμούς

με ποικίλα επίπεδα γονιδιακής ροής που εξελίσσονται μέσω της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης και της φυσικής επιλογής (Crandall *et al.* 2000). Αν και ένας τέτοιου είδους ορισμός αποτελεί μια πολυδιάστατη και επιθυμητή προσέγγιση του φυσικού πλούτου που διακρίνουμε γύρω μας που θα οδηγήσει στην ρεαλιστικότερη αντίληψη των μονάδων που χρήζουν διατήρησης, ωστόσο δεν είναι εφικτός, τουλάχιστον με τις μέχρι σήμερα γνώσεις μας. Όπως γίνεται και σε κάθε άλλο τομέα της επιστήμης έτσι και σε αυτόν της διαχείρισης, τα δεδομένα που παράγονται επηρεάζονται τόσο από τεχνικούς (π.χ. δειγματοληπτικός προγραμματισμός, εργαλεία που χρησιμοποιούνται προς την εύρεση απαντήσεων των ερωτημάτων που τίθενται), όσο και από θεωρητικούς (π.χ. μεθοδολογία ανάλυσης και υπάρχον θεωρητικό υπόβαθρο του τομέα της επιστήμης αυτής) παράγοντες, οι οποίοι αυτοσυντηρούνται και αυτόμεταβάλλονται ταυτόχρονα από την ανάδραση της εκθετικής αύξησης των γνώσεων και των συμπερασμάτων που προκύπτουν από αυτές.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα προαναφέρθηκαν, των δεδομένων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, των συμπερασμάτων που εξάχθηκαν βάσει της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε και των μέχρι σήμερα γνώσεων από διάφορες συνιστώσες των θετικών επιστημών, οι διαχειριστικές προεκτάσεις που μπορούν να διατυπωθούν για τον Ευρωπαϊκό λαγό είναι οι ακόλουθες:

- Οι δύο έντονα διαφοροποιημένες ομάδες λαγών που κατανέμονται σε περιοχές της Βαλκανικής και της Κύπρου αποτελούν «εξελικτικά σημαντικές μονάδες» (ESUs) σύμφωνα με τα κριτήρια που θέσπισε ο Moritz (1994), αφού είναι αμοιβαία μονοφυλετικές ως προς το μιτοχονδριακό τους DNA, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση ως προς το πυρηνικό τους DNA (Αντωνίου 2002).
- Η ύπαρξη γενετικής δομής εντός αυτών, η οποία είναι εντονότερη στο πυρηνικό DNA (μικροδορυφορικοί γενετικοί τόποι) και λιγότερο έντονη στο mtDNA, αποτελεί ένδειξη ύπαρξης πληθυσμών που συνδέονται με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής καθιστώντας τους λειτουργικά ανεξάρτητους και επομένως θεμελιώδεις διαχειριστικές μονάδες (Management Units, MUs) για τη λήψη κατάλληλων μέτρων για τη διατήρηση των ESUs που τις περιέχουν (Moritz 1994).
- Η διακριτότητα των δύο ομάδων λαγών είναι πολύ πιθανό να οφείλεται τόσο σε ιστορικούς όσο και σε σύγχρονους παράγοντες, η οποία παρατηρείται και σε οικολογικό επίπεδο (καταλαμβάνοντας διαφορετικούς τύπους ενδιαιτημάτων και φέροντας προσαρμογές, οι οποίες δεν παρατηρούνται σε άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, όπως οι ενδείξεις συνεχούς αναπαραγωγής των λαγών της Κρήτης) ικανοποιώντας έτσι τα κριτήρια των Crandall *et al.* (2000).
- Επιπρόσθετα, η παρουσία των ζωνών επαφής των δύο τύπων mtDNA σε συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, τα όρια της οποίας συμπίπτουν με συγκεκριμένα

γεωμορφολογικά χαρακτηριστικά, και η χωροταξική διακρίσιμότητα των δύο mtDNA τύπων λαγού στην περιοχή, επιβάλλει τη λήψη κατάλληλων μέτρων προστασίας τους, απαγορεύοντας δράσεις μετατοπίσεων που θα επιφέρουν ανάμειξη τους με αλλόχθονες γενετικές δεξαμενές με επακόλουθο την αλλοίωσή τους.

- Η περαιτέρω, ωστόσο, μελέτη ενός μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από το συνολικό εύρος κατανομής του είδους μέσω μοριακών και οικολογικών μεθοδολογιών κρίνεται απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση της εξελικτικής ιστορίας του είδους και της διασαφήνισης των μηχανισμών εκείνων που διαμόρφωσαν και επιδρούν στη δομή του, καθώς και τη θέσπιση πρακτικών οι οποίες θα εξασφαλίσουν τη επιβίωση του είδους, συμβάλλοντας στην διατήρηση της βιοποικιλότητας του πλανήτη.

Κεφάλαιο IV

Πληθυσμιακή δομή του Ευρωπαϊκού λαού στη Βαλκανική

1. Οι Μικροδορυφορικές αλληλουχίες ως γενετικός δείκτης

Τα τελευταία 20 χρόνια, οι μελέτες της πληθυσμιακής γενετικής έχουν συντελέσει σημαντικά στην κατανόηση των εξελικτικών διαδικασιών και της ιστορίας τόσο των πληθυσμών, όσο και των ειδών. Η πρόοδος που έχει επιτευχθεί σε θεωρητικό, αναλυτικό και μεθοδολογικό επίπεδο έχει επιφέρει ουσιαστικές αλλαγές στην έρευνα της πληθυσμιακής γενετικής, που έπαυσε να αποτελεί «πεδίο διαμάχης» μεταξύ μαθηματικών και θεωρητικών προβλέψεων και μετατρέπεται σε μια ολοένα και περισσότερο επεξηγηματική επιστήμη (Zhang & Hewitt 2003).

Αν και το mtDNA διαθέτει χαρακτηριστικά που το καθιστούν σχεδόν ιδανικό δείκτη σε μελέτες εξελικτικής και πληθυσμιακής γενετικής ενός μεγάλου αριθμού ειδών μεταζώων (Avisé *et al.* 1987, Moritz *et al.* 1987, Harrison 1989, Avisé 1991, Simon 1991), αποτελεί έναν και μόνο γενετικό τόπο. Αυτό ουσιαστικά δίνει τη δυνατότητα παρατήρησης της εξέλιξης μέσα από ένα και μόνο «παράθυρο» στο χρόνο, που αντανακλά τη μητριαρχική γενεαλογία των οργανισμών, η οποία θα μπορούσε κάλλιστα να είναι διαφορετική από αυτή των πληθυσμών ή των ειδών. Επιπλέον, το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος του mtDNA ισοδυναμεί με το ένα τέταρτο αυτού των πυρηνικών αυτοσωμικών αλληλουχιών, με αποτέλεσμα οι φυλογενετικές γραμμές του να χαρακτηρίζονται από πολύ ταχύτερο ρυθμό διαλογής γενεαλογιών (lineage sorting) και υψηλό ρυθμό εξαφάνισης αλληλομόρφων (Zhang & Hewitt 2003).

Τα άτομα ενός είδους, διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις αλληλουχίες DNA που φέρουν στο γονιδίωμά τους. Αυτή η γενετική ποικιλότητα μπορεί να μελετηθεί είτε σε γονιδιακό (γονίδια του ατόμου) είτε σε γονοτυπικό επίπεδο. Η «τύχη» μιας γενετικής αλλαγής στο χώρο και στο χρόνο επηρεάζεται από τη βιολογία και τις καταστάσεις μέσα από τις οποίες περνάει ένα άτομο, συμπεριλαμβανομένης της αναπαραγωγικής επιτυχίας, της μετανάστευσης, του πληθυσμιακού μεγέθους, της φυσικής επιλογής και των ιστορικών γεγονότων. Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται στην πληθυσμιακή γενετική διερευνούν τη σύνδεση μεταξύ των δημογραφικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν παραπάνω και της δομής της γενετικής ποικιλότητας (Smith & Wayne 1996, Burke *et al.* 1998 από Sunnucks 2000). Η εκτίμηση και ενσωμάτωση της γενετικής ποικιλότητας στα μοντέλα πληθυσμιακής γενετικής επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν στη βιολογία των οργανισμών. Διαδικασίες οι οποίες επηρεάζουν τα άτομα, συσσωρεύονται ως επιδράσεις στους πληθυσμούς των ατόμων και αυτό με τη σειρά του επιδρά στην ειδογένεση, ενώ

ανάλογες είναι οι επιδράσεις τους στις ανώτερες ιεραρχικά βιολογικές ομαδοποιήσεις. Επομένως, η μελέτη γενετικών δεικτών με κατάλληλους ρυθμούς εξέλιξης (βάσει των οποίων αποτυπώνονται διαφορετικά στάδια της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών), καθιστά δυνατή την ανάκτηση πληροφορίας σχεδόν για κάθε πληθυσμό και εξελικτική διαδικασία στην ιεραρχία της ζωής. Παράλληλα, η μελέτη πολυάριθμων γενετικών τόπων παρέχει τη δυνατότητα εφαρμογής ανεξάρτητων ελέγχων των υποθέσεων, με αποτέλεσμα η χρήση ενός μεγάλου αριθμού αυτών να παρουσιάζει εξαιρετική στατιστική ισχύ (Sunnucks 2000).

Η επιλογή της μεθόδου που αποκαλύπτει με επαρκή αξιοπιστία τα επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης και απαντά στα ερωτήματα που τίθενται αποτελεί πρόκληση για τον κάθε ερευνητή. Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που πραγματοποιούν ανασκόπηση της πλειοψηφίας των διαθέσιμων τεχνικών ανάλυσης γενετικών δεδομένων και των ερωτημάτων που μπορούν να αντιμετωπίσουν (Bossart & Prowell 1998, Cruzan 1998, Davies *et al.* 1999, Luikart & England 1999, Shoemaker *et al.* 1999, Sunnucks 2000, Manel *et al.* 2003, Beaumont & Rannala 2004, Pearse & Crandall 2004, Manel *et al.* 2005), απουσιάζουν αντίστοιχες μελέτες που να καθοδηγούν τους λιγότερο έμπειρους στην πιο πρακτική πλευρά της εφαρμογής των τεχνικών αυτών (Selkoe & Toonen 2006), κατατοπίζοντας τους παράλληλα ως προς τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται και τις συνέπειες που προκύπτουν από την απόκλιση των δεδομένων από αυτές. Επιπλέον, η ανάπτυξη ολοένα και καταλληλότερων θεωρητικών μοντέλων και εκτιμητριών, παραμένει η μεγαλύτερη πρόκληση έναντι της εκθετικής αύξησης παραγωγής δεδομένων πολυμορφισμών DNA σε επίπεδο πλέον γονιδιωμάτων, αλλά και μιας σχεδόν αντίστοιχης αύξησης υπολογιστικής ισχύος.

1.1 Τι είναι οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες

Οι μικροδορυφορικοί γενετικοί τόποι (Simple Sequence Repeats-SSR, Variable Number of Tandem Repeats-VNTR ή Short Tandem Repeats-STR) αποτελούν αλληλουχίες νουκλεοτιδικών επαναλήψεων (1-6 νουκλεοτίδια), οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλη συχνότητα στο πυρηνικό γονιδίωμα των περισσότερων ταξινομικών ομάδων που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Οι δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις αποτελούν την πλειοψηφία των μικροδορυφορικών τόπων. Ο αριθμός των επαναλήψεων ποικίλλει τυπικά από 5 έως 40, αν και υπάρχουν περιπτώσεις που έχει παρατηρηθεί και μεγαλύτερος αριθμός (Li *et al.* 2002).

Οι αλληλουχίες που περιέχουν μικροδορυφορικές επαναλήψεις μεταλλάσσονται συχνά μέσω «γλιστρημάτων» (replication slippage), καθώς και λαθών (proofreading errors) που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Αποτέλεσμα των παραπάνω διαδικασιών είναι η μεταβολή του αριθμού των επαναλήψεων και του μήκους της περιοχής αυτής (Eisen 1999). Η διαφορά των αλληλομόρφων ως προς το μήκος τους, επιτρέπει τον διαχωρισμό τους μέσω ηλεκτροφόρησης, γεγονός που καθιστά εφικτή την γονοτύπηση ενός μεγάλου αριθμού ατόμων για έναν μεγάλο αριθμό τόπων σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα και με

χαμηλό κόστος. Οι μικροδορυφορικοί τόποι χαρακτηρίζονται στην πλειοψηφία τους από υψηλούς μεταλλακτικούς ρυθμούς (από 10^{-2} μέχρι 10^{-6} μεταλλαγές ανά τόπο ανά γενεά, με μέσο όρο 5×10^{-4}), οι οποίοι οδηγούν σε υψηλά επίπεδα αλληλικής ποικιλότητας, τα οποία είναι απαραίτητα για γενετικές μελέτες που αφορούν στις διαδικασίες που δρουν σε οικολογική χρονική κλίμακα (Schlotterer 2000).

Πλεονεκτήματα χρήσης μικροδορυφορικών γενετικών τόπων

Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός γενετικών δεικτών, ο συνδυασμός των οποίων καθιστά εφικτή την προσέγγιση πληθώρας ερωτημάτων σε μελέτες μοριακής οικολογίας. Μεταξύ αυτών, οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού επιτρέπουν την απάντηση ερωτημάτων σε ακριβέστερη κλίμακα (Selkoe & Toonen 2006).

Η δημοτικότητα των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων δεν αποτελεί έκπληξη, αν λάβει κανείς υπόψη τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους. Αυτές οι απλές επαναληπτικές αλληλουχίες παρουσιάζονται διάσπαρτες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού (υψηλούς μεταλλακτικούς ρυθμούς), είναι συγκυρίαρχες υπακούοντας τους κανόνες Μενδελικής κληρονομικότητας και ακολουθούν πιθανά απλά πρότυπα εξέλιξης (Zhang & Hewitt 2003). Ο κάθε γενετικός δείκτης μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μικρό δείγμα ολόκληρου του γονιδιώματος. Διάφορα φαινόμενα, όπως ο ανασυνδυασμός, η επιλογή και η τυχαία γενετική παρέκκλιση, έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικά γονίδια και διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος να χαρακτηρίζονται από διαφορετικές γενεαλογικές ιστορίες. Οπότε, η χρησιμοποίηση ενός και μόνο γενετικού τόπου στην εκτίμηση διαφόρων παραμέτρων των δεδομένων, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικό δειγματοληπτικό σφάλμα. Επομένως, η χρήση πολλαπλών δειγμάτων του γονιδιώματος μέσω του συνδυασμού των αποτελεσμάτων ενός μεγάλου αριθμού γενετικών τόπων, παρέχει μια περισσότερο αξιόπιστη, ακριβή και στατιστικά ισχυρή μεθοδολογία, βάσει της οποίας μπορεί να πραγματοποιηθεί η σύγκριση πληθυσμών, η εκτίμηση του ρυθμού μετανάστευσης, η διάκριση μεταξύ παμμυξίας και υψηλού ρυθμού μετανάστευσης, καθώς και η εκτίμηση του βαθμού συγγένειας μεταξύ των ατόμων (Selkoe & Toonen 2006).

Μειονεκτήματα χρήσης μικροδορυφορικών γενετικών τόπων

Οι κυριότεροι, μέχρι σήμερα, περιορισμοί της χρήσης των μικροδορυφορικών αλληλουχιών στις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής αφορούν στις περίπλοκες εξελικτικές σχέσεις που χαρακτηρίζουν τα αλληλόμορφα τους, στην ποικιλότητα των μεταλλακτικών ρυθμών τόσο μεταξύ των ταξινομικών ομάδων, όσο και μεταξύ των γενετικών τόπων, στην εξακρίβωση της επιλεκτικής τους ουδετερότητας και, τέλος, στην αδυναμία απόδοσης των

γενεαλογικών προτύπων των εξελικτικών σχέσεων, εξαιτίας της ασαφούς (αμφιλεγόμενης) πληροφορίας που περιέχουν ως προς τις προγονικές μορφές αυτών (Zhang & Hewitt 2003). Η μεταλλακτική διαδικασία των μικροδορυφορικών χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό πολυπλοκότητας (Schlotterer 2000, Beck *et al.* 2003, Ellegren 2004). Αν και για έναν μεγάλο αριθμό οικολογικών εφαρμογών τους, η γνώση του μεταλλακτικού τους μηχανισμού δεν κρίνεται απαραίτητη εξαιτίας της μικρής ευαισθησίας που παρουσιάζει η πλειοψηφία των αναλύσεων σε αυτή (Neigel 1997), αντιθέτως οι στατιστικές αναλύσεις, που βασίζονται σε εκτιμήσεις αλληλικών συχνοτήτων (π.χ. F_{ST} και R_{ST}), επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το μοντέλο μεταλλαγής που χρησιμοποιείται (Selkoe & Toonen 2006).

Η διάκριση των αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων βάσει του μεγέθους τους, αν και μειώνει σημαντικά το χρόνο και το κόστος μελέτης τους (σύγκριση κόστους γονοτύπησης με αυτό της αλληλούχησης του κάθε αλληλομόρφου), αγνοεί ουσιαστικά τα φαινόμενα ομοπλασίας (η συχνότητα της οποίας είναι υψηλή λαμβάνοντας υπόψη τον υψηλό μεταλλακτικό τους ρυθμό), αφού προϋποθέτει ότι η διάκριση των αλληλομόρφων βασίζεται μόνο σε διαφορές του μήκους τους. Στην πραγματικότητα η παρουσία αλληλομόρφων ίδιου μεγέθους που προέκυψαν όμως από διαφορετικές γενεαλογίες (δεν είναι ταυτόσημα εκ καταγωγής) είναι ένα αρκετά κοινό φαινόμενο που δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί. Το φαινόμενο αυτό έχει ως συνέπεια την υποεκτίμηση της αλληλικής ποικιλότητας των πληθυσμών και ενδέχεται να διογκώνει τις εκτιμήσεις του βαθμού γονιδιακής ροής, ιδιαίτερα σε καταστάσεις υψηλού μεταλλακτικού ρυθμού (Garza & Freimer 1996, Rousset 1996, Viard *et al.* 1998, Blankenship *et al.* 2002, Epperson 2005). Η ομοπλασία αποτελεί πηγή μικρού βαθμού μεροληψίας, ιδιαίτερα στις μελέτες εκείνες που περιορίζονται σε πληθυσμούς με πρόσφατη ιστορία ή μέτριο πληθυσμιακό μέγεθος, αφού ο βαθμός στον οποίο παρουσιάζεται είναι ανάλογος της γενετικής απόστασης δύο ατόμων ή πληθυσμών (Estoup *et al.* 2002). Συμπερασματικά, η χρήση τόπων υψηλού μεταλλακτικού ρυθμού μπορεί να αποβεί προβληματική στη μελέτη υψηλά διαφοροποιημένων ομάδων, όπως συνήθως παρατηρούνται στις φυλογενετικές μελέτες, (Estoup *et al.* 1995). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η αδυναμία ανίχνευσης του βαθμού ομοπλασίας, αποτελεί φαινόμενο το οποίο χαρακτηρίζει το σύνολο των γενετικών δεικτών (Selkoe & Toonen 2006).

Τέλος, αρκετές είναι οι περιπτώσεις εκείνες στις οποίες ο πολλαπλασιασμός μεσω PCR των αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων είναι προβληματικός. Βασική αιτία αποτελούν μεταλλαγές, οι οποίες πραγματοποιούνται στην περιοχή πρόσδεσης των εκκινητών, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός των αλληλομόρφων κάποιων ατόμων ή να είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός μόνο του ενός εκ των δύο (Paetkau & Strobeck 1995). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υποεκτίμηση του βαθμού ετεροζυγωτίας. Η μείωση του σφάλματος αυτού μπορεί να επιτευχθεί με την επανάληψη της γονοτύπησης για μικρό αριθμό ατόμων του δείγματος και την απομάκρυνση στη συνέχεια

εκείνων των τόπων που παρουσιάζουν προβλήματα κατά τον πολλαπλασιασμό τους. Η επίδραση της συχνότητας των μηδενικών αλληλομόρφων (αλληλομόρφων τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται) στις μετέπειτα αναλύσεις εξαρτάται από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται και την ευαισθησία της ως προς την παρουσία αυτών (Dakin & Avise 2004).

Γενικά συμπεράσματα ως προς τη χρήση μικροδορυφορικών τόπων

Η εισαγωγή των μικροδορυφορικών τόπων στις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη αποτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και την λεπτομερέστερη μελέτη της πρόσφατης εξελικτικής ιστορίας των πληθυσμών. Αν και η γνώση μας γύρω από αυτές τις απλές επαναληπτικές αλληλουχίες έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, απέχουμε αρκετά από την πλήρη κατανόησή τους, αφού ο αριθμός των μελετών, που ασχολούνται με την εξέλιξη των αλληλουχιών αυτών, είναι πολύ μικρός σε σχέση με τις μελέτες εφαρμογής αυτών. Ο τρόπος και το πρότυπο μοριακής εξέλιξης, καθώς και οι μηχανισμοί μεταλλαγής που χαρακτηρίζουν τις μικροδορυφορικές αλληλουχίες αποτελούν τομείς, που απαιτούν περαιτέρω μελέτη βάσει εκτεταμένων και συστηματικών αναλύσεων των αλληλουχιών τους. Η έλλειψη των βασικών αυτών γνώσεων εμποδίζει την εκμετάλλευση του συνόλου των δυνατοτήτων που παρέχει η χρήση των μικροδορυφορικών δεικτών, ενώ είναι πολύ πιθανό το ενδεχόμενο να υποβαθμιστεί ο ρόλος τους στις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής (Zhang & Hewitt 2003).

Συμπερασματικά, παρά το γεγονός ότι οι μικροδορυφορικοί δείκτες εμφανίζουν πολυάριθμα πλεονεκτήματα, χαρακτηρίζονται και από σημαντικά μειονεκτήματα, που δημιουργούν παγίδες οι οποίες πρέπει να αποφευχθούν για την πιο αξιόπιστη ανάλυσή τους. Ωστόσο, η προσαρμοστικότητα των μικροδορυφορικών στην αντιμετώπιση πολλών κατηγοριών ερωτημάτων, υπερκαλύπτει τα μειονεκτηματά τους, ενώ αρκετά προβλήματα που παρουσιάζονται κατά τη χρήση τους μπορούν να αποφευχθούν με την προσεκτική επιλογή των τόπων που θα χρησιμοποιηθούν στην εκάστοτε μελέτη (Selkoe & Toonen 2006).

1.2 Γενετική του τοπίου (Landscape Genetics)

Η κατανόηση των προτύπων της γονιδιακής ροής και των προσαρμογών σε τοπική κλίμακα, απαιτεί λεπτομερή γνώση του τρόπου με τον οποίο τα χαρακτηριστικά του τοπίου επιδρούν στην εξέλιξη των πληθυσμών. Τέτοιου είδους γνώση είναι καθοριστικής σημασίας, όχι μόνο για τη βελτίωση της μέχρι σήμερα οικολογικής γνώσης, αλλά και για την κατάλληλη διαχείριση της υπάρχουσας γενετικής ποικιλότητας (Manel *et al.* 2003).

Το ερευνητικό πεδίο της «γενετικής του τοπίου» αποτελεί ουσιαστικά τη συνένωση του πεδίου της πληθυσμιακής γενετικής με αυτό της οικολογίας του τοπίου (μελέτη αλληλεπιδράσεων των ατόμων ή πληθυσμών και των οικολογικών παραμέτρων της υπό μελέτη περιοχής) (Turner *et al.* 2001 από Manel *et al.* 2003). Ο τομέας αυτός έχει ως στόχο

την παροχή πληροφορίας που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση των χαρακτηριστικών του τοπίου και των μικρο-εξελικτικών διαδικασιών, όπως η γονιδιακή ροή, η τυχαία γενετική παρέκκλιση και η επιλογή. Συμβάλλει στην αναγνώριση δύσκολα εντοπιζόμενων ορίων, που αποτελούν είτε φράγματα στη μεταξύ των πληθυσμών γονιδιακή ροή (χωρίς να υπάρχει κάποια προφανής αιτία) είτε περιοχές δευτερογενούς επαφής μεταξύ πληθυσμών που έχουν απομονωθεί κατά το παρελθόν (ζώνες υβριδισμού). Η μελέτη της γενετικής του τοπίου είναι σε θέση να επιλύσει ερωτήματα πληθυσμιακής υποδιαίρεσης που παρατηρούνται σε ποικίλες γεωγραφικές κλίμακες ορίζοντας ακριβή ταξινομικά επίπεδα (Smouse & Peakall 1999). Διαφέρει, ωστόσο, από τις προσεγγίσεις της βιογεωγραφίας, που επικεντρώνεται κυρίως στα πρότυπα της ποικιλότητας των ειδών σε μία ευρύτερη χωρική και χρονική κλίμακα (Brown & Lomolino 1998). Τα δεδομένα της γενετικής του τοπίου συλλέγονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια σε σχέση με αυτά των φυλογενετικών μελετών και βοηθούν στην κατανόηση των μικρο-εξελικτικών διαδικασιών που διαμορφώνουν τη γενετική δομή μιας περιοχής (Manel *et al.* 2003).

Δύο βασικά βήματα της γενετικής του τοπίου είναι ο εντοπισμός της γενετικής ασυνέχειας και η συσχέτισή της με χαρακτηριστικά του τοπίου και των περιβαλλοντικών συνθηκών της περιοχής στην οποία παρατηρούνται (π.χ. φράγματα θα μπορούσαν να αποτελούν τα βουνά ή οι διαβαθμίσεις της υγρασίας). Ο εντοπισμός των γενετικών προτύπων στο χώρο απαιτεί τη συλλογή γενετικών δεδομένων από έναν μεγάλο αριθμό ατόμων (ή πληθυσμών), για τα οποία είναι γνωστή η ακριβής γεωγραφική τους θέση. Ιδανική περίπτωση αποτελεί ο ορισμός του ατόμου ως λειτουργική μονάδα μελέτης. Ο ορισμός αυτός μπορεί ωστόσο να επεκταθεί και στη χρήση των πληθυσμών (χρησιμοποιώντας τις αλληλικές συχνότητες) ως λειτουργικές μονάδες, με την προϋπόθεση ότι ένας μεγάλος αριθμός αυτών συμπεριλήφθηκε στη δειγματοληψία. Πλεονεκτήματα της χρήσης των ατόμων ως λειτουργικές μονάδες αποτελούν η αποφυγή της εν δυνάμει μεροληψίας στην εκ των προτέρων αναγνώριση πληθυσμών, καθώς και ο λεπτομερέστερος βαθμός της μελέτης. Μετά τη δειγματοληψία, πραγματοποιείται χρήση των εργαλείων της στατιστικής γενετικής και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της με τα χαρακτηριστικά του τοπίου ή τους οικολογικούς παράγοντες που κυριαρχούν στην περιοχή (Manel *et al.* 2003).

Σε έναν μικρό μόνο αριθμό μελετών καθίσταται εφικτή η ομαδοποίηση ατόμων στο χώρο και ο καθορισμός υποπληθυσμών ή δήμων (π.χ. ψαριών που ζουν σε νερολακκούβες μιας λίμνης ή πουλιά που φωλιάζουν σε νησιά ενός αρχιπελάγους). Στις περιπτώσεις αυτές, μέθοδοι, όπως ο δείκτης F_{ST} του Wright ή οι έλεγχοι αντιστοίχισης ατόμων σε πληθυσμούς (assignment tests), προτιμώνται έναντι άλλων πιο πολύπλοκων μεθοδολογιών. Ωστόσο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η εκ των προτέρων ομαδοποίηση των ατόμων δεν είναι εφικτή εξαιτίας της συνεχούς κατανομής τους στο χώρο. Στις περιπτώσεις αυτές η προσέγγιση της γενετικής του τοπίου είναι ανεκτίμητη (Manel *et al.* 2003). Σύμφωνα με

αυτή, τα γενετικά πρότυπα στο χώρο εκτιμώνται στο επίπεδο του ατόμου χωρίς τον εκ των προτέρων καθορισμό των πληθυσμών. Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στην αντίληψη του Wright περί περιοχών υψηλής γενετικής συνάφειας (γειτονιές - neighborhoods) σε πληθυσμούς με συνεχή κατανομή (Wright 1943). Σύμφωνα με αυτή, βασική μονάδα της πληθυσμιακής δομής είναι η γειτονιά, το μέγεθος της οποίας ορίζεται ως $4\pi D\sigma^2$, όπου D η πληθυσμιακή πυκνότητα και σ η τυπική απόκλιση της απόστασης μεταξύ του σημείου γέννησης ενός ατόμου και του σημείου γέννησης των απογόνων του (μέση απόσταση διασποράς μεταξύ γονέα και απογόνου). Το μέγεθος αυτό επιτρέπει την εκτίμηση των αποστάσεων διασποράς, στις περιπτώσεις εκείνες που είναι γνωστή η πυκνότητα του πληθυσμού (Wright 1943). Τέλος, από τη στιγμή που θα καθοριστεί ένα γενετικό πρότυπο, είναι δυνατός ο έλεγχος τυχόν συσχετίσεων που παρουσιάζονται με τις περιβαλλοντικές μεταβλητές ή τις μεταβλητές του τοπίου (Manel *et al.* 2003).

1.3 Μέθοδοι αντιστοίχισης (Assignment Methods)

Η πλειοψηφία των μοντέλων πληθυσμιακής γενετικής βασίζονται παραδοσιακά σε προϋποθέσεις ισορροπίας. Με άλλα λόγια, τα μοντέλα προσπαθούν να χαρακτηρίσουν μακροχρόνιες γενετικές διαδικασίες, οι οποίες βρίσκονται σε σταθερή ισορροπία μεταξύ αντιτιθέμενων εξελικτικών δυνάμεων. Αποτέλεσμα αυτού είναι τα γεγονότα που συμβαίνουν σε μικρή χρονική κλίμακα και που αποτελούν σημεία έντονου ενδιαφέροντος στις μέρες μας, να θεωρούνται ως «θόρυβος» των μοντέλων ισορροπίας (Manel *et al.* 2005).

Η μελέτη ωστόσο των πρόσφατων εξελικτικά γεγονότων μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ποικιλία γενετικών προσεγγίσεων, οι οποίες καλούνται «μέθοδοι αντιστοίχισης» (assignment methods, AMs) και αφορούν στατιστικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούν τη γενετική πληροφορία για την εξακρίβωση του κατά πόσο τα άτομα ή ομάδες ατόμων αποτελούν τμήμα ενός πληθυσμού. Βάσει αυτών, καθίσταται δυνατή η αντιμετώπιση των προβλημάτων της κατάταξης (classification) και της ομαδοποίησης (clustering) (Manel *et al.* 2005).

Τα προβλήματα κατάταξης χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό μεροληψίας, αφού αφορούν στην κατηγοριοποίηση των ατόμων σε ήδη προκαθορισμένες κατηγορίες, λαμβάνοντας υπόψη και περιπτώσεις απουσίας από το δείγμα ατόμων του/των πληθυσμών που έδρασαν ως πηγή. Αντιθέτως, τα προβλήματα ομαδοποίησης αποτελούν πρόκληση, αφού οι κατηγορίες δεν είναι προκαθορισμένες, αλλά εκτιμώνται από τα δεδομένα. Όταν η πληροφορία που σχετίζεται με τους πληθυσμούς που έδρασαν ως πηγές απουσιάζει, οι μέθοδοι ομαδοποίησης βασίζονται σε φαινόμενα ανισορροπίας σύνδεσης, η οποία είναι ισχυρή σε περιπτώσεις ανάμειξης ατόμων διαφορετικών πληθυσμών (Seber 1984, Nei & Li 1973, Maketa & Richardson 1976 από Manel *et al.* 2005). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι περιπτώσεις εκείνες στις οποίες οι συνεισφέροντες πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από

ισορροπία σύνδεσης, ουσιαστικά να αγνοούνται. Γνωρίζοντας ότι ο βαθμός ανισορροπίας εξαρτάται τόσο από την αναλογία ανάμειξης δύο πληθυσμών, όσο και από τη μεταξύ τους γενετική απόσταση (Waples & Smouse 1990), οι μέθοδοι ομαδοποίησης προσπαθούν να μειώσουν τον βαθμό ανάμειξης των ατόμων, δημιουργώντας ομάδες που χαρακτηρίζονται από το μικρότερο δυνατό βαθμό ανισορροπίας σύνδεσης (πληθυσμοί ή γενετικές δεξαμενές). Συμπερασματικά, οι μέθοδοι ομαδοποίησης μπορούν να απεικονίσουν τον αριθμό ομαδοποιήσεων στις οποίες διαχωρίζονται τα άτομα βάσει των γονοτύπων τους και να αντιστοιχήσουν παράλληλα τα άτομα σε αυτές, κυρίως μέσω της προσέγγισης Markov chain Monte Carlo (MCMC) (Manel *et al.* 2005).

Μειονεκτήματα των ελέγχων αντιστοίχισης αποτελούν η εξάρτηση της ορθότητας των αποτελεσμάτων τους από τον βαθμό πληθυσμιακής διαφοροποίησης των δεδομένων, το δειγματοληπτικό μέγεθος, τόσο ως προς τον αριθμό των ατόμων, όσο και των γενετικών τόπων, καθώς και το επίπεδο πολυμορφισμού των τόπων αυτών, μειονεκτήματα που καθιστούν δύσκολη την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Cornuet *et al.* 1999, Olsen *et al.* 2000). Επιπρόσθετα, μειονέκτημα αποτελεί η αδυναμία εντοπισμού «μεταναστών» με υψηλή στατιστική ισχύ, στις περιπτώσεις εκείνες που η διαφοροποίηση των πληθυσμών είναι μικρή. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα χαμηλά επίπεδα πληθυσμιακής διαφοροποίησης μπορούν να αντισταθμιστούν έως έναν βαθμό από την ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού ατόμων και γενετικών τόπων (Paetkau *et al.* 2004).

Ένας μεγάλος αριθμός θεωρητικών και εμπειρικών μελετών (Beerli 2004, Slatkin 2005) έχουν επαναφέρει στο προσκήνιο τις σοβαρές επιπτώσεις που επιφέρουν στις εκτιμήσεις σημαντικών παραμέτρων (π.χ. ο μεταναστευτικός ρυθμός, το πληθυσμιακό μέγεθος και η γενετική ποικιλότητα των υπό μελέτη πληθυσμών), οι αλληλεπιδράσεις των υπό μελέτη πληθυσμών με πληθυσμούς από τους οποίους δεν έχει πραγματοποιηθεί δειγματοληψία (πληθυσμοί «φαντάσματα», ghost populations). Για την εκτίμηση της φύσεως και του βαθμού πιθανής μεροληψίας που δημιουργείται από το φαινόμενο αυτό, απαιτείται η ύπαρξη ενός λειτουργικού ορισμού της έννοιας του πληθυσμού, ο οποίος δυστυχώς σήμερα απουσιάζει (Waples & Gaggiotti 2006).

1.4 Σκοπός της χρήσης μικροδορυφορικών αλληλουχιών στην μελέτη

Γνωρίζοντας τις κυριότερες ιδιότητες των μικροδορυφορικών τόπων και την ποιότητα της πληροφορίας που παρέχουν στις αναλύσεις της πληθυσμιακής γενετικής, στόχο της χρήσης τους στην παρούσα μελέτη αποτελεί η διερεύνηση της πρόσφατης εξελικτικής ιστορίας των πληθυσμών του Ευρωπαϊκού λαού στο χώρο της Βαλκανικής και η σύνδεσή της (εάν αυτό καταστεί δυνατό) με αυτή που αποκαλύφθηκε βάσει του mtDNA. Η χρήση των μικροδορυφορικών αλληλουχιών μπορεί να παρομοιαστεί με έναν άνθρωπο που πάσχει από μυωπία, ο οποίος αντιλαμβάνεται πολύ καλά (ίσως και καλύτερα από έναν υγιή) τα

αντικείμενα τα οποία βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από αυτόν, ενώ βλέπει θολά αντικείμενα τα οποία βρίσκονται σε πιο μακρινή απόσταση. Ο «βαθμός» μυωπίας του εξαρτάται από τον αριθμό και τα χαρακτηριστικά των μικροδορυφορικών τόπων που χρησιμοποιούνται και από το υπό ανάλυση δειγματοληπτικό μέγεθος. Αντιστοίχως, η ανάλυση τμημάτων του mtDNA, θα μπορούσε να παρομοιαστεί με έναν άνθρωπο που πάσχει από πρεσβυωπία (ή υπερ-μετρωπία) ο οποίος αν και μπορεί να διακρίνει καλύτερα τα αντικείμενα που βρίσκονται σε πιο μακρινή απόσταση από αυτόν, αδυνατεί να προσδιορίσει με σαφήνεια αυτά που βρίσκονται σε πολύ μικρή απόσταση. Συνεπώς, οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες αποτελούν ένα παράθυρο στον εξελικτικό χρόνο, η θέα από το οποίο αφορά μόνο το παρόν και το πρόσφατο παρελθόν, το οποίο είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την εξελικτική ιστορία του είδους. Ο εντοπισμός παλαιότερων διαδικασιών στη διάρκεια του εξελικτικού χρόνου είναι εφικτός μόνο στις περιπτώσεις εκείνες που ο βαθμός κορεσμού των μικροδορυφορικών τόπων το επιτρέπει.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή και αποθήκευση των δειγμάτων βασίστηκε στις ίδιες αρχές με αυτές που αναφέρονται για τα δείγματα του mtDNA (Κεφάλαιο III). Η ανάλυση ωστόσο βασίστηκε σε έναν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, όπως αυτό κρίνεται απαραίτητο σε τέτοιου είδους μελέτες. Οι δειγματοληπτικές θέσεις των υπό μελέτη δειγμάτων είναι οι ίδιες με αυτές που μελετήθηκαν στο Κεφάλαιο III, ενώ προστέθηκαν δείγματα από περιοχές της Ιταλίας και της Γαλλίας που συλλέχθηκαν αντίστοιχα από τις επιστημονικές ομάδες των Heidi Hauffe (Τμήμα Βιολογίας Πληθυσμών Studenec, Δημοκρατία της Τσεχίας) και F. Suchentrunk.

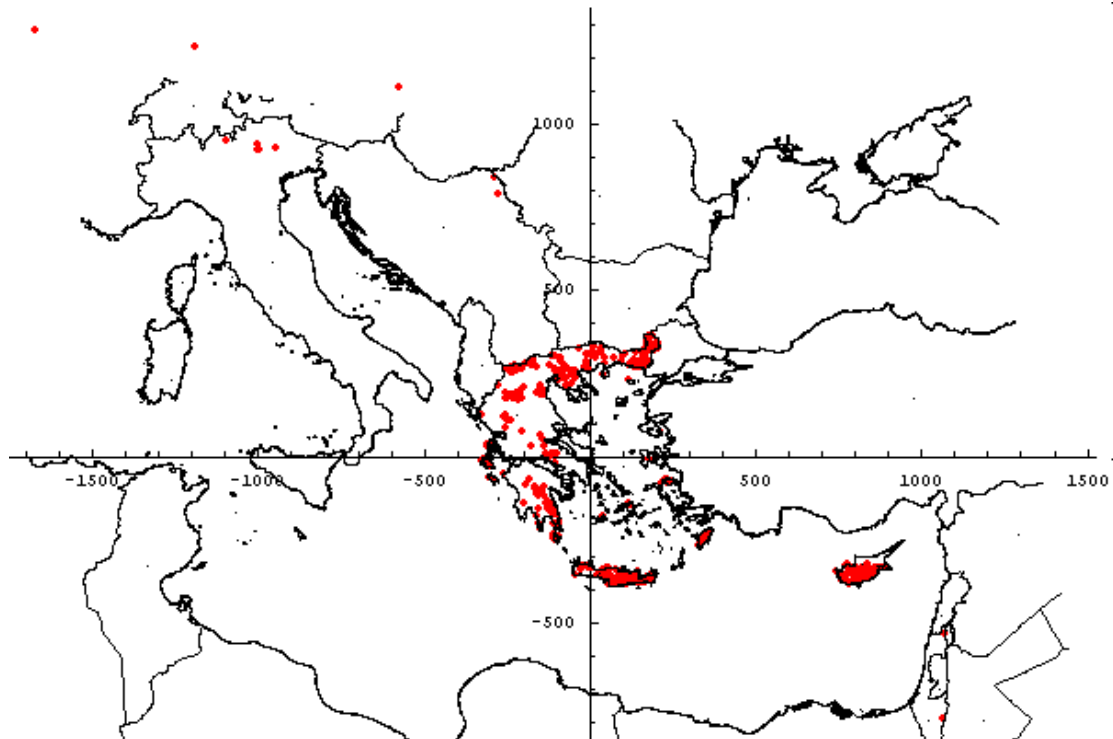
Ο συνολικός αριθμός των ατόμων που συμπεριλήφθηκε στις αναλύσεις των μικροδορυφορικών τόπων φτάνει τα 1610. Το σύνολο των δειγμάτων, με πληροφορία που αφορά στα χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος και στο γονότυπό τους ως προς τους 12 υπό μελέτη μικροδορυφορικούς τόπους, καταγράφηκε σε βάση δεδομένων, η χρήση της οποίας διευκόλυνε τον χειρισμό τους κατά τη διαδικασία της στατιστικής τους ανάλυσης. Η γεωγραφική κατανομή των δειγματοληπτικών θέσεων των ατόμων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4.1**. Στην εικόνα αυτή δεν παρουσιάζονται οι δειγματοληπτικές θέσεις 40 ατόμων από περιοχές της Βουλγαρίας, 8 ατόμων από περιοχές των συνόρων της Ελλάδας με τη Βουλγαρία και 8 ατόμων από περιοχές της Ελλάδας η ακριβής γεωγραφική προέλευση των οποίων είναι άγνωστη.

2.2 Εργαστηριακές αναλύσεις

Το σύνολο των εργαστηριακών αναλύσεων περιλαμβάνει συνοπτικά τα ακόλουθα:

- α) εξαγωγή και ποσοτικοποίηση ολικού γενωμικού DNA
- β) πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος του πυρηνικού DNA μέσω της τεχνικής της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) και

γ) προσδιορισμός των γονοτύπων των υπό μελέτη ατόμων σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχησης.



Εικόνα 4.1 Γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Από το χάρτη αυτό απουσιάζουν άτομα από περιοχές της Βουλγαρίας, και της Ελλάδας με ασαφή γεωγραφική προέλευση. Ο χάρτης αυτός δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Sundial με τη χρήση της γωνιομετρικής προβολής GIS σημείων πάνω σε επίπεδο. Κέντρο αυτής αποτελεί το κεντροειδές-κέντρο βάρους (σημείο τομής των αξόνων) των δειγματοληπτικών περιοχών (μονάδα μέτρησης αποτελεί το km).

2.2.1 Εξαγωγή και ποσοτικοποίηση ολικού γενωμικού DNA

Εξαγωγή και η ποσοτικοποίηση του ολικού γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς περιγράφεται και στο Κεφάλαιο III.

2.2.2 Πολλαπλασιασμός των μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Η εξελικτική διατήρηση των μικροδορυφορικών τόπων σε συγγενικά τάξα δίνει τη δυνατότητα χρήσης των εκκινητών που αναπτύχθηκαν σε ένα είδος, για τον πολλαπλασιασμό ομόλογων περιοχών DNA σε συγγενικά είδη (Andersson *et al.* 1999). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που έχουν αναπτυχθεί σε άλλα συγγενικά ως προς τον Ευρωπαϊκό λαγό είδη και πολλαπλασιάζουν επιτυχώς τον εκάστοτε επιθυμητό μικροδορυφορικό τόπο. Αναλυτικότερα, συνολικά μελετήθηκαν 12 μικροδορυφορικοί τόποι, οι μισοί εκ των οποίων αναπτύχθηκαν στο κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*, Rico *et al.* 1994, Mougel *et al.* 1997), ενώ οι υπόλοιποι 6 στο Αφρικανικό είδος *Lepus saxatilis* (Kryger *et al.*

2002). Τα ονόματα των μικροδορυφορικών αυτών τόπων και η σύνθεση των επαναλήψεων τους στα είδη για τα οποία αναπτύχθηκαν αρχικά παρατίθενται στον **Πίνακα 4.1**.

Πίνακας 4.1: Μικροδορυφορικοί τόποι που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Δίνεται η σύνθεσή τους ως προς το είδος στο οποίο αναπτύχθηκαν, οι κωδικοί πρόσβασης της αλληλουχίας των κλώνων τους, οι αλληλουχίες των εκκινητών τους και οι αντίστοιχες μελέτες στις οποίες περιγράφονται για πρώτη φορά. Σε παρένθεση δίπλα από όνομα κάθε μικροδορυφορικού τόπου, αναφέρεται η φθορίζουσα σήμανση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (F: FAM, T: TET, H: HEX).

Όνομα	Σύνθεση	Κωδικός Κλώνου	Αλληλουχία εκκινητή (5'>3')	Είδος στο οποίο αναπτύχθηκε	Αναφορά
Lsa1(F)	(CA) ₉ CT(CA) ₂	AF491762	F:CCT TGC AGG TTT TCA GCC TC R:GCT GTA GAA AAT GAG AGG GAC	<i>L. saxatilis</i>	Kryger <i>et al.</i> 2002
Lsa2(T)	(AC) ₁₃	AF491763	F:GGT ACT CTA TTA GGG AAC CCG R:GCT AGT TGC CAT TAG CTC CC	<i>L. saxatilis</i>	Kryger <i>et al.</i> 2002
Lsa3(F)	(AC) ₁₀	AF491764	F:TGC CTT AAA GGC TGA TTC TG R:GGA TAT CAA AGA ACA TGC CC	<i>L. saxatilis</i>	Kryger <i>et al.</i> 2002
Lsa4(H)	CA GA(CA) ₈	AF491769	F:CTG AGT GTA GTA TTT TCA GG R:GTG CCA TAT TCA TCT AAT GG	<i>L. saxatilis</i>	Kryger <i>et al.</i> 2002
Lsa6(T)	(AC) ₁₀	AF491766	F:CCT AAG ATG AAA TGG ATA AGT T R:CTC TTC TGT TTT CTG GAG CA	<i>L. saxatilis</i>	Kryger <i>et al.</i> 2002
Lsa8(H)	(GT) ₁₁	AF491768	F:AAG GTA TTA AAT TGG GCA CTC R:GAC TGA AAT TGA TGT GCT ACC	<i>L. saxatilis</i>	Kryger <i>et al.</i> 2002
SOL03(F)	(TC) ₁₄ (T) ₄ (TC) ₆	X79189	F:TAC CGA GCA CCA GAT ATT AGT TAC R:GTT GCC TGT GTT TTG GAG TTC TTA	<i>O. cuniculus</i>	Rico <i>et al.</i> 1994
SOL30(F)	(TC) ₁₄ A(T) ₄ (TC) ₅	X79215	F:CCC GAG CCC CAG ATA TTG TTA CCA R:TGC AGC ACT TCA TAG TCT CAG GTC	<i>O. cuniculus</i>	Rico <i>et al.</i> 1994
SAT02(H)	(TC) ₁₅ (TG) ₁₀	M77195	F:GCT CTC CTT TGG CAT ACT CC R:GCT TTG GAT AGG CCC AGA TC	<i>O. cuniculus</i>	Mougel <i>et al.</i> 1997
SAT05(T)	(TC) ₂₃ TTT(CT) ₅	X99887	F:GCT TCT GGC TTC AAC CTG AC R:CTT AGG GTG CAG AAT TAT AAG AG	<i>O. cuniculus</i>	Mougel <i>et al.</i> 1997
SAT08(T)	(CT) ₁₄ (GT) ₈ TT(GT) ₅	X99889	F:CAG ACC CGG CAG TTG CAG AG R:GGG AGA GAG GGA TGG AGG TAT G	<i>O. cuniculus</i>	Mougel <i>et al.</i> 1997
SAT12(H)	(CTAT) ₁₀	X99891	F:CTT GAG TTT TAA ATT CGG GC R:GTT TGG ATG CTA TCT CAG TCC	<i>O. cuniculus</i>	Mougel <i>et al.</i> 1997

Με στόχο την όσο το δυνατό πιο αξιόπιστη γονοτύπηση των μικροδορυφορικών τόπων, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR, τόσο ως προς τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται, όσο και ως προς το θερμοκρασιακό καθεστώς της αντίδρασης. Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες δίνονται στον **Πίνακα 4.2**.

Πίνακας 4.2: Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των επιμέρους αντιδραστηρίων και το θερμοκρασιακό καθεστώς της αντίδρασης PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών. Όπου Α: Lsa1, Lsa2, Lsa3, Lsa4, Lsa6, Lsa8 και Β: Sol03, Sol30, Sat02, Sat05, Sat08, Sat12.

Τελικές συγκεντρώσεις / αντίδραση PCR	Συνθήκες		
	Στάδιο	Θ°C	Χρόνος
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq : 1X MgCl ₂ : 1.5mM dNTPs: 0.3mM ^A , 0.15mM ^B	Προεπώαση	94°C	2'
	Αποδιάταξη	94°C	1'
Πρόσθιος (F) Εκκινητής: 0.4μM ^A 0.25μM ^B	Σύνδεση	Lsa1, Sat02, Sat12, Sat05: 55°C, Lsa2: 54°C, Lsa3: 56°C, Lsa4: 50°C, Lsa6: 51°C, Lsa8, Sol03: 52°C, Sol30: 49°C, Sat08: 58°C	1'
Ανάστροφος (R) Εκκινητής: 0.4μM ^A 0.25μM ^B Taq: 0.4 u Συνολικός όγκος: 10μl ^A 20μl ^B	Επιμήκυνση	72°C	1'
	Τελικό Βήμα	72°C	5'
	Κύκλοι	35	

2.2.3 Προσδιορισμός των γονοτύπων των υπό μελέτη ατόμων

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αυτόματου αναλυτή αλληλουχιών, ο οποίος έχει τη δυνατότητα του ταυτόχρονου διαχωρισμού 4 χρωστικών φθορισμού (BaseStation DNA Fragment Analyser, MJ Research). Ο προσδιορισμός του κατ' εκτίμηση μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα του κατασκευαστή Cartographer (v. 1.2.6, DNA Fragment Analysis Software). Το μέγεθος των αλληλομόρφων προσδιορίζεται αρχικά σε δεκαδικούς αριθμούς, οι οποίοι στη συνέχεια πρέπει να στρογγυλοποιηθούν σε ακέραιους με τέτοιο τρόπο ώστε να καταγράφεται το πραγματικό μέγεθος των αλληλομόρφων ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα σφάλματος.

Αν και οι μέθοδοι φθορισμού που χρησιμοποιούνται πλέον στη γονοτύπηση των αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων επιτρέπουν τον υψηλό βαθμό αυτοματοποίησης της συλλογής δεδομένων (και επομένως τη συλλογή δεδομένων από έναν μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων), η κατηγοριοποίηση των δεκαδικών μεγεθών των προϊόντων στα πραγματικά μεγέθη των αλληλομόρφων μέσω στρογγυλοποίησης, χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό δυσκολίας. Σφάλματα στη στρογγυλοποίηση των αλληλομόρφων μπορούν να προκύψουν σε διάφορα στάδια της διαδικασίας (π.χ. διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα των αλληλομόρφων, η οποία οφείλεται τόσο στο μήκος τους όσο και στη νουκλεοτιδική τους σύνθεση, μεταλλαγές στις εκατέρωθεν περιοχές των μικροδορυφορικών τόπων, στοχαστική ποικιλότητα περιβαλλοντικής θερμοκρασίας κ.α. (ανασκόπηση από τους Amos *et al.* 2006). Η ύπαρξη υψηλού ποσοστού σφάλματος στην

κατηγοριοποίηση των αλληλομόρφων μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα μέσω των αναλύσεων που θα ακολουθήσουν.

Στην προσπάθεια να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα κατηγοριοποίησης των αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα FLEXIBIN (Amos *et al.* 2006). Σύμφωνα με αυτό, η κατηγοριοποίηση (στρογγυλοποίηση) των αλληλομόρφων πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη την κινητικότητα τους ανά ομάδα ηλεκτροφόρησης (gel) και το πραγματικό μέγεθος των αλληλομόρφων (βάσει αλληλούχησης), ενώ παράλληλα πραγματοποιείται εκτίμηση όλων των πιθανών κατηγοριοποιήσεων με στόχο να επιλεγεί εκείνη με τη μικρότερη απόκλιση από το πραγματικό μέγεθος.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση μικρού αριθμού αλληλομόρφων για τους γενετικούς τόπους που εμφάνιζαν δυσκολίες στη γονοτύπηση τους. Αναλυτικότερα αλληλουχήθηκαν αλληλόμορφα των γενετικών τόπων SAT-12, Sol-03 και Sol-30. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, αν και ο SAT-12 αποτελείται από ένα τετρα-νουκλεοτιδικό πρότυπο επανάληψης, παρατηρήθηκαν αλληλόμορφα τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους κατά δύο μόνο νουκλεοτιδικές βάσεις (στην περιοχή των επαναλήψεων). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη δύο διακριτών εξελικτικών γραμμών, που χαρακτηρίζουν τον γενετικό αυτό τόπο, γεγονός που θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και να μελετηθεί εκτενέστερα σε επόμενες μελέτες. Οι αλληλουχίες που αφορούν τον τόπο Sol-03 έδειξαν ότι αποτελείται από δύο μικροδορυφορικούς τόπους που διαχωρίζονται μεταξύ τους από αλληλουχία 77 bp, αποτελώντας ουσιαστικά ένα “juxtaposed microsatellite system” (Estoup *et al.* 1999). Ο γενετικός τόπος Sol-30 αποτελεί τμήμα του “juxtaposed microsatellite system” που προαναφέρθηκε, συνιστώντας τον πρώτο στη σειρά μικροδορυφορικό τόπο του συστήματος αυτού. Γνωρίζοντας τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τέτοιου είδους συστήματα μικροδορυφορικών τόπων στη μελέτη ανάμειξης των πληθυσμών, καθώς και στις προσαρμογές που αυτοί έχουν αναπτύξει, κρίνεται απαραίτητη η μελλοντική μελέτη του συστήματος αυτού. Προϋποθέσεις αυτής της μελέτης θα πρέπει να αποτελούν η αλληλούχηση ενός μεγάλου αριθμού αλληλομόρφων, ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό του δεύτερου στη σειρά γενετικού τόπου (αφού ο πρώτος πολλαπλασιάζεται από τους εκκινητές Sol-30) και η ανάλυση των γονοτύπων τους με την χρήση κατάλληλης μεθοδολογίας (Estoup *et al.* 2000).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, οι μικροδορυφορικοί τόποι SAT-12 και Sol-03 αφαιρέθηκαν από τις στατιστικές αναλύσεις που ακολούθησαν.

2.3 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Μέχρι πρόσφατα, οι μελέτες της πληθυσμιακής γενετικής δομής βασίζονταν στον εκ των προτέρων ορισμό των πληθυσμιακών μονάδων από τον εκάστοτε ερευνητή και στην εκτίμηση της μεταξύ τους γονιδιακής ροής, βάσει των δεικτών F-statistics (του δείκτη F_{ST} ή

αντίστοιχων παραμέτρων). Ωστόσο, η παραπάνω μεθοδολογία χαρακτηρίζεται από αρκετά μειονεκτήματα, με κυριότερο την εξάρτηση της εκτιμώμενης πληθυσμιακής δομής από τις προϋποθέσεις που αφορούν τα όρια των πληθυσμών, ο καθορισμός και η αξιοπιστία των οποίων παραμένουν άγνωστα. Επιπλέον, μια τέτοιου είδους μεθοδολογία δεν είναι αρκετά πληροφοριακή στις περιπτώσεις που η περιοχή μελέτης είναι μικρή και ο δειγματοληπτικός σχεδιασμός δεν είναι ομαδοποιημένος (Coulon *et al.* 2006).

Φιλοσοφία των αναλύσεων της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η αμερόληπτη εκτίμηση της πληθυσμιακής δομής, που παρουσιάζει το υπό μελέτη είδος στο χώρο της Βαλκανικής. Η έλλειψη επαρκούς πληροφορίας, που σχετίζεται με την οικολογία και της ηθολογία του είδους, σε συνδυασμό με τη μεγάλη δυνατότητα μετακίνησής του και τις δράσεις μετατοπίσεων πληθυσμών του, έχει ως αποτέλεσμα η οποιαδήποτε προσπάθεια του εκ των προτέρων ορισμού των πληθυσμών του να εμπεριέχει υψηλό βαθμό σφάλματος (ως προς τις εκτιμήσεις διαφόρων γενετικών παραμέτρων). Ένα τέτοιου είδους ενδεχόμενο είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα, τα οποία με τη σειρά τους θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση αποτυχημένων διαχειριστικών πρακτικών με επιζήμια αποτελέσματα για το είδος. Στην προσπάθεια εκτίμησης του αριθμού και της γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμιακών μονάδων στις οποίες διακρίνονται τα υπό μελέτη άτομα, χωρίς των εκ των προτέρων ορισμό τους από τον χρήστη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μεθοδολογίες με τη βοήθεια των προγραμμάτων GENELAND και STRUCTURE, που περιγράφονται παρακάτω.

Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη τα προβλήματα που δημιουργούν οι πληθυσμοί φαντάσματα (“ghost populations”), δηλαδή πληθυσμοί που δεν έχουν συλληχθεί, στην εκτίμηση διαφόρων παραμέτρων των μοντέλων που χρησιμοποιούνται και ιδιαίτερα του μεγέθους των πληθυσμών και της μεταξύ τους γονιδιακής ροής (Beerli 2004, Slatkin 2005) και την έλλειψη μέχρι σήμερα μιας αποδεκτής λύσης του προβλήματος αυτού (Slatkin 2005), κρίθηκε σκόπιμο η εκτίμηση της πληθυσμιακής δομής του είδους να βασιστεί μόνο στο σύνολο των δεδομένων και όχι σε τμήμα αυτών.

2.3.1 Προϋποθέσεις των μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν

Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται στα προγράμματα STRUCTURE (v. 2.2, Pritchard *et al.* 2000) και GENELAND (v. 2.0.12, Guillot *et al.* 2005) θέτουν προϋποθέσεις, οι οποίες πρέπει να ληφθούν υπόψη προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν παρερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αν και οι βασικές τους προϋποθέσεις είναι κοινές και συνίστανται στην ισορροπία Hardy-Weinberg (HW) και στην ανισορροπία σύνδεσης (LD) μεταξύ των γενετικών τόπων εντός των πληθυσμιακών μονάδων που ορίζονται, η βαρύτητα που δίνεται σε αυτές από το κάθε πρόγραμμα είναι διαφορετική. Τα χαρακτηριστικά των δεδομένων επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό τη λειτουργία των προγραμμάτων αυτών, με αποτέλεσμα

αποκλίσεις των αποτελεσμάτων τους να μην θεωρούνται απίθανες. Αναλυτικότερα, το πρόγραμμα STRUCTURE δημιουργεί ομαδοποιήσεις βασισμένες στην παροδική ανισορροπία HW και LD, φαινόμενα τα οποία προκαλούνται από την ανάμειξη των πληθυσμών. Το πρόγραμμα ομαδοποιεί τα άτομα με τέτοιον τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η ανισορροπία HW και LD, με αποτέλεσμα η παρουσία τους στα δεδομένα να βελτιώνει την απόδοσή του. Αντιθέτως, σε περιπτώσεις ισχυρής ανισορροπίας παρατηρείται υπερεκτίμηση του αριθμού των ομαδοποιήσεων (Falush *et al.* 2003). Το μοντέλο ωστόσο στο οποίο βασίζεται το πρόγραμμα GENELAND λαμβάνει υπόψη τη γεωγραφική προέλευση των ατόμων, ενώ δεν αντιμετωπίζει με την ίδια βαρύτητα τις επιδράσεις φαινομένων ανισορροπίας σύνδεσης στη γενετική συσχέτιση των πληθυσμών (Kaeuffer *et al.* 2007). Αμφότερα τα παραπάνω προγράμματα προϋποθέτουν ότι οι αλληλικές συχνότητες ακολουθούν την κατανομή Dirichlet επιτρέποντας ουσιαστικά έναν βαθμό ομοιότητας των αλληλικών συχνοτήτων μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών (Pritchard *et al.* 2000, Guillot *et al.* 2005).

Βάσει των όσων ειπώθηκαν παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η αναγκαιότητα εκτίμησης του βαθμού σύνδεσης των γενετικών τόπων που χρησιμοποιούνται, με στόχο την αποφυγή αυτών που κρίνονται «ακατάλληλοι» ή «παραπλανητικοί». Σύμφωνα με τους Kaeuffer *et al.* (2007) ο συντελεστής συσχέτισης r_{LD} (Hill & Robertson 1968) αποτελεί μια εκτιμήτρια του βαθμού σύνδεσης μεταξύ των γενετικών τόπων, η οποία στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι πιο πληροφοριακή από τη μελέτη ενός γενωμικού χάρτη (όταν αυτός υπάρχει), δεδομένου ότι ο βαθμός LD μεταξύ δύο τόπων δεν σχετίζεται πάντα με τη φυσική τους απόσταση (Jorde *et al.* 1994, Jorde 1995, 2000).

Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της ανισορροπίας σύνδεσης (LD) μεταξύ των 10 γενετικών τόπων όπως αυτή εκτιμάται από τον συντελεστή συσχέτισης r_{LD} (Hill & Robertson 1968), με τη χρήση του προγράμματος Linkdos το οποίο παρέχεται στο πακέτο ανάλυσης GENEPOP (v. 3.4, Raymond & Rousset 1995). Στη συνέχεια με τη βοήθεια του ίδιου προγράμματος έγινε έλεγχος (Fisher's exact test) του κατά πόσο οι γονότυποι ενός τόπου είναι ανεξάρτητοι από αυτούς ενός άλλου γενετικού τόπου.

2.3.2 Καθορισμός πληθυσμιακών μονάδων

Structure

Για την ανάλυση των δεδομένων της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο βάσει του οποίου ένα άτομο μπορεί να προέρχεται από παραπάνω του ενός πληθυσμούς (admixture model), επιτρέποντας έτσι την εκτίμηση των ατόμων εκείνων που έχουν προκύψει από τυχόν ανάμειξη των πληθυσμών. Σύμφωνα με τους δημιουργούς του προγράμματος, το παραπάνω μοντέλο συνιστά κατάλληλο εργαλείο εξαιτίας της ευελιξίας του στον χειρισμό της πολυπλοκότητας των φυσικών πληθυσμών, ενώ

προτείνεται και για τη μελέτη ζωνών υβριδισμού (Pritchard *et al.* 2000, Pritchard & Wen 2004).

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, για δεδομένο αριθμό πληθυσμών (clusters, K), πραγματοποιείται η αντιστοίχιση των ατόμων σε αυτούς βάσει πιθανοτήτων. Παράλληλα, πραγματοποιείται για κάθε άτομο η εκτίμηση της παραμέτρου q (membership coefficient, συντελεστής συμμετοχής), που αποτελεί το ποσοστό του γονιδιώματος του κάθε ατόμου, που αντιστοιχεί σε κάθε έναν από τους πληθυσμούς (clusters). Κάθε αριθμός πιθανών πληθυσμών (K) χαρακτηρίζεται και από μια τιμή πιθανοφάνειας, όπως αυτή προκύπτει από την μεθοδολογία MCMC (Markov Chain Monte Carlo) στην οποία βασίζεται το πρόγραμμα.

Αφού οριστούν οι κατάλληλες παράμετροι για τη σταθεροποίηση της αλυσίδας MCMC, πραγματοποιείται στη συνέχεια η διερεύνηση των δεδομένων για ποικίλους αριθμούς πληθυσμών (K). Η σύγκριση των τιμών πιθανοφάνειας για κάθε έναν από αυτούς, οδηγεί στον πιο πιθανό, βάσει των δεδομένων, αριθμό clusters που εμπεριέχονται στα δεδομένα και στην αντιστοίχιση των υπό μελέτη ατόμων σε αυτά. Η επιλογή του πιο πιθανού αριθμού πληθυσμών (K) έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού ΔK (*ad-hoc* statistic), που προτάθηκε από τους Evanno *et al.* (2005) ως ένας αξιόπιστος και αμερόληπτος τρόπος επιλογής, ο οποίος λαμβάνει υπόψη όχι μόνο την τιμή της πιθανοφάνειας, αλλά και τη διακύμανση αυτής μεταξύ διαδοχικών τιμών του K .

Οι αναλύσεις στο STRUCTURE βασίστηκαν σε 100.000 επαναλήψεις (MCMC iterations), εκ των οποίων οι πρώτες 20.000 αγνοήθηκαν ως περίοδος αστάθειας των τιμών της πιθανοφάνειας (burn-in). Οι παραπάνω τιμές επιλέχθηκαν έτσι ώστε η διακύμανση της παραμέτρου α (πaráμετρος της κατανομής Dirichlet που εκφράζει τον βαθμό ανάμειξης) του μοντέλου να είναι η ελάχιστη δυνατή (<0.2), όπως ορίζεται στις οδηγίες του προγράμματος (Pritchard & Wen 2004). Ο αριθμός των πιθανών clusters που ελέγχθηκαν κυμαίνεται από $K=1$ έως $K=20$, ενώ για κάθε μια από τις τιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν 10 επαναλήψεις με στόχο τον έλεγχο συνέπειας των αποτελεσμάτων.

Geneland

Το πρόγραμμα GENELAND εμπεριέχει στατιστικό μοντέλο που στόχο έχει την εξαγωγή συμπερασμάτων και τον εντοπισμό γενετικών ασυνεχειών μεταξύ πληθυσμών που κατανέμονται στο χώρο, κάνοντας χρήση των γονοτύπων του κάθε ατόμου ως προς έναν μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων. Βασική προϋπόθεση της μεθοδολογίας αυτής αποτελεί ένας βαθμός εξάρτησης μεταξύ των ατόμων ως προς το χώρο τον οποίο καταλαμβάνουν. Το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε βάσει της Μπεϋζιανής ανάλυσης, κάνοντας χρήση της μεθοδολογίας MCMC. Ως εκ των προτέρων πληροφορία χρησιμοποιείται το χωρικό πρότυπο κατανομής των υπό μελέτη ατόμων. Βάσει της παραπάνω μεθοδολογίας, προσεγγίζονται θέματα, όπως α) η εκτίμηση αριθμού των διακριτών πληθυσμιακών μονάδων που υπάρχουν

στην υπό μελέτη περιοχή, β) η ποσοτικοποίηση του βαθμού χωρικής εξάρτησης των δεδομένων, γ) η τοποθέτηση-κατηγοριοποίηση των ατόμων σε πληθυσμιακές μονάδες και δ) ο εντοπισμός τυχών μεταναστών μεταξύ αυτών. Το σύνολο των δεδομένων θεωρείται αντιπροσωπευτικό ενός ή περισσότερων παμμικτικών πληθυσμών που διαχωρίζονται γεωγραφικά (Guillot *et al.* 2005).

Αρχικά δημιουργείται ένα μωσαϊκό Voronoi (βλέπε Κεφάλαιο III), βάσει του χώρου τον οποίο καταλαμβάνουν τα υπό μελέτη άτομα. Η συνδυασμένη πιθανότητα (joint probability) δύο ατόμων να ανήκουν στον ίδιο πληθυσμό θεωρείται ότι μειώνεται όσο αυξάνεται η μεταξύ τους γεωγραφική απόσταση. Ουσιαστικά, σε αντίθεση με το μοντέλο ανάμειξης που χρησιμοποιείται στο STRUCTURE, το μοντέλο που χρησιμοποιείται από το GENELAND ενοεί της δομές εκείνες που χαρακτηρίζονται από οργάνωση στο χώρο. Ωστόσο μεγάλη ποσότητα δεδομένων (αριθμός ατόμων και γενετικών τόπων) και δοσμένου του αριθμού των πληθυσμών, τα αποτελέσματα των δύο προγραμμάτων αναμένεται να συγκλίνουν (Guillot *et al.* 2005).

Πειράματα προσομοιώσεων δείχνουν ότι οι μέθοδοι εκείνες που κάνουν χρήση της γεωγραφικής πληροφορίας έχουν μικρότερο σφάλμα αντιστοίχισης των ατόμων σε πληθυσμούς από ότι οι αντίστοιχες με αυτές μέθοδοι που δεν κάνουν χρήση της γεωγραφικής πληροφορίας. Η τάση (καλύτερη συμπεριφορά χωροταξικών μοντέλων) αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο στις περιπτώσεις εκείνες που ο αριθμός των τόπων είναι μικρός, υπάρχει υψηλός βαθμός οργάνωσης στο χώρο και τα επίπεδα διαφοροποίησης είναι μικρά ($F_{ST} < 0,04$). Ωστόσο, η ακρίβεια με την οποία γίνεται η εκτίμηση των ορίων των πληθυσμών, αυξάνεται ανάλογα με το μεταξύ τους επίπεδο διαφοροποίησης (Guillot *et al.* 2005).

Σύμφωνα με τους δημιουργούς του προγράμματος, η χρήση του επιτρέπει τη μελέτη πολύπλοκων καταστάσεων στο χώρο χωρίς ωστόσο η πληθυσμιακή δομή στο χώρο να «επιβάλλεται» όταν αυτή δεν υπάρχει. Η παραπάνω μέθοδος, σε αντίθεση με αυτή του προγράμματος STRUCTURE, θεωρεί τον αριθμό των πληθυσμιακών μονάδων ως άγνωστη παράμετρο, η οποία εκτιμάται μέσω της MCMC. Μετά τον καθορισμό του αριθμού των πληθυσμιακών μονάδων και για την εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου με την όσο το δυνατό μικρότερη διακύμανση, ακολουθεί μια ακόμα ανάλυση, στην οποία ορίζεται ένας συγκεκριμένος αριθμός πληθυσμών (όπως αυτός προέκυψε από την προηγούμενη ανάλυση) (Guillot *et al.* 2005).

Τα αποτελέσματα του GENELAND βασίστηκαν σε 100.000 επαναλήψεις (MCMC iterations) με δειγματοληπτική συχνότητα 1/100 (thinning), ενώ οι πρώτες 100 από αυτές αγνοήθηκαν ως περίοδος αστάθειας των τιμών πιθανοφάνειας (burn-in). Οι ρυθμίσεις αυτές επιλέχθηκαν βάσει των οδηγιών, αλλά και των εμπειρικών μελετών του προγράμματος. Στην πρώτη ανάλυση, ο αριθμός των πληθυσμών κυμαίνεται από $K=1$ έως $K=20$, ενώ στη δεύτερη ανάλυση ο αριθμός K είναι σταθερός και ισούται με αυτόν που εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή

πιθανοφάνειας στα αποτελέσματα της πρώτης ανάλυσης. Στην δεύτερη φάση των αναλύσεων, πραγματοποιήθηκαν συνολικά 20 επαναλήψεις και στη συνέχεια επιλέχθηκε αυτή με την υψηλότερη τιμή πιθανοφάνειας.

2.3.3 Βασικές αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής

Έχοντας ως στόχο την περιγραφή της γενετικής διαφοροποίησης που χαρακτηρίζει τα δείγματα ευρύτερων γεωγραφικών περιοχών και τη σύγκρισή της με αυτή που εκτιμάται βάσει των ομαδοποιήσεων που προκύπτουν από τα προγράμματα που προαναφέρθηκαν, δημιουργήθηκαν οι κάτωθι ομάδες δεδομένων. Η πρώτη περιλαμβάνει το σύνολο των δειγμάτων χωρισμένα σε ομάδες βάσει της ευρύτερης γεωγραφικής τους προέλευσης. Αναλυτικότερα, διακριτές ομάδες αποτελούν τα άτομα από τα υπό μελέτη νησιά, καθώς και τα άτομα των ηπειρωτικών περιοχών χωρισμένα ως προς τη χώρα προέλευσής τους. Οι επόμενες ομάδες δεδομένων αντιστοιχούν στις ομαδοποιήσεις των ατόμων, όπως αυτές προέκυψαν από τα προγράμματα STRUCTURE και GENELAND.

Οι στατιστικοί έλεγχοι που ακολουθούν πραγματοποιήθηκαν για όλες τις ομάδες δεδομένων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του βαθμού γενετικής ομοιογένειας που παρουσιάζουν οι πληθυσμιακές ομάδες μεταξύ τους ως προς την κατανομή των αλληλικών τους συχνοτήτων. Ο έλεγχος πληθυσμιακής διαφοροποίησης έγινε με τη μέθοδο της συνδυασμένης πιθανότητας του Fisher των τιμών των πιθανοτήτων (p) που εκτιμήθηκαν από τους ελέγχους Fisher's exact test. Η επιλογή της μεθόδου βασίστηκε στην υψηλή στατιστική ισχύ που παρουσιάζει σε περιπτώσεις ανάλυσης δεδομένων πολλαπλών γενετικών τόπων που χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων (Ryman *et al.* 2006), στοιχεία που χαρακτηρίζουν τα δεδομένα της παρούσας μελέτης. Μηδενική υπόθεση (H_0) του παραπάνω ελέγχου αποτελεί ότι η κατανομή των αλληλομόρφων είναι η ίδια σε ζεύγη πληθυσμών με αποτέλεσμα την απουσία σημαντικής διαφοροποίησης μεταξύ αυτών. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GENEPOP.

Με τη χρήση του ίδιου προγράμματος έλαβαν χώρα έλεγχοι (exact tests) απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Οι έλεγχοι ισορροπίας Hardy-Weinberg έχουν την ίδια μηδενική υπόθεση (H_0 = τυχαία ένωση γαμετών), ενώ διαφέρουν ως προς την εναλλακτική τους. Συγκεκριμένα, ο πρώτος έλεγχος είχε ως εναλλακτική υπόθεση (H_1) το έλλειμμα ετεροζυγωτίας, ενώ ο δεύτερος το πλεόνασμα ετεροζυγωτίας. Οι έλεγχοι αυτοί (U-tests) επιλέχθηκαν, εξαιτίας της μεγαλύτερης στατιστικής τους ισχύος έναντι του ελέγχου πιθανότητας (probability test) (Rousset & Raymond 1995). Το επίπεδο σημαντικότητας για το σύνολο των ελέγχων που προαναφέρθηκαν αποτελεί το $\alpha=0,05$.

Ο υπολογισμός του αριθμού των αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο, των αλληλικών τους συχνοτήτων, της μέσης παρατηρούμενης (H_0) και αναμενόμενης ετεροζυγωτίας ($H_{e \text{ n.b}}$) (Nei 1978), των τιμών F_{IS} (Weir & Cockerham 1984 και Robertson & Hill 1984) ανά

πληθυσμό και ανά γενετικό τόπο, καθώς και οι εκτιμήσεις των τιμών F_{ST} (θ Weir & Cockerham 1984) μεταξύ των πληθυσμών πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος GENETIX (v. 4.05, Belkhir *et al.* 2001). Η στατιστική σημαντικότητα των τιμών των δεικτών F_{ST} και F_{IS} ελέγχθηκε με τη βοήθεια του ίδιου προγράμματος, πραγματοποιώντας 1000 αντιμεταθέσεις (permutations).

2.3.4 Εντοπισμός των γενετικών ορίων βάσει αλληλικών συχνοτήτων

Ο προσδιορισμός των γεωγραφικών ορίων των πληθυσμών αποτελεί πεδίο έντονου ενδιαφέροντος, αφού σε αυτά ανακλώνται οι βιολογικές, φυσιολογικές ή ακόμα και κοινωνικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στις περιοχές αυτές (Jacquez *et al.* 2000). Ως γενετικά φράγματα, ορίζονται οι περιοχές εκείνες που χαρακτηρίζονται από έντονη γενετική μεταβολή, ενώ στον τομέα της πληθυσμιακής γενετικής, η αναγνώρισή τους σχετίζεται στενά με τον προσδιορισμό ζωνών υβριδισμού (Endler 1977 από Crida & Manel 2007).

Οι κυρίαρχες προσεγγίσεις για τον εντοπισμό των γενετικών ορίων χρησιμοποιούν είτε τον αλγόριθμο του Monmonier (1973, βλέπε Κεφάλαιο III), ο οποίος βασίζεται στις μεταξύ των ατόμων γενετικές αποστάσεις είτε την προσέγγιση του Womble (1951). Εξαιτίας της έλλειψης, μέχρι σήμερα, κατάλληλων μεθόδων εκτίμησης γενετικών αποστάσεων, οι οποίες να μπορούν να περιγράψουν με ακρίβεια την εξέλιξη των μικροδορυφορικών τόπων (βλέπε εισαγωγή κεφαλαίου), η προσέγγιση του Womble θεωρείται καταλληλότερη για τον χειρισμό των αλληλικών συχνοτήτων τους (Crida & Manel 2007). Μια βελτιστοποιημένη έκδοση της προσέγγισης αυτής εμπεριέχεται στο πρόγραμμα WOMBSOFT (Crida & Manel 2007). Βάσει αυτού, αρχικά πραγματοποιείται η συσχέτιση της κάθε δειγματοληπτικής θέσης με τους γονότυπους του ατόμου ή των ατόμων που παρατηρούνται σε αυτή. Στη συνέχεια σύμφωνα με την προσέγγιση Wombling, υπολογίζεται η διακύμανση των επιφανειών των αλληλικών συχνοτήτων και εκτιμάται ο μέσος όρος αυτών, δημιουργώντας έτσι μια νέα επιφάνεια συχνοτήτων, που καλείται systemic map (ή systemic function). Με την εφαρμογή έπειτα ενός διωνυμικού ελέγχου, γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός της σημαντικότητας των γενετικών ορίων που προέκυψαν (Fortin 1994 από Crida & Manel 2007). Τα αποτελέσματα του προγράμματος παρουσιάζονται σε δύο χάρτες. Ο πρώτος δείχνει την διακύμανση της επιφάνειας των συχνοτήτων (systemic function) και της μέσης κατεύθυνσης της διαβάθμισης στην υπό μελέτη περιοχή. Ο δεύτερος χάρτης παρουσιάζει τα αποτελέσματα του διωνυμικού ελέγχου και επομένως των γενετικών ορίων, που είναι στατιστικά σημαντικά (Crida & Manel 2007).

Απαραίτητη προϋπόθεση του παραπάνω προγράμματος αποτελεί η ομοιογενής κατανομή των δειγματοληπτικών περιοχών. Η παρουσία στα δεδομένα μας ενός μεγάλου αριθμού νησιωτικών περιοχών, απέτρεψε την ανάλυση του συνόλου των δεδομένων, αφού εξαιτίας της παρουσίας τους, οι δειγματοληπτικές περιοχές εμφανίζονται ανομοιογενείς.

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η ανάλυση να πραγματοποιηθεί σε υποσύνολο των δεδομένων, όπου η κατανομή των δειγματοληπτικών περιοχών εμφανίζει ομοιογένεια. Πιο συγκεκριμένα, η παραπάνω ανάλυση έγινε για τα άτομα της ηπειρωτικής Ελλάδας (με εξαίρεση τα άτομα της Πελοποννήσου). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο ύπαρξης γενετικών φραγμάτων και την συσχέτισή τους με τα αποτελέσματα του mtDNA, βάσει των οποίων η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από μια ζώνη επαφής (δηλαδή ένα έντονα διακριτό γενετικό όριο). Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι προκαθορισμένες από το πρόγραμμα ρυθμίσεις, ενώ ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $\alpha = 0,05$.

2.3.5 Εκτίμηση παρουσίας υβριδίων στη ζώνη επαφής

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, στην ευρύτερη περιοχή της Β.Α. Ελλάδας εντοπίζεται μια ζώνη επαφής μεταξύ των δύο μιτοχονδριακά διαφοροποιημένων ομάδων (του «ανατολικού» και του «δυτικού» τύπου). Με στόχο τον έλεγχο του κατά πόσο οι δύο αυτές ομάδες υβριδίζουν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των γονοτύπων τους με το πρόγραμμα STRUCTURE (χρησιμοποιώντας τις ρυθμίσεις του προγράμματος που προαναφέρθηκαν). Η ανάλυση έγινε σε δείγματα από τις περιοχές στις οποίες παρατηρείται η ζώνη επαφής του mtDNA, καθώς και από γειτονικές σε αυτές περιοχές ($n = 269$) ορίζοντας τον αριθμό των πληθυσμών ίσον με 2. Θέτοντας $K=2$, υποθέτουμε την ύπαρξη δύο μόνο πληθυσμών που συμβάλλουν στη γενετική δεξαμενή του δείγματος. Η ανάλυση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εκτίμηση του συντελεστή συμμετοχής (membership coefficient, q) του κάθε ατόμου σε κάθε έναν από τους «πατρικούς» πληθυσμούς (Pritchard *et al.* 2000). Τα άτομα που αποτελούν υβρίδια των «πατρικών» πληθυσμών αναμένεται να χαρακτηρίζονται από τιμές q , οι οποίες είναι ενδιάμεσες των τιμών των δύο «πατρικών» πληθυσμών (π.χ. αναμένεται ότι τα πρώτης γενιάς υβρίδια χαρακτηρίζονται από $q=0,5$) (Vaha & Primmer 2006). Στην προσπάθεια εντοπισμού όσο το δυνατόν «καθαρότερων» πατρικών πληθυσμών, η κατάταξη των ατόμων σε αυτούς έγινε θέτοντας ως όριο την τιμή $q=0,95$. Για τον έλεγχο αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε συνολικά 10 φορές. Στη συνέχεια ως πατρικοί πληθυσμοί ορίστηκαν τα άτομα εκείνα που αντιστοιχούν σε αυτούς από το σύνολο των 10 ανεξάρτητων επαναλήψεων.

Μετά τον εντοπισμό των δύο εν δυνάμει πατρικών πληθυσμών πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις υβριδίων πρώτης (F1) και δεύτερης (F2) γενιάς στις οποίες συμπεριλήφθηκαν και ανάδρομες (B2) διασταυρώσεις (δηλαδή διασταυρώσεις μεταξύ υβριδίων πρώτης γενιάς και πατρικών πληθυσμών). Η κάθε κατηγορία υβριδίων αποτελείται από 120 άτομα, οι γονότυποι των οποίων δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος HYBRIDLAB (v 1.0, Nielsen *et al.* 2006).

Στη συνέχεια, το σύνολο των δεδομένων (πιθανοί πατρικοί πληθυσμοί, πιθανά άτομα-υβρίδια και προσομοιωμένα υβρίδια όλων των κατηγοριών) υποβλήθηκαν σε ανάλυση

με το πρόγραμμα STRUCTURE θέτοντας και πάλι τον αριθμό των πληθυσμών $K=2$. Η δημιουργία γραφικής παράστασης της κατανομής των ατόμων της κάθε κατηγορίας ως προς τους εκτιμώμενους από το πρόγραμμα συντελεστές συμμετοχής (q) (για τον έναν από τους δύο πληθυσμούς), επέτρεψε την κατάταξη των πιθανών υβριδίων της περιοχής σε υβρίδια πρώτης ή δεύτερης γενιάς, καθώς και σε απογόνους ανάδρομων διασταυρώσεων. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε 3 φορές με στόχο τον έλεγχο της συνέπειας των παραπάνω αποτελεσμάτων. Στις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν μετά την ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν οι βασικές αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής, όπως αυτές έγιναν και για το σύνολο των ομαδοποιήσεων.

3. Αποτελέσματα

3.1 Περιγραφικά στοιχεία των υπό μελέτη μικροδορυφορικών τόπων

Ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο στο σύνολο των ατόμων που αναλύθηκαν ισούται με 22,5 (τυπικό σφάλμα [τ.σ.] $\pm 2,997$), ενώ ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων με συχνότητα μεγαλύτερη του 5% ανά γενετικό τόπο ισούται με 5 (τ.σ. $\pm 0,516$). Δηλαδή, η πλειοψηφία των αλληλομόρφων χαρακτηρίζεται από χαμηλές συχνότητες. Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_o) ισούται με 0,4576, ενώ η αναμενόμενη (H_e) ισούται με 0,7841. Η τιμή του δείκτη F_{IS} είναι στατιστικά σημαντική και ισούται με 0,41675. Ο αριθμός και το εύρος των αλληλομόρφων, η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία και οι τιμές του δείκτη F_{IS} ανά γενετικό τόπο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3**. Οι εκτιμήσεις του δείκτη F_{IS} είναι στατιστικά σημαντικές τιμές, όπως αποκάλυψε η ανάλυση 1000 αντιμεταθέσεων (permutations). Τέλος, ο λιγότερο πολυμορφικός τόπος χαρακτηρίζεται από 9 αλληλόμορφα (Lsa3), ενώ ο πιο πολυμορφικός διαθέτει 41 αλληλόμορφα (SOL30).

Πίνακας 4.3 Ο αριθμός και το εύρος μεγέθους των αλληλομόρφων που παρατηρήθηκαν στους υπό μελέτη γενετικούς τόπους, οι τιμές της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας και του δείκτη F_{IS} , όπως αυτές εκτιμώνται ανά γενετικό τόπο σύμφωνα με τους Weir & Cockerham (1984) (W&C) και Robertson & Hill (1984) (R&H).

Γενετικός τόπος	Αριθμός αλληλομόρφων	Εύρος αλληλομόρφων	Παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_o)	F_{IS}	
				W&C	R&H
Lsa1	17	130-340bp	0,5032	+0,301	+0,224
Lsa2	14	235-261bp	0,4487	+0,447	+0,334
Lsa3	9	200-218bp	0,2748	+0,601	+0,413
Lsa4	23	86-130bp	0,5241	+0,398	+0,272
Lsa6	31	145-342bp	0,2496	+0,599	+0,224
Lsa8	16	170-202bp	0,4270	+0,399	+0,239
SAT02	29	205-279bp	0,6290	+0,295	+0,198
SAT05	26	179-237bp	0,3796	+0,570	+0,562
SAT08	19	86-120bp	0,4172	+0,435	+0,270
SOL30	41	129-219bp	0,7229	+0,206	+0,134

Στο σύνολο των δεδομένων, οι μικροδορυφορικοί τόποι εμφανίζουν απόκλιση από την ισορροπία HW και στατιστικά σημαντικό έλλειμμα ετεροζυγωτίας ($p < 0,00001$).

Τέλος, ο συντελεστής συσχέτισης r_{LD} από την ανά ζεύγη σύγκριση των γενετικών τόπων παρουσιάζεται στον **Πίνακα 4.4**. Σύμφωνα με τον έλεγχο ανεξαρτησίας, η πλειοψηφία

των γενετικών τόπων, εμφανίζεται σε ισορροπία σύνδεσης με εξαίρεση τα ζεύγη Lsa3 & Lsa4 ($p=0,06863$), Lsa3 & Lsa6 ($p=0,08580$) και Lsa6 & Sat2 ($p=0,53352$).

Πίνακας 4.4 Εκτιμήσεις του συντελεστή συσχέτισης r_{LD} για κάθε ζεύγος γενετικών τόπων. Το σύνολο των τιμών που παρουσιάζονται είναι στατιστικά σημαντικό ($\alpha=0,05$).

Ζεύγος τόπων	r_{LD}	Ζεύγος τόπων	r_{LD}	Ζεύγος τόπων	r_{LD}
Lsa1-Lsa2	0.02740	Lsa2-SAT08	0.03169	Lsa6-Lsa8	0.01612
Lsa1-Lsa3	0.02837	Lsa2-SOL30	0.02572	Lsa6-SAT02	0.02131
Lsa1-Lsa4	0.02542	Lsa3-Lsa4	0.02876	Lsa6-SAT05	0.02126
Lsa1-Lsa6	0.01503	Lsa3-Lsa6	0.02223	Lsa6-SAT08	0.02007
Lsa1-Lsa8	0.02466	Lsa3-Lsa8	0.02272	Lsa6-SOL30	0.02070
Lsa1-SAT02	0.02245	Lsa3-SAT02	0.02921	Lsa8-SAT02	0.02347
Lsa1-SAT05	0.02609	Lsa3-SAT05	0.02862	Lsa8-SAT05	0.02579
Lsa1-SAT08	0.02340	Lsa3-SAT08	0.03031	Lsa8-SAT08	0.02474
Lsa1-SOL30	0.02133	Lsa3-SOL30	0.02680	Lsa8-SOL30	0.01850
Lsa2-Lsa3	0.03537	Lsa4-Lsa6	0.02106	SAT02-SAT05	0.03018
Lsa2-Lsa4	0.02962	Lsa4-Lsa8	0.02861	SAT02-SAT08	0.02380
Lsa2-Lsa6	0.02667	Lsa4-SAT02	0.02758	SAT02-SOL30	0.02684
Lsa2-Lsa8	0.02751	Lsa4-SAT05	0.02672	SAT05-SAT08	0.03964
Lsa2-SAT02	0.03075	Lsa4-SAT08	0.02623	SAT05-SOL30	0.02316
Lsa2-SAT05	0.02924	Lsa4-SOL30	0.02571	SAT08-SOL30	0.02167

3.2 Ορισμός πληθυσμιακών μονάδων

Geneland

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος GENELAND, το σύνολο των δεδομένων είναι δομημένο σε 9 πληθυσμιακές μονάδες. Από τις 20 συνολικά επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν για $K=9$, επιλέχθηκε αυτή με τη μεγαλύτερη μέση τιμή πιθανοφάνειας ($\ln L=-52522,8$). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκε σύγκλιση των τιμών πιθανοφάνειας στις 20 αυτές ανεξάρτητες επαναλήψεις, αφού η μεταξύ τους απόκλιση ήταν μεγάλη και η καλύτερη τιμή παρατηρήθηκε σε μια και μόνο επανάληψη.

Η γεωγραφική κατανομή των ομαδοποιήσεων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4.2**. Δύο από τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν δεν περιλαμβάνουν κανένα από τα υπό μελέτη άτομα (“ghost” πληθυσμοί), ενώ οι εκ των υστέρων πιθανότητες που τις χαρακτηρίζουν είναι μηδενικές (οι πληθυσμοί αυτοί δεν παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.2**). Συνεπώς, το σύνολο των δεδομένων διακρίνεται σε 7 πληθυσμιακές μονάδες.

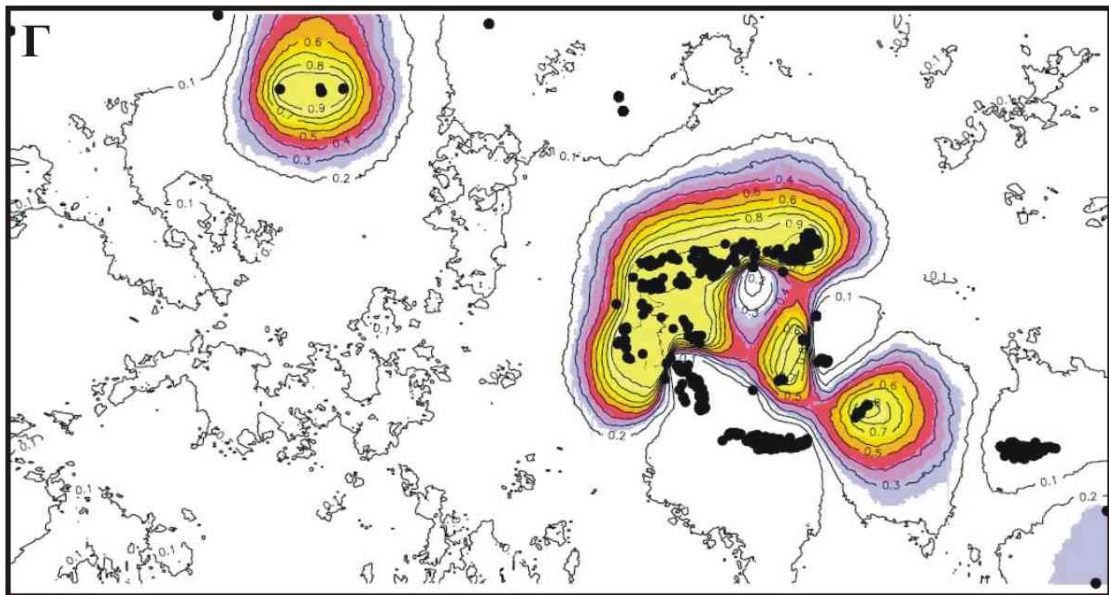
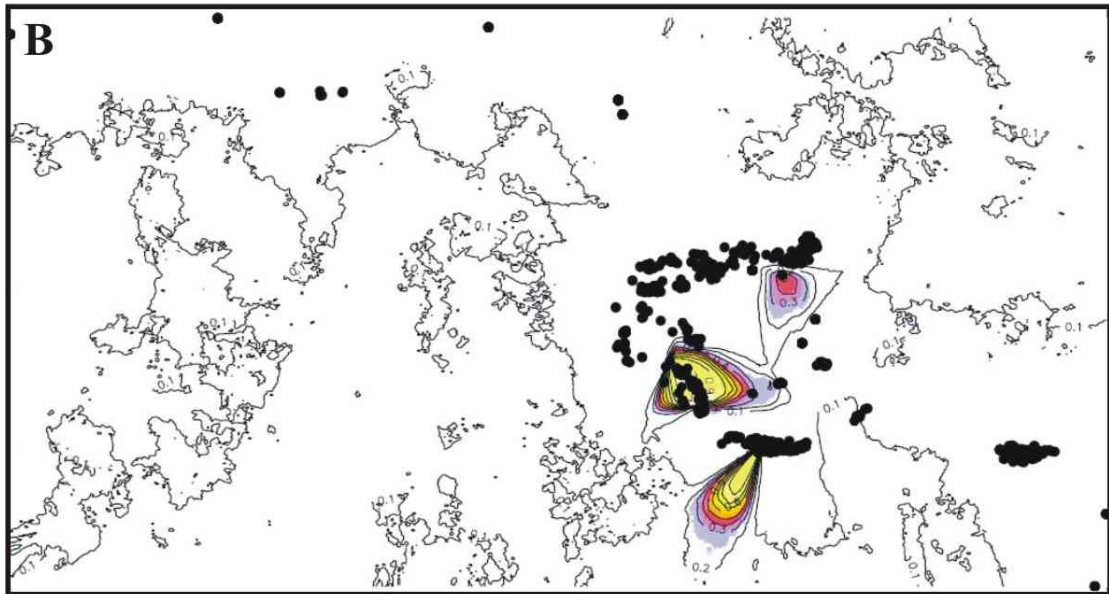
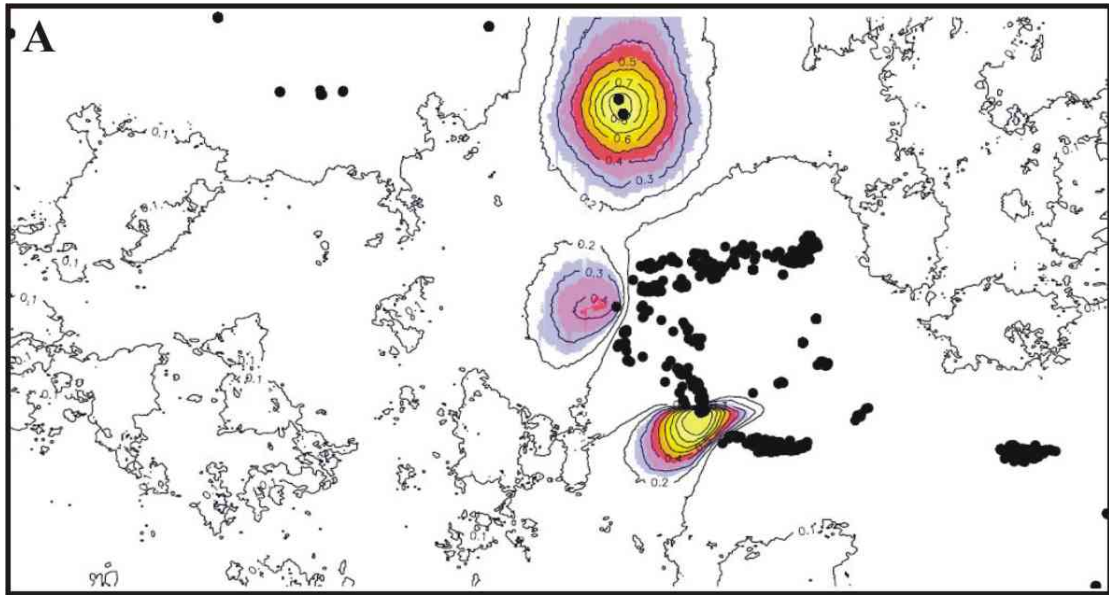
Αναλυτικότερα, στην πρώτη ομαδοποίηση (A) παρατηρούνται άτομα από το νησί των Κυθήρων και των δύο περιοχών της Σερβίας τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή εκ των υστέρων πιθανότητα που στην πλειοψηφία των ατόμων φτάνει το 1. Η ομαδοποίηση B

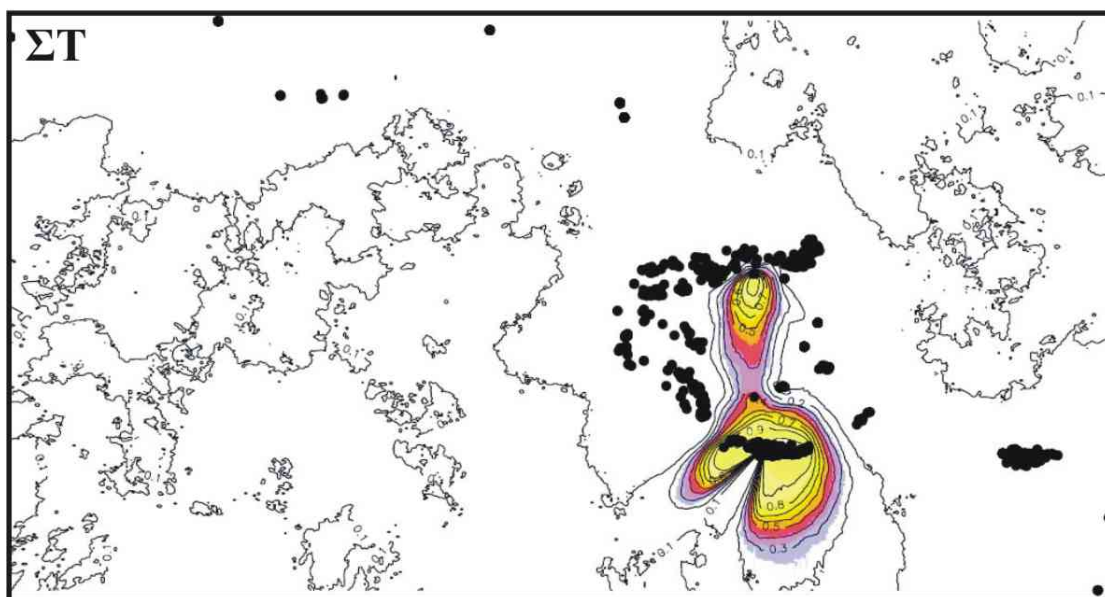
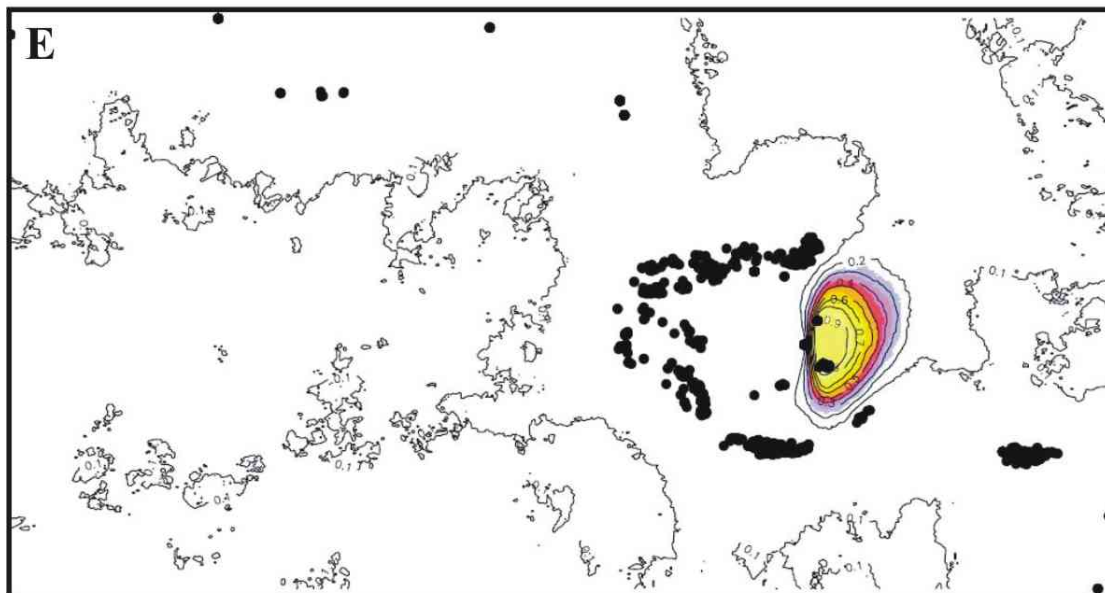
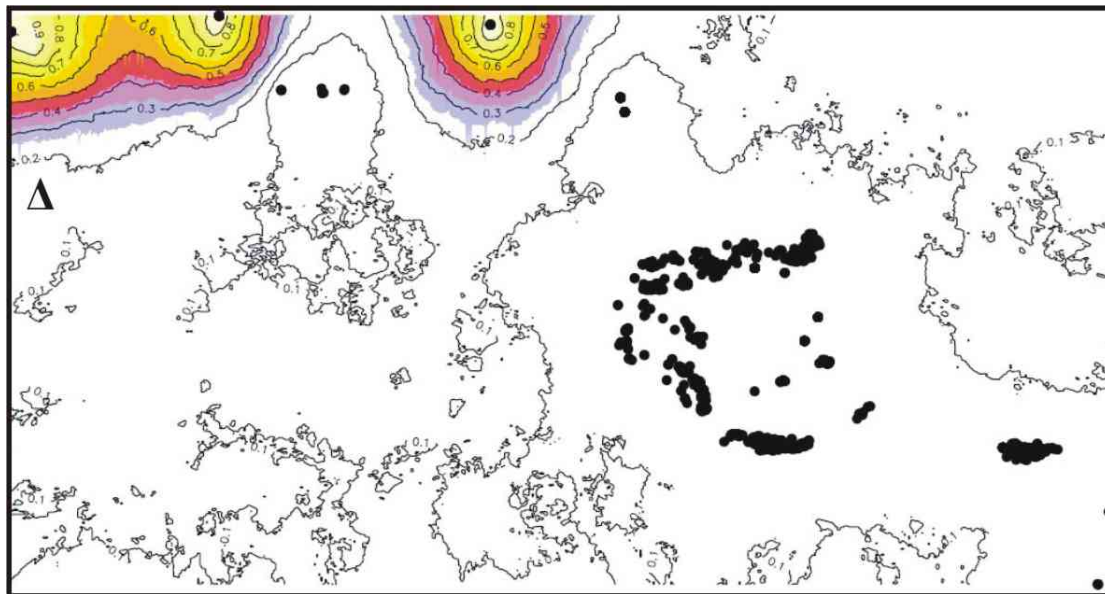
περιλαμβάνει τα άτομα της Πελοποννήσου και μικρό αριθμό ατόμων της Κρήτης από το οροπέδιο της Νίδας στον Ψηλορείτη (δύο άτομα) και τα Μάταλα (11 άτομα). Με μικρή εκ των υστέρων πιθανότητα στην ομαδοποίηση αυτή αντιστοιχούν επίσης και τα τρία άτομα από το νησί της Σαμοθράκης. Η τρίτη ομαδοποίηση (Γ) περιλαμβάνει άτομα από τις περιοχές της Ιταλίας, της ηπειρωτικής Ελλάδας (εκτός της Πελοποννήσου), των νησιών του Ιονίου, της Νάξου, της Χίου και της Ρόδου. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα άτομα των περιοχών του Ισραήλ, παρουσιάζουν μικρή εκ των υστέρων πιθανότητα (0,28-0,29) αντιστοίχισης στην ομαδοποίηση αυτή. Η ομαδοποίηση Δ περιλαμβάνει τα άτομα της Γαλλίας, της Γερμανίας και της Αυστρίας και η ομαδοποίηση Ε τα άτομα από τα νησιά της Μυτιλήνης και της Σάμου. Στις δύο τελευταίες ομαδοποιήσεις οι τιμές των εκ των υστέρων πιθανοτήτων ισούνται με 1. Τέλος, η έκτη ομαδοποίηση (ΣΤ) περιλαμβάνει τα άτομα της Κρήτης (εκτός αυτών που αντιστοιχούν στην ομαδοποίηση Β) και τα άτομα από το νησί της Θάσου, ενώ η έβδομη ομαδοποίηση (Ζ) περιλαμβάνει τα άτομα της Κύπρου και του Ισραήλ.

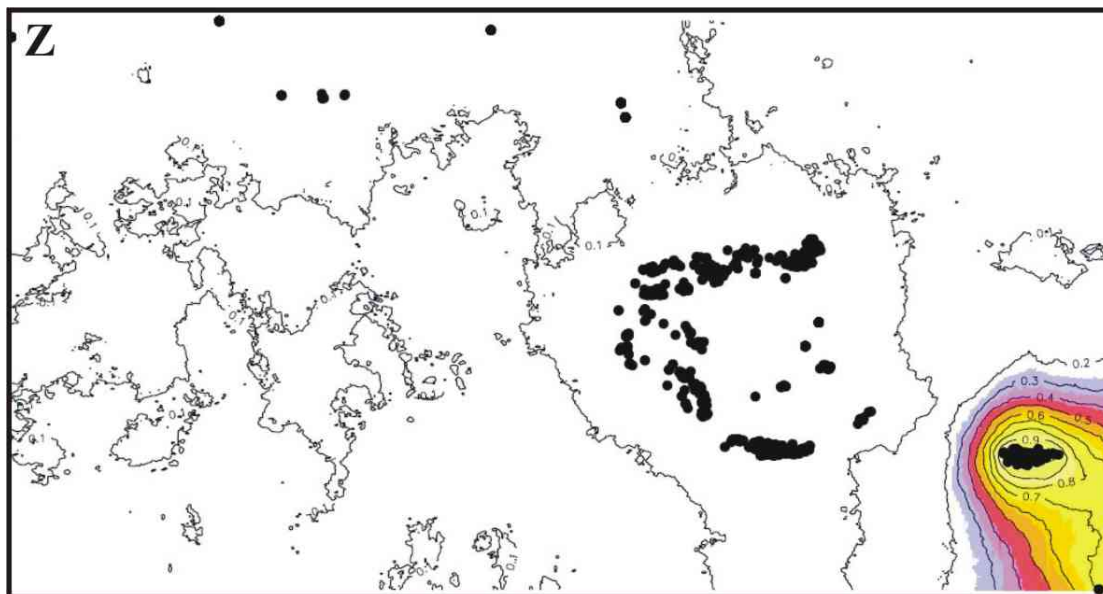
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 96% των υπό μελέτη ατόμων αντιστοιχούν σε μια από τις 7 ομαδοποιήσεις με τη μέγιστη εκ των υστέρων πιθανότητα (1), ενώ μόλις το 0,7% των ατόμων με εκ των υστέρων πιθανότητα χαμηλότερη του 0,70 (0,535-0,69).

Structure

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος STRUCTURE, το σύνολο των δεδομένων δεν αποτελεί έναν παμμικτικό πληθυσμό. Ωστόσο, η μικρή απόκλιση των τιμών πιθανοφάνειας μεταξύ των διαδοχικών K και η μεγάλη διακύμανση αυτών δεν επέτρεψε τον σαφή προσδιορισμό του πιο πιθανού αριθμού πληθυσμών (clusters). Η χρήση της μεθόδου των Evanno *et al.* (2005) ανέδειξε ως πιο πιθανό το $K=2$, ενώ οι αμέσως υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για $K=6$ και $K=10$. Στην περίπτωση όπου ο αριθμός των πληθυσμών ισούται με 2, η μέγιστη τιμή (q) ισούται με 0,973 και χαρακτηρίζει ένα μόνο άτομο, ενώ το 68% των ατόμων χαρακτηρίζεται από $q > 0,75$. Για μεγαλύτερους αριθμούς clusters ($K=6$ και 10) τιμές $q > 0,75$ χαρακτηρίζουν μικρότερο αριθμό ατόμων (57% και 33% αντίστοιχα).







Εικόνα 4.2 Χάρτες αντιστοίχισης των ατόμων σε clusters βάσει του προγράμματος GENELAND για $K=9$. Τα γραφήματα A-Z απεικονίζουν την αντιστοίχιση των εικονοστοιχείων (pixels) σε κάθε ένα cluster: **A**=Σερβία & Κύθηρα, **B**=Πελοπόννησος & Κρήτη, **Γ**=Ηπειρωτική Ελλάδα, νησιά Ιονίου, Χίος, Νάξος, Ρόδος & Ιταλία, **Δ**=Γαλλία, Γερμανία & Αυστρία, **Ε**=Μυτιλήνη & Σάμος, **ΣΤ**=Κρήτη, Νάξος & Θάσος, **Z**=Κύπρος & Ισραήλ. Από την εικόνα αυτή απουσιάζουν τα γραφήματα αντιστοίχισης εικονοστοιχείων για το 8^ο και 9^ο cluster, αφού κανένα από τα υπό μελέτη άτομα δεν αντιστοιχεί σε αυτά (“ghost” πληθυσμοί). Σε κάθε γράφημα, με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι υψηλότερες τιμές αντιστοίχισης των ατόμων (εκ των υστέρων πιθανότητες), με ροζ οι ενδιάμεσες τιμές και με γαλάζιο οι μικρότερες αυτών για τη συγκεκριμένη ομαδοποίηση. Οι καμπύλες είναι ενδεικτικές των χωροταξικών μεταβολών των τιμών αντιστοίχισης (εκ των υστέρων πιθανότητες). Οι χάρτες αυτοί βασίζονται σε μια από τις 20 συνολικά επαναλήψεις του προγράμματος για $K=9$, που χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας.

3.3 Πληθυσμιακή διαφοροποίηση

Οι ομαδοποιήσεις που προέκυψαν βάσει της ευρύτερης γεωγραφικής προέλευσης των ατόμων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.5**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ομαδοποιήσεις αυτές διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ως προς τις κατανομές των αλληλικών τους συχνοτήτων. Εξάριση αποτελεί η ομαδοποίηση που περιλαμβάνει τα τρία άτομα της Σαμοθράκης, η οποία δεν διαφοροποιείται στατιστικά σημαντικά από τις ομαδοποιήσεις της Αυστρίας, της Βουλγαρίας, της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου, της Ρόδου και της Κρήτης. Η πλειοψηφία των ομαδοποιήσεων παρουσιάζεται σε ανισορροπία HW με εξαίρεση τις ομαδοποιήσεις των ατόμων της Αυστρίας, της Ρόδου, της Ζακύνθου, της Λευκάδας και της Σαμοθράκης. Τέλος, η πλειοψηφία των ομαδοποιήσεων παρουσιάζει έλλειμμα ετεροζυγωτίας για τους περισσότερους μικροδορυφορικούς τόπους που αναλύθηκαν, ενώ μόνο η ομαδοποίηση που περιλαμβάνει τα άτομα από τη Γαλλία παρουσιάζει έλλειμμα ομοζυγωτίας σε έναν

μικροδορυφορικό τόπο (SAT08). Στον **Πίνακα 4.5** παρουσιάζονται αναλυτικά για την κάθε ομαδοποίηση, οι εκτιμήσεις που προέκυψαν από τις βασικές αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής. Τέλος, οι ομαδοποιήσεις που δεν χαρακτηρίζονται από μοναδικά αλληλόμορφα είναι της Ιταλίας, της Ρόδου, της Ζακύνθου, της Κεφαλλονιάς, των Κυκλάδων (Νάξος, Κίμωλος) και των Κυθήρων.

Πίνακας 4.5 Οι ομαδοποιήσεις που προέκυψαν βάσει της ευρύτερης γεωγραφικής κατανομής των ατόμων και ο αριθμός των δειγμάτων που περιλαμβάνουν (n). Για την κάθε ομαδοποίηση παρουσιάζονται οι τιμές της παρατηρούμενης (H_o) και αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (H_e n.b, αμερόληπτη εκτιμήτρια του Nei 1978), ο δείκτης F_{IS} , (* στατιστικά σημαντικές τιμές βάσει 1000 αντιμεταθέσεων), η πιθανότητα του στατιστικού ελέγχου απόκλισης από την ισορροπία HW, ο αριθμός των μικροδορυφορικών τόπων που παρουσιάζει έλλειμμα ετεροζυγωτίας (EE) και ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο.

Ομαδοποίηση	n	$H_{e\ n.b.}$	H_o	F_{IS}	HW	Τόποι σε EE / σύνολο τόπων	Μέσος αριθμός αλληλομόρφων / τόπο
1. Βουλγαρία	40	0,6385	0,4600	0,28481*	p<0,000	7/10	7,8000
2. Ηπειρωτική Ελλάδα	337	0,7536	0,4814	0,36161*	p<0,000	10/10	17,1000
3. Ισραήλ	16	0,5422	0,3631	0,34525*	p<0,000	3/7	5,2000
4. Σερβία	120	0,7199	0,5378	0,25402*	p<0,000	9/10	12,7000
5. Ιταλία	10	0,6305	0,4742	0,26257*	p<0,000	3/10	5,2000
6. Κύπρος	147	0,7310	0,4603	0,37224*	p<0,000	9/10	11,5000
7. Πελοπόννησος	80	0,7529	0,5648	0,25134*	p<0,000	9/10	10,0000
8. Αυστρία	10	0,5611	0,5238	0,07114	p=0,523	2/10	4,5000
9. Γαλλία	22	0,5416	0,4244	0,22077*	p<0,000	5/10	5,0000
10. Γερμανία	47	0,6552	0,5047	0,23178*	p<0,000	7/10	7,8000
11. Ρόδος	7	0,6501	0,4283	0,37772*	p=0,064	2/10	3,4000
12. Ζάκυνθος	6	0,3785	0,2800	0,28205*	p=0,145	1/6	2,4000
13. Κρήτη	554	0,7328	0,4401	0,39976*	p<0,000	10/10	16,9000
14. Κεφαλλονιά	24	0,5461	0,3361	0,39649*	p<0,000	7/10	4,3000
15. Νάξος	8	0,4748	0,3357	0,30823*	p<0,000	2/7	3,1000
16. Μυτιλήνη	15	0,5126	0,3817	0,26846*	p<0,000	1/9	2,9000
17. Λευκάδα	27	0,4112	0,3485	0,15978	p=0,052	2/7	3,7000
18. Κύθηρα	27	0,5170	0,3908	0,24799*	p<0,000	8/10	5,1000
19. Σάμος	36	0,6190	0,4373	0,29856*	p<0,000	9/10	6,3000
20. Χίος	20	0,3725	0,2754	0,26646*	p<0,000	4/7	3,8000
21. Σαμοθράκη	3	0,6333	0,2619	0,65625*	p=0,367	1/6	2,4286
22. Θάσος	54	0,6166	0,3888	0,37223*	p<0,000	10/10	6,8000

Η διαφοροποίηση μεταξύ των παραπάνω ομαδοποιήσεων, όπως αυτή εκτιμήθηκε βάσει του συντελεστή F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) δίνεται στον **Πίνακα 4.6**. Μηδενική διαφοροποίηση παρατηρείται μεταξύ των ομαδοποιήσεων της Αυστρίας και της Βουλγαρίας, (η μηδενική απόκλιση της Σαμοθράκης από τις ομαδοποιήσεις της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου, της Ρόδου, του Ισραήλ, της Βουλγαρίας και της Αυστρίας είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο μικρό δειγματοληπτικό της μέγεθος). Η αμέσως μεγαλύτερη τιμή (0,01)

παρατηρείται μεταξύ των ομαδοποιήσεων της Βουλγαρίας και της Πελοποννήσου. Τέλος, η μεγαλύτερη διαφοροποίηση βάσει του δείκτη F_{ST} παρατηρείται μεταξύ της ομαδοποίησης της Χίου από αυτή των Κυθήρων και ισούται με 0,471. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι η ομαδοποίηση της Χίου διαφοροποιείται έντονα από τις υπόλοιπες ομαδοποιήσεις με τις τιμές F_{ST} να κυμαίνονται από 0,208 έως 0,471.

Πίνακας 4.6 Τιμές του δείκτη F_{ST} (Weir and Cockerham 1984) μεταξύ των ομάδων/πληθυσμών που προκύπτουν βάσει της γεωγραφικής προέλευσης των ατόμων. Το σύνολο των τιμών είναι στατιστικά σημαντικά (βάσει 1000 αντιμεταβιβάσεων) με εξαίρεση τις τιμές που παρουσιάζονται με πιο έντονη γραμματοποίηση.

F _{ST}	H _{ST}																				
	Ελλάδα	Ισραήλ	Σερβία	Ιταλία	Κύπρος	Πελοπόννησος	Αυστρία	Γαλλία	Γερμανία	Ρώσος	Ζάκυνθος	Κρήτη	Κεφαλόρονιά	Νέζος	Μυτιλήνη	Αευκίδα	Κύθηρα	Σάμος	Χίος	Σαμοθράκη	Θάσος
Βουλγαρία	0,046	0,176	0,104	0,103	0,153	0,010	0,015	0,085	0,085	0,127	0,260	0,098	0,173	0,167	0,273	0,208	0,271	0,145	0,339	0,022	0,200
H _{ST} Ελλάδα		0,081	0,063	0,0515	0,094	0,055	0,081	0,092	0,084	0,042	0,194	0,060	0,098	0,120	0,198	0,133	0,183	0,125	0,208	-0,004	0,151
Ισραήλ			0,156	0,206	0,096	0,170	0,206	0,211	0,203	0,080	0,394	0,154	0,198	0,257	0,347	0,321	0,335	0,207	0,359	0,068	0,267
Σερβία				0,085	0,106	0,084	0,151	0,176	0,141	0,113	0,240	0,084	0,135	0,196	0,202	0,162	0,244	0,148	0,302	0,079	0,185
Ιταλία					0,144	0,084	0,172	0,167	0,117	0,172	0,285	0,105	0,186	0,282	0,236	0,151	0,302	0,171	0,373	0,138	0,129
Κύπρος						0,117	0,185	0,199	0,189	0,095	0,270	0,115	0,168	0,218	0,252	0,249	0,275	0,179	0,276	0,107	0,207
Πελοπόννησος							0,118	0,133	0,108	0,089	0,261	0,074	0,116	0,173	0,233	0,199	0,204	0,157	0,259	0,050	0,143
Αυστρία								0,066	0,074	0,205	0,306	0,153	0,212	0,228	0,351	0,327	0,300	0,196	0,409	0,105	0,252
Γαλλία									0,049	0,205	0,335	0,161	0,243	0,268	0,358	0,316	0,255	0,217	0,330	0,249	0,265
Γερμανία										0,185	0,246	0,135	0,216	0,251	0,264	0,234	0,207	0,183	0,309	0,175	0,190
Ρώσος											0,352	0,073	0,146	0,154	0,343	0,306	0,273	0,206	0,413	-0,102	0,252
Ζάκυνθος												0,247	0,357	0,406	0,448	0,447	0,326	0,368	0,582	0,433	0,320
Κρήτη													0,114	0,133	0,228	0,146	0,222	0,143	0,271	0,063	0,154
Κεφαλόρονιά														0,213	0,336	0,231	0,352	0,226	0,378	0,258	0,264
Νέζος															0,439	0,395	0,379	0,297	0,453	0,230	0,336
Μυτιλήνη																0,382	0,445	0,167	0,468	0,327	0,277
Αευκίδα																	0,387	0,265	0,545	0,332	0,218
Κύθηρα																		0,342	0,471	0,308	0,325
Σάμος																			0,346	0,156	0,200
Χίος																				0,529	0,374
Σαμοθράκη																					0,233

Όσον αφορά στις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν από τα αποτελέσματα του προγράμματος GENELAND, η διαφοροποίηση των κατανομών των αλληλικών τους συχνοτήτων είναι στατιστικά σημαντική για το σύνολο των μεταξύ τους συγκρίσεων ($p < 0,0001$). Καμία από τις ομαδοποιήσεις αυτές δεν χαρακτηρίζεται από ισορροπία HW, παρουσιάζοντας παράλληλα έλλειμμα ετεροζυγωτίας για το σύνολο των υπό μελέτη μικροδορυφορικών τόπων. Εξαιρέση αποτελεί ο μικροδορυφορικός τόπος SAT05 για την ομαδοποίηση που περιλαμβάνει άτομα από την Πελοπόννησο, την Κρήτη και τη Σαμοθράκη (B) που εμφανίζει έλλειμμα ομοζυγωτίας και ο τόπος SAT08 για την ομαδοποίηση, που περιλαμβάνει άτομα της Μυτιλήνης και της Σάμου (E), ο οποίος εμφανίζεται σε ισορροπία HW σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,01$. Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται αναλυτικά για την κάθε ομαδοποίηση, οι εκτιμήσεις που προέκυψαν από τις βασικές αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής. Μοναδικά αλληλόμορφα παρατηρούνται για το σύνολο των ομαδοποιήσεων.

Πίνακας 4.7 Εκτιμώμενες τιμές, βάσει των ομαδοποιήσεων του GENELAND, της παρατηρούμενης και αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (αμερόληπτη εκτιμήτρια του Nei 1978), του δείκτη F_{IS} (* στατιστικά σημαντικές τιμές βάσει 1000 αντιμεταθέσεων), της πιθανότητας του στατιστικού ελέγχου απόκλισης από την ισορροπία HW, του αριθμού των μικροδορυφορικών τόπων που παρουσιάζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας και του μέσου αριθμού αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο.

Ομαδοποίηση	$H_{e_{n,b}}$	H_o	F_{IS}	HW	Τόποι σε ΕΕ / σύνολο τόπων	Μέσος αριθμός αλληλομόρφων / τόπο
A	0,7506	0,5100	0,32142*	$p < 0,000$	10/10	13,3000
B	0,7379	0,5438	0,26432*	$p < 0,000$	9/10	9,1000
Γ	0,7464	0,4531	0,39338*	$p < 0,000$	10/10	17,7000
Δ	0,6377	0,4839	0,24257*	$p < 0,000$	10/10	9,6000
E	0,6418	0,4193	0,35075*	$p < 0,000$	10/10	7,3000
ΣΤ	0,7442	0,4371	0,41291*	$p < 0,000$	10/10	17,3000
Z	0,7414	0,4576	0,38448*	$p < 0,000$	10/10	12,5000

A=Σερβία & Κύθηρα, B=Πελοπόννησος & Κρήτη, Γ=Ηπειρωτική Ελλάδα, νησιά Ιονίου, Χίος, Νάξος, Ρόδος & Ιταλία, Δ=Γαλλία, Γερμανία & Αυστρία, E=Μυτιλήνη & Σάμος, ΣΤ=Κρήτη, Νάξος & Θάσος, Z=Κύπρος & Ισραήλ

Η μικρότερη διαφοροποίηση βάσει των τιμών F_{ST} παρατηρείται μεταξύ της ομαδοποίησης που περιλαμβάνει τα άτομα της ηπειρωτικής Ελλάδας, των νησιών του Ιονίου, της Νάξου, της Χίου, της Ρόδου και της Ιταλίας (Γ) και αυτής που περιλαμβάνει τα άτομα των Κυθίων και της Σερβίας (A) ($F_{ST} = 0,05024$). Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση παρατηρείται μεταξύ της ομαδοποίησης που περιλαμβάνει τα άτομα της Μυτιλήνης και της Σάμου και αυτής που περιλαμβάνει τα άτομα της Γαλλίας, της Γερμανίας και της Αυστρίας ($F_{ST} = 0,18536$). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ομαδοποίηση που περιλαμβάνει τα άτομα της Μυτιλήνης και της Σάμου διαφοροποιείται εντονότερα από το σύνολο των υπόλοιπων ομαδοποιήσεων με τιμές F_{ST} που κυμαίνονται από 0,12599 (με την ομαδοποίηση

Γ) έως 0,18536 (με την ομαδοποίηση Δ), ενώ ακολουθεί η ομαδοποίηση Ζ που περιλαμβάνει τα άτομα της Κύπρου και του Ισραήλ. Οι τιμές του δείκτη F_{ST} μεταξύ του συνόλου των ομαδοποιήσεων παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 4.8**.

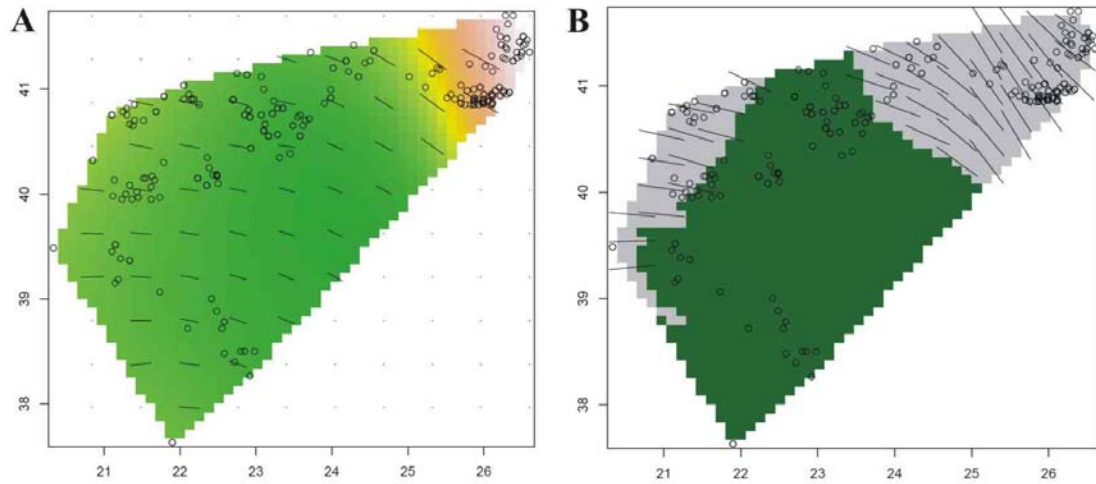
Πίνακας 4.8 Τιμές του δείκτη F_{ST} μεταξύ των ομαδοποιήσεων που προκύπτουν βάσει του προγράμματος GENELAND. Το σύνολο των τιμών είναι στατιστικά σημαντικό (βάσει 1000 αντιμεταθέσεων).

F_{ST}	B	Γ	Δ	E	ΣΤ	Z
A	0,06582	0,05024	0,10908	0,13622	0,07295	0,09548
B		0,05165	0,11237	0,16836	0,06986	0,10807
Γ			0,07760	0,12599	0,05613	0,08721
Δ				0,18536	0,12864	0,17653
E					0,13703	0,17501
ΣΤ						0,10354

A=Σερβία & Κύθηρα, **B**=Πελοπόννησος & Κρήτη, **Γ**=Ηπειρωτική Ελλάδα, νησιά Ιονίου, Χίος, Νάξος, Ρόδος & Ιταλία, **Δ**=Γαλλία, Γερμανία & Αυστρία, **E**=Μυτιλήνη & Σάμος, **ΣΤ**=Κρήτη, Νάξος & Θάσος, **Z**=Κύπρος & Ισραήλ

3.4 Προσδιορισμός γενετικών ορίων βάσει αλληλικών συχνοτήτων

Στη **Εικόνα 4.3 A** παρουσιάζεται η διαβάθμιση της επιφάνειας των αλληλικών συχνοτήτων στην περιοχή της ηπειρωτικής Ελλάδας σύμφωνα με την προσέγγιση Wombling (systemic map ή systemic function). Περιοχές με υψηλή διακύμανση παρουσιάζονται με έντονο κίτρινο έως ροζ χρώμα, διαβάθμιση η οποία αντικατοπτρίζει το μέγεθος της διακύμανσης (από τη χαμηλότερη έως την υψηλότερη διακύμανση αντιστοίχως). Αντιθέτως, οι περιοχές που χαρακτηρίζονται από χαμηλή διακύμανση και επομένως ομοιογένεια, παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα. Στη **Εικόνα 4.3 B** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του διωνυμικού ελέγχου, όπου με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα όρια με στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο $\alpha=0,05$.



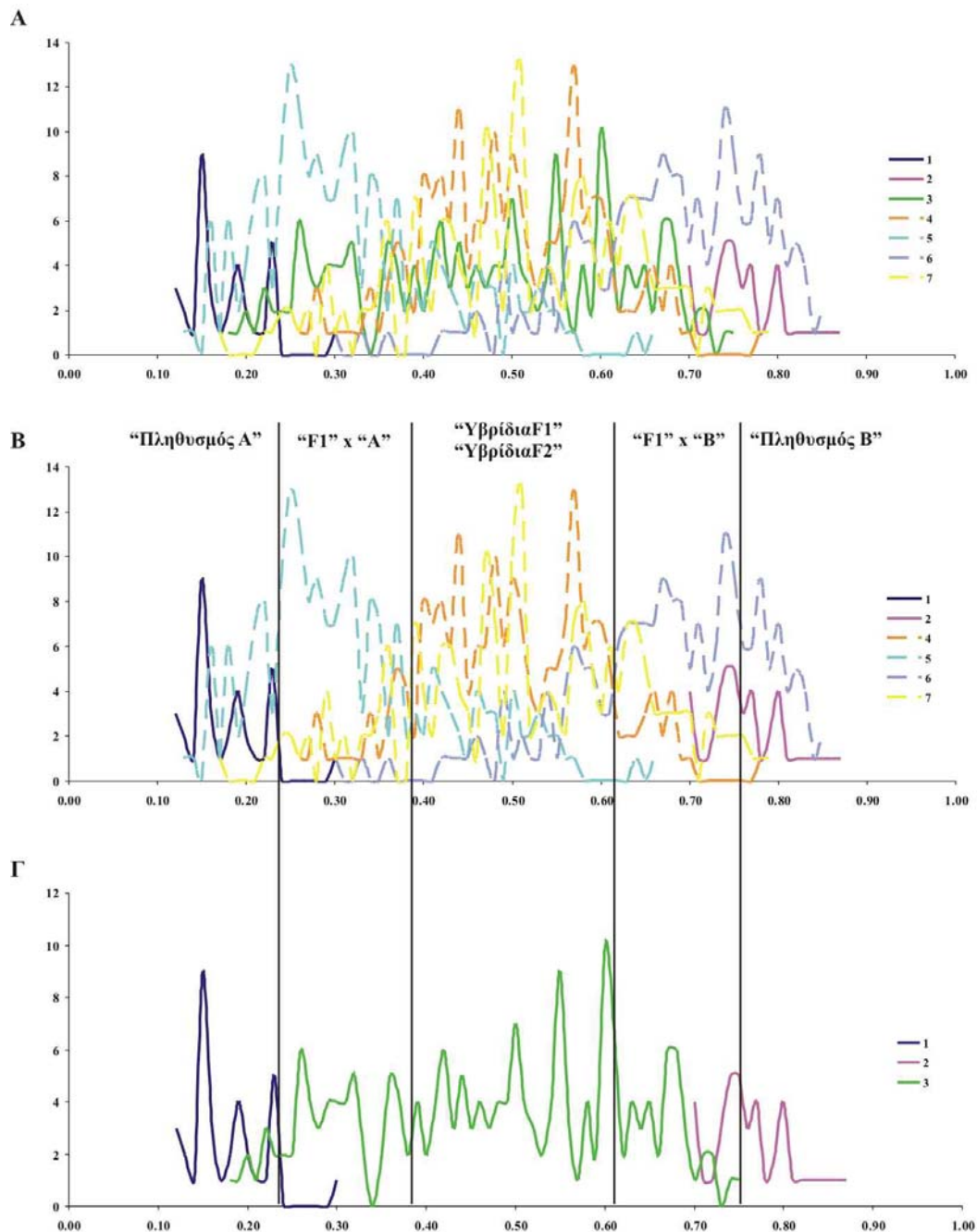
Εικόνα 4.3 Χωροταξική διακύμανση των αλληλικών συχνοτήτων στην περιοχή της ηπειρωτικής Ελλάδας βάσει των αποτελεσμάτων του προγράμματος Wombsoft. **A** Χάρτης διακύμανσης των αλληλικών συχνοτήτων στην περιοχή της ηπειρωτικής Ελλάδας (systemic map ή systemic function). **B** Αποτελέσματα του διωνυμικού ελέγχου, όπου με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα στατιστικά σημαντικά γενετικά όρια που υφίστανται στην περιοχή. Οι μαύρες γραμμές αντικατοπτρίζουν τη μέση κατεύθυνση της διακύμανσης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα γενετικά όρια που αποκαλύπτονται από τον χάρτη διακύμανσης των αλληλικών συχνοτήτων είναι στο σύνολό τους στατιστικά σημαντικά. Το πρώτο όριο εκτείνεται από την περιοχή του Έβρου (σύνορα Ελλάδας με Ευρωπαϊκή Τουρκία και Βουλγαρία) έως την περιοχή των ανατολικών ορίων του νομού Δράμας και το δεύτερο καταλαμβάνει περιοχές της βορειοδυτικής Ελλάδας (νομοί Πέλλας, Κοζάνης, Φλώρινας, Καστοριάς, Γρεβενών, Θεσπρωτίας και Ιωαννίνων). Οι περιοχές εντός των γενετικών ορίων που προαναφέρθηκαν χαρακτηρίζονται από μικρή διαβάθμιση των αλληλικών τους συχνοτήτων.

3.5 Παρουσία πιθανών υβριδίων στη ζώνη επαφής του mtDNA

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρώτης φάσης ανάλυσης του STRUCTURE για $K=2$, ως «πατρικοί» πληθυσμοί ορίστηκαν τα άτομα εκείνα που αντιστοιχούν στα δύο clusters με μεγάλη τιμή του συντελεστή συμμετοχής. Τα αποτελέσματα των δέκα ανεξάρτητων αναλύσεων χαρακτηρίζονται από μεγάλη επαναληψιμότητα, όσον αφορά στη σύνθεση των «πατρικών» πληθυσμών και μόνο ένας μικρός αριθμός ατόμων αφαιρέθηκε από αυτά εξαιτίας της απουσίας τους από το σύνολο των επαναλήψεων (3 άτομα από το πρώτο και 7 από το δεύτερο cluster). Αναλυτικότερα, τα άτομα εκείνα που κατατάσσονται σε ένα από τα δύο clusters με συντελεστές συμμετοχής $q > 0,95$ φτάνουν τα 75 (27,9%), ενώ τα υπόλοιπα 194 (72,1%) αποτελούν άτομα με χαμηλότερους συντελεστές και επομένως θεωρήθηκαν ως πιθανά «υβρίδια» των «πατρικών» πληθυσμών. Το πρώτο cluster περιλαμβάνει 35 άτομα (13%), ενώ το δεύτερο αποτελείται από 40 άτομα (14,9%).

Μετά τη δημιουργία των υβριδίων πρώτης και δεύτερης γενιάς και ανάδρομων διασταυρώσεων ακολούθησε η δεύτερη φάση ανάλυσης με το πρόγραμμα STRUCTURE για $K=2$. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνοψίζονται στην **Εικόνα 4.4**, όπου παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών q ανά κατηγορία (2 πατρικοί πληθυσμοί, πιθανά υβρίδια, προσομοιωμένα υβρίδια πρώτης και δεύτερης γενιάς και προσομοιωμένα υβρίδια ανάδρομων διασταυρώσεων). Σύμφωνα με την κατανομή των τιμών q ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των «υβριδίων» σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει 100 άτομα, τα οποία αποτελούν πιθανά υβρίδια πρώτης και δεύτερης γενιάς (υβρίδια F1 και F2). Οι δύο αυτές γενιές υβριδίων είναι αδύνατο να διαχωριστούν μεταξύ τους εξαιτίας της αλληλεπικάλυψης των κατανομών τους, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως σε κεντρικά σημεία του γραφήματος. Η δεύτερη περιλαμβάνει 59 άτομα που πιθανώς προέκυψαν από ανάδρομες διασταυρώσεις των υβριδίων με τον πρώτο πατρικό πληθυσμό (A, cluster1 με μπλε χρώμα) και εντοπίζονται κυρίως στην αριστερή πλευρά του γραφήματος, ενώ η τρίτη περιλαμβάνει 35 άτομα που αποτελούν πιθανούς απογόνους των υβριδίων με τον δεύτερο πατρικό πληθυσμό (B, cluster2 με ροζ χρώμα) και εντοπίζονται κυρίως στη δεξιά πλευρά του γραφήματος. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι και οι δύο ομάδες προσομοιωμένων υβριδίων ανάδρομων διασταυρώσεων κατανέμονται τόσο πλησίον όσο και εντός των περιοχών του γραφήματος, όπου εντοπίζονται οι αντίστοιχοι πατρικοί πληθυσμοί. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε πολύ μικρό βαθμό και στα άτομα που θεωρήθηκαν ως πιθανά υβρίδια ανάδρομων διασταυρώσεων.



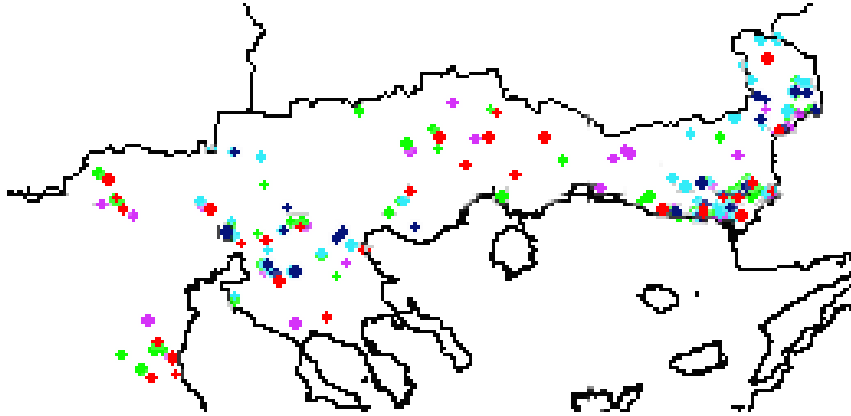
Εικόνα 4.4 Γραφική παράσταση του αριθμού των ατόμων ως προς τους συντελεστές συμμετοχής (q). Στο σύνολο των ατόμων περιλαμβάνονται οι δύο πιθανοί πατρικοί πληθυσμοί [Πληθυσμός Α (μπλε γραμμή) και Πληθυσμός Β (ροζ γραμμή)] και τα άτομα που παρουσιάζονται ως υβρίδια αυτών (πράσινη γραμμή), όπως προέκυψαν από την πρώτη ανάλυση του STRUCTURE για $K=2$. Με διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται τα προσομοιωμένα υβρίδια που δημιουργήθηκαν βάσει του προγράμματος HybridLab [υβρίδια F1 (πορτοκαλί γραμμή), υβρίδια F2 (κίτρινη γραμμή), υβρίδια ανάδρομης διασταύρωσης με Πληθυσμό Α (F1 x A) (γαλάζια γραμμή) και υβρίδια ανάδρομης διασταύρωσης με Πληθυσμό Β (F1 x B) (μωβ γραμμή)]. Οι κάθετες γραμμές αντικατοπτρίζουν την κατά προσέγγιση κατηγοριοποίηση των υβριδίων στις επιμέρους ομαδοποιήσεις. **Α** Παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών q για το σύνολο των ομάδων. **Β** Παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών q μόνο για τους δύο πατρικούς πληθυσμούς και τα προσομοιωμένα υβρίδια. **Γ** Παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών q μόνο για τους δύο πατρικούς πληθυσμούς και τα άτομα που εμφανίζονται ως υβρίδια αυτών.

Το σύνολο των παραπάνω κατηγοριών αποτελεί διακριτές πληθυσμιακές μονάδες οι οποίες διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά ($p < 0,0001$) μεταξύ τους. Καμία από τις κατηγορίες αυτές δεν εμφανίζεται σε ισορροπία HW, ενώ η πλειοψηφία των υπό μελέτη μικροδορυφορικών τόπων εμφανίζει έλλειμμα ετεροζυγωτίας και κανένας από αυτούς δεν εμφανίζει έλλειμμα ομοζυγωτίας. Η διαφοροποίηση των δύο «πατρικών» πληθυσμών ως προς τον δείκτη F_{ST} είναι στατιστικά σημαντική και ισούται με 0,213. Οι αμέσως χαμηλότερες τιμές διαφοροποίησης παρατηρούνται μεταξύ του ενός πατρικού πληθυσμού και της κατηγορίας ατόμων των ανάδρομων διασταυρώσεων με τον άλλο «πατρικό» πληθυσμό. Η τιμές του δείκτη F_{ST} μεταξύ των πέντε κατηγοριών δίνονται αναλυτικά στον **Πίνακα 4.9**, ενώ η γεωγραφική κατανομή αυτών παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4.5**.

Πίνακας 4.9 Τιμές του δείκτη F_{ST} μεταξύ των πατρικών πληθυσμών και των κατηγοριών υβριδίων όπως προκύπτουν βάσει του προγράμματος STRUCTURE. Με * παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές τιμές βάσει 1000 αντιμεταθέσεων.

F_{ST}	B Πατρικός	Υβρίδια F1 και F2	F1 x A Πατρικό	F1 x B Πατρικό
A Πατρικός	0,21196*	0,10928*	0,03664*	0,16494*
B Πατρικός		0,03941*	0,12056*	-0,00141
Υβρίδια F1 και F2			0,03692*	0,02320*
F1 x A Πατρικό				0,08109*

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η κατανομή των ατόμων του πατρικού πληθυσμού A (μπλε) περιορίζεται σε δύο κυρίως περιοχές (νομοί Έβρου, Θεσσαλονίκης και Κιλκίς). Αντιθέτως, η κατανομή των ατόμων του πατρικού πληθυσμού B (κόκκινο) καταλαμβάνει το σύνολο των περιοχών που μελετήθηκαν, με συνέπεια ο πληθυσμός αυτός να παρουσιάζεται και σε περιοχές από τις οποίες απουσιάζουν άτομα του πατρικού πληθυσμού A. Όσον αφορά τα πιθανά υβρίδια πρώτης και δεύτερης γενιάς (πράσινο), αυτά καταλαμβάνουν το σύνολο των υπό μελέτη περιοχών εκτός του βορειοανατολικού τμήματος του Έβρου. Τα υβρίδια ανάδρομων διασταυρώσεων με τον πατρικό πληθυσμό A (γαλάζιο) παρατηρούνται στην ευρύτερη περιοχή κατανομής του πατρικού πληθυσμού με τον οποίο θεωρείται ότι συζεύχθηκαν. Τέλος, τα υβρίδια που θεωρείται ότι προέκυψαν από ανάδρομες διασταυρώσεις με τον πατρικό πληθυσμό B (μωβ) παρατηρούνται κυρίως στις ευρύτερες περιοχές κατανομής του πατρικού πληθυσμού B, ενώ αρκετά άτομα παρουσιάζονται σε περιοχές από τις οποίες απουσιάζουν άτομα των δύο πατρικών πληθυσμών ή άλλων υβριδίων (π.χ. δυτικές περιοχές του νομού Ροδόπης).



Εικόνα 4.5 Γεωγραφική κατανομή των ατόμων που ορίστηκαν ως πατρικοί πληθυσμοί (με μπλε κουκίδες ο πληθυσμός A και με κόκκινες ο πληθυσμός B), ως υβρίδια πρώτης και δεύτερης γενιάς (F1 και F2 με πράσινες κουκίδες), ως ανάδρομες διασταυρώσεις με τον πατρικό πληθυσμό A (με γαλάζιες κουκίδες) και ως ανάδρομες διασταυρώσεις με τον πατρικό πληθυσμό B (μωβ κουκίδες). Η εικόνα αυτή κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Sundial.

4. Συζήτηση

4.1 Γενικά χαρακτηριστικά των μικροδορυφορικών τόπων

Αριθμός αλληλομόρφων και ισορροπία Hardy-Weinberg

Η χρήση εκκινητών που έχουν αναπτυχθεί σε διαφορετικό από το μελετώμενο είδος, έχει συνήθως ως αποτέλεσμα τη μείωση της αλληλικής ποικιλότητας (Primmer *et al.* 1996, Ellegren *et al.* 1997, Neff & Gross 2001, Wright *et al.* 2004) και επομένως εισάγει έναν βαθμό μεροληψίας στην εκάστοτε μελέτη (Petit *et al.* 2005). Αν και κανένας από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή δεν έχει αναπτυχθεί για τον Ευρωπαϊκό λαγό, ωστόσο οι μικροδορυφορικοί τόποι που μελετήθηκαν χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό ποικιλότητας, όπως προκύπτει από τον μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων που παρατηρούνται ανά γενετικό τόπο.

Η ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού αλληλομόρφων σε χαμηλές συχνότητες, οι θετικές και στατιστικά σημαντικές τιμές του δείκτη F_{IS} ανά γενετικό τόπο, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα δεδομένα στο σύνολό τους δεν βρίσκονται σε ισορροπία HW αποτελούν ενδείξεις της πληθυσμιακής δομής των υπό μελέτη ατόμων.

Ανισορροπία Σύνδεσης

Ο συνδυασμός των δέκα μικροδορυφορικών τόπων που χρησιμοποιήθηκαν δεν φαίνεται να προκαλεί μεροληψία στα αποτελέσματα των αναλύσεων (ιδιαίτερα αυτά των προγραμμάτων STRUCTURE και GENELAND). Η διαπίστωση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης r_{LD} (Hill & Robertson 1968) μεταξύ των ζευγών των μικροδορυφορικών τόπων είναι στο σύνολό τους μικρές και δεν ξεπερνούν το 0,04. Σύμφωνα με τη μελέτη των Kaeuffer *et al.* (2007), τιμές του συντελεστή r_{LD} υψηλότερες του 0,5 χαρακτηρίζουν μικροδορυφορικούς τόπους με μεγάλο βαθμό ανισορροπίας σύνδεσης (η οποία σε αρκετές περιπτώσεις αντιστοιχεί σε φυσικά συνδεδεμένους τόπους). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χρήση τους στις αναλύσεις προγραμμάτων που βασίζονται σε μοντέλα που προϋποθέτουν ισορροπία σύνδεσης (όπως το STRUCTURE) να οδηγεί σε λανθασμένα αποτελέσματα. Σύμφωνα ωστόσο με τον έλεγχο ανισορροπίας σύνδεσης που πραγματοποιήθηκε για το σύνολο των δεδομένων, τρία μόνο ζεύγη μικροδορυφορικών τόπων εμφανίζονται συνδεδεμένα. Βάσει των τιμών του συντελεστή r_{LD} , η σύνδεσή τους αυτή θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην συσχέτιση των αλληλικών συχνοτήτων λόγω της ανάμειξης των πληθυσμών και επομένως στην πληθυσμιακή δομή που χαρακτηρίζει το σύνολο των δεδομένων (Falush *et al.* 2003) είτε στη συσχέτιση μεταξύ συνδεδεμένων τόπων ως αποτέλεσμα της ανάμειξης των πληθυσμών στο πρόσφατο παρελθόν (Pritchard & Wen 2004).

4.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων των προγραμμάτων STRUCTURE και GENELAND

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος STRUCTURE, αν και το σύνολο των δεδομένων χαρακτηρίζεται από πληθυσμιακή δομή ($K \neq 1$), δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του πιθανότερου αριθμού των πληθυσμών (που περιέχονται στα δεδομένα μας), αλλά ούτε και η αντιστοίχιση ατόμων σε αυτούς με υψηλό συντελεστή συμμετοχής (q). Οι Evanno *et al.* (2005) υποστηρίζουν ότι ο αλγόριθμος του προγράμματος έχει την ιδιότητα να εντοπίζει το ανώτερο επίπεδο πληθυσμιακής δομής, ενώ η διαδοχική ανάλυση των ομαδοποιήσεων που προκύπτουν οδηγεί στην εύρεση της πληθυσμιακής υποδιαίρεσης σε κατώτερα επίπεδα. Όμως, το παραπάνω δεν φαίνεται να ισχύει για τα δεδομένα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Παράλληλα, η ανάλυση ολόενα και μικρότερου αριθμού ατόμων (ομαδοποιήσεις που προκύπτουν από το πρόγραμμα) έχει ως αποτέλεσμα την μη αμερόληπτη λειτουργία του προγράμματος, αφού η πληροφορία που εμπεριέχεται στο εκάστοτε δείγμα μειώνεται συνεχώς, καθιστώντας την μη αξιοποιήσιμη. Πιθανόν η ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού γενετικών τόπων, οι οποίοι θα παρέχουν περισσότερη πληροφορία αντισταθμίζοντας ταυτόχρονα την ολόενα και μεγαλύτερη μείωση των ατόμων που θα προκύπτει από τις ομαδοποιήσεις του προγράμματος, να επιτρέψουν την σωστότερη εκτίμηση του αριθμού των πληθυσμών. Η διατύπωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις των Rosenberg *et al.* (2001) και των Evanno *et al.* (2005), βάσει των οποίων η δειγματοληπτική προσπάθεια, τόσο ως προς τον αριθμό των ατόμων, όσο και ως προς τον αριθμό των γενετικών τόπων διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τον ορθό εντοπισμό του αριθμού των πληθυσμιακών μονάδων από το πρόγραμμα STRUCTURE.

Στο STRUCTURE είναι δυνατή η χρήση μοντέλων που λαμβάνουν υπόψη την ανισορροπία σύνδεσης που οφείλεται είτε στην ανάμειξη των πληθυσμών (mixture LD) είτε στην πραγματική σύνδεση μεταξύ γενετικών τόπων, η απόσταση μεταξύ των οποίων στο γονιδίωμα είναι γνωστή (admixture LD). Φαινόμενα σύνδεσης εξαιτίας της ανάμειξης των πληθυσμών παρατηρούνται σε γενετικούς τόπους ακόμα και όταν αυτοί είναι ασύνδετοι ως αποτέλεσμα της συσχέτισης των αλληλικών συχνοτήτων, εξαιτίας της ύπαρξης ατόμων με μεγάλο βαθμό προγονικής συνιστώσας σε έναν πληθυσμό (K), τα οποία φέρουν μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων που είναι κοινά στον πληθυσμό αυτό (K) (Falush *et al.* 2003). Αντιστοίχως, φαινόμενα πραγματικής σύνδεσης τόπων (admixture LD) παρατηρούνται μεταξύ συνδεδεμένων γενετικών τόπων σε πληθυσμούς, που έχουν πρόσφατα αναμειχθεί ως αποτέλεσμα της κοινής προγονικής τους προέλευσης (Pritchard & Wen 2004). Το πρόγραμμα αυτό ωστόσο, δεν είναι σε θέση να αντιμετωπίσει το φαινόμενο κατά το οποίο δύο γενετικοί τόποι συνδέονται μεταξύ τους και διαχωρίζονται από μικρό αριθμό βάσεων (λίγα cM) (background LD). Η background LD δημιουργείται από την τυχαία γενετική παρέκκλιση και αναμένεται να είναι ισχυρή όσο μικρότερη είναι η απόσταση μεταξύ των γενετικών τόπων.

Στις περιπτώσεις εκείνες, όπου η background LD είναι ισχυρή, οδηγεί σε παραπλανητικά αποτελέσματα (Falush *et al.* 2003). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από τα φαινόμενα ανάμειξης, οι πληθυσμιακοί στενωποί, το φαινόμενο του ιδρυτή (Lynch & Walsh 1998) και άλλες σημαντικές δημογραφικές μεταβολές (Slatkin 1994) θα μπορούσαν να δημιουργήσουν ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης και να αυξήσουν την παρουσία της background LD (Puffenberger *et al.* 1994, Jorde 2000, Peltonen 2000).

Οι προϋποθέσεις του μοντέλου στο οποίο βασίζεται το πρόγραμμα STRUCTURE είναι δύο τύπων. Υπάρχει μια εκ των προτέρων κατανομή (prior distribution) μη παρατηρούμενων ποσοτήτων (κυρίως ομαδοποίησης και αλληλικών συχνοτήτων) και μια συνάρτηση πιθανότητας, η οποία συνδέει αυτές τις άγνωστες παραμέτρους με τους παρατηρούμενους γονότυπους. Στα πλαίσια της Μπεϋζιανής ανάλυσης, η εκ των προτέρων κατανομή θα πρέπει να αντικατοπτρίζει τη γνώση και την αβεβαιότητα όσον αφορά στις μη παρατηρούμενες παραμέτρους. Στο STRUCTURE (όπως και σε οποιοδήποτε άλλο πρόγραμμα που ομαδοποιεί τα δεδομένα χωρίς να λάβει υπόψη τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων), η κατανομή αυτή είναι ομοιογενής και επομένως σταθερή. Ως συνέπεια αυτού, το σύνολο των πιθανών ομαδοποιήσεων θεωρείται εξίσου πιθανό. Το γεγονός αυτό είναι σχεδόν αντίθετο με την αντίληψη της έρευνας διαφοροποιημένων πληθυσμών. Εξαιρώντας τις περιπτώσεις πρόσφατης διείσδυσης γονιδιώματος (introgression) ή της ύπαρξης φραγμάτων μεταξύ των πληθυσμών λόγω της ηθολογίας των υπό μελέτη οργανισμών, στις οποίες η σταθερότητα της κατανομής έχει βιολογικό νόημα, διαφοροποίηση αναμένεται μόνο στις περιπτώσεις εκείνες που οι πληθυσμοί διαχωρίζονται είτε εξαιτίας γεωγραφικών-οικολογικών φραγμάτων είτε λόγω απόστασης (Coulon *et al.* 2006). Επιπρόσθετα, αν και έχουν εξευρεθεί τρόποι για τον προσδιορισμό του πιθανότερου αριθμού των πληθυσμών βάσει των δεδομένων (μέθοδος του Evanno *et al.* 2005), η αποτελεσματικότητά τους παραμένει αδιευκρίνιστη μέχρι σήμερα.

Οι ομαδοποιήσεις που προέκυψαν βάσει του προγράμματος GENELAND, αποκαλύπτουν την έντονη επίδραση του νησιωτισμού στους πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαού. Στις ομαδοποιήσεις αυτές υπάρχουν έντονες ενδείξεις διαφοροποίησης των πληθυσμών της κεντρικής Ευρώπης από αυτούς της Βαλκανικής, ενώ ταυτόχρονα οι πληθυσμοί της Ελλάδας και οι νοτιο-ανατολικότεροι αυτών (Κύπρος, Ισραήλ) διαφοροποιούνται από τους πληθυσμούς της Σερβίας (και σε μικρότερο βαθμό από αυτούς της Βουλγαρίας βάσει των τιμών F_{ST}). Αρκετές από τις ομαδοποιήσεις έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του mtDNA των πληθυσμών. Αναλυτικότερα, οι κοινές μεταξύ των δύο δεικτών ομαδοποιήσεις που παρατηρούνται είναι αυτή της Μυτιλήνης με τη Σάμο, της Κρήτης με τη Νάξο και της Πελοποννήσου με μικρό αριθμό ατόμων από την Κρήτη. Το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ατόμων της Κρήτης αποτελεί διακριτή ομαδοποίηση οδηγεί στη διατύπωση της υπόθεσης ότι η μικρή ομάδα ατόμων που εμφανίζει εντονότερη συγγένεια

με τα άτομα της Πελοποννήσου, είναι πιθανό να συνιστά αποτέλεσμα μετατόπισης ατόμων από την Πελοπόννησο στην Κρήτη. Το γεγονός ότι τα άτομα της Σερβίας ομαδοποιούνται με αυτά των Κυθήρων θα μπορούσε να οφείλεται σε πολλές αιτίες, όπως σε δράσεις μετατόπισης πληθυσμών, σε φαινόμενα ομοπλασίας, αλλά και στην εγκαθίδρυση κοινών μεταξύ των ομαδοποιήσεων αλληλομόρφων ως αποτέλεσμα της έντονης δράσης της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης στους νησιωτικούς πληθυσμούς των Κυθήρων. Η στενή σχέση που εμφανίζουν τα άτομα της Ιταλίας με την ηπειρωτική Ελλάδα οφείλεται πιθανώς στο μικρό δειγματοληπτικό μέγεθος της πρώτης σε συνδυασμό με την υψηλή ποικιλότητα που παρατηρείται στην περιοχή της ηπειρωτικής Ελλάδας (που πιθανώς υπερκαλύπτει και αυτή της Ιταλίας). Η παρουσία των ατόμων της Χίου και της Ρόδου στην ομαδοποίηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στην τυχαία γενετική παρέκκλιση είτε σε δράσεις μετατοπίσεων.

Αν και η χρήση του προγράμματος GENELAND επέτρεψε τον προσδιορισμό του αριθμού των πληθυσμιακών μονάδων που χαρακτηρίζουν τα δεδομένα, η έλλειψη σύγκλισης των τιμών πιθανοφάνειας (η μέγιστη τιμή πιθανοφάνειας παρατηρήθηκε μόνο μια φορά στις 20 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν) δημιουργεί ερωτήματα που αφορούν στην αποτελεσματικότητα του αλγορίθμου που χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα αυτό. Η «συμπεριφορά» αυτή του αλγορίθμου δεν μπορεί μέχρι στιγμής να αποδοθεί σε κάποιο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό των δεδομένων ή της μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται (προσωπική επικοινωνία με Guillot G.). Αυτό όμως είναι αναμενόμενο όταν χρησιμοποιούνται προγράμματα που δεν έχουν δοκιμαστεί ευρέως σε πραγματικά δεδομένα, έτσι ώστε να είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους σε διάφορους τύπους δεδομένων και περιπτώσεων. Για παράδειγμα, ο εντοπισμός «μεταναστών» και απογόνων αυτών, ο βαθμός εσφαλμένης εκτίμησης «αυτόχθονων» ατόμων ως «μετανάστες» σε έναν πληθυσμό και η συμπεριφορά του μοντέλου όσον αφορά παλαιότερες γενιές «μεταναστών» (π.χ. γενιές F1, F2 και ανάδρομες διασταυρώσεις «μεταναστών») αποτελούν παραμέτρους οι οποίες θα πρέπει να διερευνηθούν (Guillot *et al.* 2005).

Πιθανή ερμηνεία των “ghost” πληθυσμών οι οποίοι εμφανίζονται ορισμένες φορές στην ανάλυση πραγματικών δεδομένων από το πρόγραμμα GENELAND είναι ότι αποτελούν σπάνια επισκεπτόμενες περιοχές του αλγορίθμου της MCMC που χρησιμοποιείται στα μοντέλα ανάμειξης (Falush *et al.* 2003). Τέτοιου είδους πληθυσμοί συνιστάται να αγνοούνται από τον χρήστη (Guillot *et al.* 2005).

Συνεπώς αν και οι ομαδοποιήσεις που προκύπτουν παραπέμπουν σε μια αναμενόμενη δομή των πληθυσμών, τόσο εξαιτίας της γεωγραφικής τους προέλευσης (νησιώτικοι και ηπειρωτικοί πληθυσμοί), όσο και λόγω της εξελικτικής τους ιστορίας (βλέπε mtDNA, Κεφάλαιο III), θα πρέπει να θεωρηθούν ενδεικτικές. Αιτία αποτελεί η έλλειψη μελετών αποτίμησης της αποτελεσματικότητας του προγράμματος και των προβλημάτων που

παρουσιάζει. Ένα από τα κυριότερα στοιχεία που αποκαλύπτεται βάσει της παρούσας μελέτης είναι η αδυναμία των σύγχρονων μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν, να αποκαλύψουν με σαφήνεια και σημαντικότητα την υποκείμενη πληθυσμιακή δομή των δεδομένων. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να είναι κανείς πολύ επιφυλακτικός και να προσπαθεί να ελέγξει ποικιλοτρόπως τα αποτελέσματα των αναλύσεων μέχρι τη στιγμή εκείνη που θα δημιουργηθούν νέα πιο αξιόπιστα εργαλεία, τα οποία θα προσεγγίζουν ακόμα περισσότερο την πολυπλοκότητα των φυσικών πληθυσμών, ιδιαίτερα αυτών που χαρακτηρίζονται από συνεχείς κατανομές.

4.3 Πληθυσμιακή διαφοροποίηση

Η πληθυσμιακή διαφοροποίηση, που αποκαλύπτεται από τον γεωγραφικό ορισμό των πληθυσμιακών μονάδων, είναι η εντονότερη που έχει αναφερθεί ποτέ για το είδος. Οι θετικές τιμές F_{IS} , οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικές, αποτελούν ισχυρή ένδειξη ελλείμματος ετεροζυγωτίας και επομένως περαιτέρω υποδιαίρεσης των δεδομένων (αρχή του Wahlund) (Gillespie 1998). Το γεγονός ότι στην πλειοψηφία των ομαδοποιήσεων (και για τις δύο ομάδες δεδομένων) παρατηρείται έλλειμμα ετεροζυγωτίας για τον μεγαλύτερο αριθμό γενετικών τόπων, καθιστά πολύ πιθανή την ύπαρξη πληθυσμιακής δομής εντός αυτών. Παράλληλα μειώνει την πιθανότητα ύπαρξης υψηλών ποσοστών μηδενικών αλληλομόρφων, χωρίς ωστόσο να την απορρίπτει, η παρουσία των οποίων δεν φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα του GENELAND (Guillot *et al.* 2008).

Παρατηρώντας τον πίνακα των τιμών F_{ST} (Πίνακας 4.6), το πρότυπο διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών χαρακτηρίζεται από αρκετά κοινά στοιχεία με αυτό που προέκυψε από τις αναλύσεις του mtDNA. Η γενικότερη τάση που παρατηρείται είναι οι πληθυσμοί «δυτικού» τύπου mtDNA να διαφοροποιούνται εντονότερα από τον πληθυσμό της Χίου, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως «ανατολικός», ενώ αυτοί με «ανατολικό» τύπο mtDNA να διαφοροποιούνται εντονότερα από τον πληθυσμό της Ζακύνθου, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως «δυτικός». Οι χαμηλές τιμές F_{ST} που εμφανίζει η ομαδοποίηση της ηπειρωτικής Ελλάδας από όλες τις υπόλοιπες ομαδοποιήσεις, επιβεβαιώνει τον ορισμό αυτής ως καταφύγιο (πηγή) για το είδος κατά τη διάρκεια των Παγετωδών περιόδων του Πλειστοκαίνου. Τέλος, είναι χαρακτηριστική η μικρή διαφοροποίηση που παρατηρείται μεταξύ των ατόμων της Βουλγαρίας από αυτά της Πελοποννήσου, η οποία μπορεί να ερμηνευθεί είτε από δράσεις μετατοπίσεων είτε από φαινόμενα ομοπλασίας των υπό μελέτη μικροδορυφορικών τόπων. Στενή σχέση παρουσιάζουν επίσης οι πληθυσμοί της κεντρικής Ευρώπης μεταξύ τους, αλλά και ο πληθυσμός της Αυστρίας με αυτόν της Βουλγαρίας. Το γεγονός αυτό είναι πιθανώς ενδεικτικό της κοινής τους καταγωγής και της μεταξύ τους γονιδιακής ροής, χωρίς ωστόσο να είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε το ποσοστό αυτής που οφείλεται στις δράσεις μετατόπισης ατόμων τους από τον άνθρωπο.

Η διαφοροποίηση των ομαδοποιήσεων που προέκυψαν από το πρόγραμμα GENELAND είναι υψηλή, χωρίς ωστόσο να φτάνει τα επίπεδα αυτής που υπολογίστηκε βάσει της γεωγραφικής ομαδοποίησης των ατόμων. Οι ομαδοποιήσεις που διαφοροποιούνται εντονότερα από τις υπόλοιπες είναι αυτές των ατόμων της Μυτιλήνης και της Σάμου, καθώς και των ατόμων της Κύπρου και του Ισραήλ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του mtDNA τα άτομα της Κύπρου, του Ισραήλ, της Μυτιλήνης και της Σάμου χαρακτηρίζονται ως «ανατολικού» τύπου και επομένως η έντονη διαφοροποίησή τους θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την εξελικτική ιστορία των πληθυσμών αυτών. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η μεγαλύτερη διαφοροποίηση παρατηρείται μεταξύ πολύ απομακρυσμένων πληθυσμών των δύο τύπων mtDNA (Μυτιλήνη-Σάμος με Γαλλία-Γερμανία-Αυστρία).

Από την άλλη πλευρά, το γεγονός ότι τα άτομα τις Χίου («ανατολικός» τύπος mtDNA) συμπεριλαμβάνονται στην ομαδοποίηση που μεταξύ άλλων περιλαμβάνει και τα άτομα της ηπειρωτικής Ελλάδας, αφήνει υπόνοιες ύπαρξης ομοπλασίας ή έντονης δράσης της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης, χωρίς ωστόσο να είναι δυνατόν να απορριφθούν τυχόν υποθέσεις μετατοπίσεων στο νησί. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ομαδοποίηση της Χίου, χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές F_{ST} όταν συγκρίνεται με τις υπόλοιπες ομαδοποιήσεις. Συμπερασματικά, το κατά πόσο οι ομαδοποιήσεις και η διαφοροποίηση μεταξύ αυτών ταυτίζεται με την εξελικτική ιστορία του είδους στην περιοχή, όπως αυτή αποκαλύφθηκε από το mtDNA, αποτελεί ερώτημα το οποίο δεν μπορεί εύκολα να απαντηθεί, αφού ούτε αναιρείται, αλλά ούτε επιβεβαιώνεται μέσω της ανάλυσης των γονοτύπων των υπό μελέτη μικροδορυφορικών τόπων. Ωστόσο, αυτό που μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα είναι η έντονη επίδραση του νησιωτισμού στους πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού, η οποία είναι μικρότερη για τα νησιά του Ιονίου, γεγονός που μπορεί να οφείλεται τόσο σε μια παλαιότερη χρονολογικά εποίκηση των νησιών του Αιγαίου, όσο και σε μεγάλο βαθμό γονιδιακής ροής μεταξύ των περιοχών της ηπειρωτικής Ελλάδας με τα νησιά του Ιονίου. Θεωρητικά, η ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού μικροδορυφορικών τόπων θα βοηθήσει στη μείωση του «θορύβου» και στην αποκάλυψη των παλαιότερων εξελικτικών διαδικασιών που επέδρασαν στους πληθυσμούς αυτούς.

4.4 Γενετικά Όρια

Ο εντοπισμός των γενετικών ορίων σε περιοχές της βορειοανατολικής και δυτικής Μακεδονίας είναι συμβατός με τα αποτελέσματα του mtDNA. Είναι γνωστό ότι τα γενετικά όρια, που αντικατοπτρίζουν περιοχές στις οποίες λαμβάνουν χώρα διάφορες εξελικτικές διαδικασίες και χαρακτηρίζονται από έντονη γενετική μεταβολή, είναι πολύ πιθανό να ορίζουν ζώνες επαφής μεταξύ διαφοροποιημένων ομάδων (Endler 1977 από Crida & Manel 2007). Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό τα γενετικά όρια, όπως αυτά καθορίστηκαν μέσω των

μικροδορυφορικών τόπων, να αποτελούν ζώνες επαφής μεταξύ διαφοροποιημένων πληθυσμών.

Η γενετική μεταβολή που παρατηρείται στη ΒΑ Ελλάδα είναι εντονότερη αυτής που παρατηρείται στις δυτικές περιοχές της χώρας. Η διαφορά αυτή, πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι στην ΒΑ Ελλάδα υπάρχουν πιο έντονα διαφοροποιημένοι ή/και πολυπληθέστεροι πληθυσμοί από ότι στη δυτική Μακεδονία. Είναι πολύ πιθανό, επομένως, το ανατολικό γενετικό όριο να δημιουργείται, εξαιτίας της συνύπαρξης στην περιοχή ατόμων «ανατολικού» και «δυτικού» τύπου σε υψηλές συχνότητες, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του mtDNA. Το ανατολικό γενετικό όριο καλύπτει την περιοχή έκτασης της ζώνης επαφής του mtDNA και εκτείνεται ακόμα δυτικότερα αυτής. Ένα τέτοιου είδους πρότυπο έχει παρατηρηθεί σε περιοχές ζωνών επαφής, με το πυρηνικό γονιδίωμα να διαχέεται με πολύ πιο γρήγορους ρυθμούς από ότι το μιτοχονδριακό (π.χ. Morgan-Richards *et al.* 2000).

Όσον αφορά στο γενετικό όριο των περιοχών της βορειοδυτικής Ελλάδας, η παρουσία του θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην ύπαρξη ατόμων «ανατολικού» και «δυτικού» τύπου, με τον πρώτο να εμφανίζεται σε χαμηλότερες συχνότητες, είτε στην επαφή των πληθυσμών της Ελλάδας με άλλους πληθυσμούς βορειότερα αυτών (π.χ. της Σερβίας ή περιοχών που συνορεύουν με την Ελλάδα, η γενετική σύσταση των οποίων δεν είναι για την ώρα γνωστή). Τα αποτελέσματα του mtDNA δεν είναι σε θέση να υποστηρίξουν την μια εκ των δύο υποθέσεων, αφού παρά το ότι στην περιοχή έχουν παρατηρηθεί μόνο άτομα με «δυτικό» τύπο mtDNA δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα παρουσίας σε αυτή και ατόμων «ανατολικού» τύπου. Η αλληλούχηση mtDNA περισσότερων ατόμων από τη περιοχή αυτή θα βοηθήσει στην διαλεύκανση της παραπάνω υπόθεσης. Επιπλέον, η απουσία πληροφορίας για τη γενετική ποικιλότητα και τη διαφοροποίηση των πληθυσμών του λαού, που εντοπίζονται βορειότερα της περιοχής αυτής, σε συνδυασμό με την διαφοροποίηση που παρουσιάζουν τα άτομα της Σερβίας από αυτά της ηπειρωτικής Ελλάδας ($F_{ST} = 6,3\%$), καθιστά τη δεύτερη υπόθεση εξίσου πιθανή με την πρώτη.

4.5 Παρουσία υβριδίων στη ζώνη επαφής του mtDNA

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα STRUCTURE κατέστη δυνατός ο εντοπισμός δύο διακριτών πληθυσμών, οι οποίοι είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν τους δύο «πατρικούς» πληθυσμούς. Με τον όρο αυτό περιγράφονται ουσιαστικά δύο διαφοροποιημένοι πληθυσμοί, οι συζεύξεις μεταξύ των οποίων έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή γενετικά «ενδιάμεσων» ως προς αυτούς ατόμων (υβρίδια). Τα υβρίδια πρώτης γενιάς (F1) ουσιαστικά αντιπροσωπεύουν ένα δείγμα των ατόμων που προκύπτουν από τη διασταύρωση των δύο πατρικών πληθυσμών, ενώ αυτά της δεύτερης γενιάς (F2), καθώς και των ανάδρομων διασταυρώσεων (B2) αντιπροσωπεύουν όλους τους πιθανούς συνδυασμούς διασταυρώσεων

μεταξύ των τριών παραπάνω κατηγοριών. Γενικότερα πιστεύεται ότι η έγκυρη αναγνώριση υβριδίων, που προκύπτουν από ανάδρομες διασταυρώσεις, είναι ευκολότερη από αυτή των υβριδίων πρώτης γενιάς (Vaha & Primmer 2006).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τις δεύτερης ανάλυσης του STRUCTURE, αν και ήταν δυνατή η κατηγοριοποίηση των ατόμων με ενδιάμεσες τιμές δεικτών συμμετοχής (q) (άτομα που θεωρούνται «υβρίδια» των δύο πατρικών πληθυσμών) σε υβρίδια πρώτης και δεύτερης γενιάς, παρατηρείται υψηλό ποσοστό αλληλεπικάλυψης, πάντα βάσει των τιμών q , των προσομοιωμένων υβριδίων ανάδρομων διασταυρώσεων με τους πατρικούς πληθυσμούς. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε αντίστοιχες μελέτες (π.χ. Vaha & Primmer 2006) και αποδίδεται στα μειονεκτήματα της χρησιμοποιούμενης μεθοδολογίας, όπως οι ρυθμίσεις των (εκ των προτέρων) κατανομών των παραμέτρων των μοντέλων (Beaumont & Rannala 2004).

Επιπρόσθετα, το όριο του συντελεστή συμμετοχής που θεσπίζεται από τον χρήστη για τον καθορισμό των πατρικών πληθυσμών, επιδρά αντιστρόφως ανάλογα στο ποσοστό των ατόμων ανάδρομων διασταυρώσεων, που αντιστοιχούν στους πατρικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Pritchard *et al.* (2000) ένας αρκετά μεγάλος αριθμός γενετικών τόπων απαιτείται για αξιόπιστες εκτιμήσεις των τιμών q του κάθε ατόμου, ακόμα και στις περιπτώσεις εκείνες όπου οι αλληλικές συχνότητες των πατρικών πληθυσμών είναι γνωστές και το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων (7/8) προέρχεται από την ανάμειξη των πληθυσμών. Σημαντικό ρόλο στον αποτελεσματικό καθορισμό των υβριδίων παίζει το ποσοστό των υβριδίων. Μικρό ποσοστό υβριδίων, αν και μειώνει την πιθανότητα εντοπισμού τους, αυξάνει την ακρίβεια με την οποία τα υβρίδια που εντοπίζονται κατηγοριοποιούνται στις διάφορες κατηγορίες. Με άλλα λόγια, αν και εντοπίζεται μικρότερος αριθμός υβριδίων, ο διαχωρισμός τους από τους πατρικούς πληθυσμούς είναι πολύ πιο ακριβής από ότι σε δεδομένα, που περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό υβριδίων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται η παρουσία διαδοχικών γενεών υβριδίων, αναμένεται το ποσοστό των υβριδίων να υποεκτιμηθεί (Vaha & Primmer 2006). Σύμφωνα με τους Vaha & Primmer (2006), η αναγνώριση ατόμων-υβριδίων θα μπορούσε πιθανώς να επιτευχθεί με τη χρήση συνδεδεμένων τόπων.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του mtDNA και τους χρόνους διαφοροποίησης των δύο μιτοχondριακών κλάδων είναι πολύ πιθανό η δευτερογενής επαφή των δύο ομάδων να πραγματοποιήθηκε πριν από πολλές γενιές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι αυξημένη η πιθανότητα να απουσιάζουν από το δείγμα μας αμιγή άτομα των δύο πατρικών πληθυσμών ή να υπάρχει ένα μικρό μόνο ποσοστό αυτών. Συνεπώς στην περιοχή της ΒΑ Ελλάδας υπάρχουν δύο έντονα διαφοροποιημένες ομάδες ατόμων, οι οποίες υβριδίζουν παράγοντας γόνιμους απογόνους. Η διαδικασία αυτή πιθανώς ξεκίνησε από τη στιγμή που οι δύο αυτές ομάδες ήρθαν σε επαφή και συνεχίζεται μέχρι και σήμερα. Το γεγονός ότι τα υβρίδια πρώτης και δεύτερης γενιάς είναι αδύνατο να διαχωριστούν μεταξύ

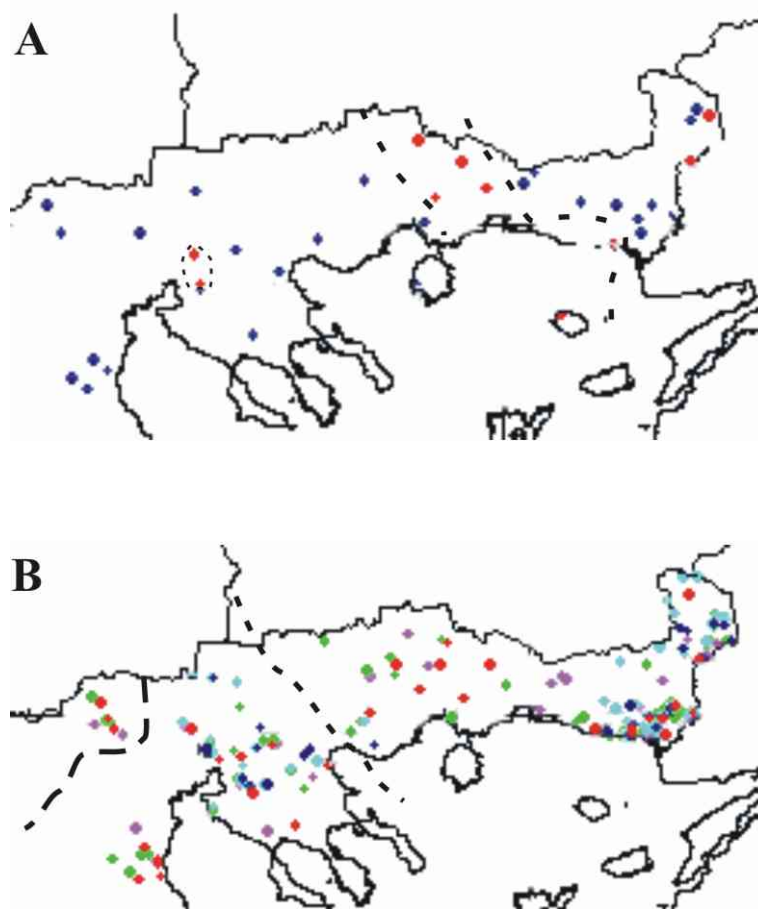
τους, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, είναι ενδεικτικό του βαθμού πολυπλοκότητας που καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε μελετώντας πληθυσμούς, που κατανέμονται σε συνεχή γεωγραφικό χώρο. Η δυσκολία αυτή, σε συνδυασμό με την έλλειψη αποτελεσματικών εργαλείων ανάλυσης, καθιστά απαραίτητη την μελέτη ενός μεγαλύτερου αριθμού μικροδορυφορικών τόπων για τη διερεύνηση της πρόσφατης εξελικτικής ιστορίας του είδους στην περιοχή.

4.6 Ζώνη επαφής βάσει mtDNA και μικροδορυφορικών τόπων

Το πρότυπο της γεωγραφικής κατανομής των γενετικών ορίων που εντοπίστηκαν στην περιοχή της βόρειας Ελλάδας έρχεται σε συμφωνία με το πρότυπο κατανομής των πατρικών και υβριδικών πληθυσμών. Τα γενετικά όρια εντοπίζονται στις περιοχές εκείνες, όπου είναι αυξημένη η συχνότητα του πατρικού πληθυσμού B και των υβριδίων ανάδρομων διασταυρώσεων με αυτόν. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των μικροδορυφορικών τόπων με αυτά του mtDNA παρατηρούμε μεγάλο βαθμό ομοιότητας στο γεωγραφικό πρότυπο κατανομής των ομαδοποιήσεων που προκύπτουν από τους δύο δείκτες. Για την καλύτερη δυνατή αντίληψη των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται σε αντιπαράθεση τα γεωγραφικά πρότυπα που αποκαλύπτονται βάσει των δύο γενετικών δεικτών στην **Εικόνα 4.6**. Αναλυτικότερα, η κατανομή του πατρικού πληθυσμού B παρουσιάζει υψηλό βαθμό ταύτισης με αυτή των ατόμων του «ανατολικού» τύπου mtDNA. Η ανατολική ζώνη επαφής του mtDNA εντοπίζεται εντός της περιοχής έντονης μεταβολής των αλληλικών συχνοτήτων των μικροδορυφορικών τόπων. Στη περιοχή αυτή, όπου εντοπίζονται μόνο άτομα «ανατολικού» μιτοχονδριακού τύπου, παρουσιάζονται με μεγάλη συχνότητα άτομα του πατρικού πληθυσμού B και υβρίδια ανάδρομων διασταυρώσεων με αυτόν και με μικρότερη συχνότητα παρατηρούνται υβρίδια πρώτης και δεύτερης γενιάς. Ο πατρικός πληθυσμός A και τα υβρίδια ανάδρομων διασταυρώσεων με αυτόν εντοπίζονται σε περιορισμένες περιοχές, ενώ απουσιάζουν από την περιοχή εντός των ορίων της ζώνης επαφής του mtDNA των νομών Ροδόπης, Ξάνθης και Δράμας. Με άλλα λόγια είναι πολύ πιθανό ο πατρικός πληθυσμός A να αντιστοιχεί στον «δυτικό» τύπο mtDNA και ο πατρικός πληθυσμός B στον «ανατολικό» τύπο mtDNA.

Η αδυναμία προσδιορισμού έντονης μεταβολής των αλληλικών συχνοτήτων στην περιοχή του νομού Θεσσαλονίκης οφείλεται στον μεγάλο αριθμό ατόμων, τόσο από τους δύο πατρικούς πληθυσμούς, όσο και από τις κατηγορίες υβριδίων. Ένας μεγάλος αριθμός ατόμων του πατρικού πληθυσμού B και των υβριδίων ανάδρομων διασταυρώσεων με αυτόν, παρατηρείται σε περιοχές, οι οποίες βάσει του mtDNA, καταλαμβάνονται από τον «δυτικό» τύπο (γενετικό όριο που εντοπίζεται στη βορειοδυτική Ελλάδα). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται είτε στον μικρότερο αριθμό δειγμάτων, που αναλύθηκαν ως προς το

mtDNA, είτε στην πιθανότητα ύπαρξης ατόμων που χαρακτηρίζονται από «δυτικό» τύπο mtDNA και «ανατολικό» τύπο πυρηνικού DNA.



Εικόνα 4.6 A: Γεωγραφικό πρότυπο κατανομής των δύο μιτοχονδριακών τύπων λαγού στην περιοχή της βόρειας Ελλάδας. Με διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται τα γενετικά φράγματα που εντοπίστηκαν στην περιοχή. **B:** Γεωγραφικό πρότυπο κατανομής των δύο πατρικών πληθυσμών και των υβριδίων πρώτης και δεύτερης γενιάς, καθώς και των δύο κατηγοριών ανάδρομων διασταυρώσεων. Ο χρωματικός συμβολισμός των κατηγοριών είναι ίδιος με αυτόν της **Εικόνας 4.5**. Με διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται τα γενετικά όρια που εντοπίζονται στην περιοχή.

Τέλος, η περιορισμένη κατανομή του πατρικού πληθυσμού A και των υβριδίων ανάδρομων διασταυρώσεων με αυτόν είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στην μεταγενέστερη παρουσία αυτού συγκριτικά με τον πληθυσμό B, ο οποίος βρισκόταν ήδη εγκαθιδρυμένος στην περιοχή. Ως εκ τούτου ο αριθμός των διασταυρώσεων ήταν μεγαλύτερος με τα άτομα του πληθυσμού B από ότι με του A (συχνοεξαρτώμενος υβριδισμός). Εναλλακτική ή συμπληρωματική υπόθεση θα μπορούσε να αποτελεί ο οικολογικός ή/και ηθολογικός περιορισμός τους στις περιοχές αυτές, λόγω του ενδοειδικού ανταγωνισμού των δύο διαφοροποιημένων ομάδων.

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του mtDNA φαίνεται ότι ο «ανατολικός» τύπος εποίκισε πρώτος την περιοχή αυτή, έχοντας ήδη εγκαθιδρύσει πληθυσμούς κατά τη χρονική στιγμή που έφτασε ο «δυτικός». Κατά την επαφή των δύο διαφοροποιημένων ομάδων δημιουργήθηκαν υβρίδια, η πλειοψηφία των οποίων αποτελεί διασταυρώσεις πρώτης και δεύτερης γενιάς και κυρίως ανάδρομες διασταυρώσεις με τον «ανατολικό» τύπο. Η ευρεία γεωγραφική κατανομή των υβριδίων πρώτης και δεύτερης γενιάς είναι πιθανά ενδεικτική του μεγαλύτερου βαθμού αρμοστικότητάς τους.

4.7 Σύγκριση με μελέτες του είδους βάσει μικροδορυφορικών τόπων

Όπως αναδείχθηκε από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στο κεφάλαιο της εισαγωγής, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το είδος και βασίζονται στην ανάλυση μικροδορυφορικών δεικτών είναι περιορισμένες. Ακόμα όμως και στον μικρό αυτό αριθμό μελετών, η άμεση σύγκριση των τιμών διαφοροποίησης, καθώς και άλλων πληθυσμιακών μεταβλητών με αυτές της παρούσας μελέτης, είναι αδύνατη, εξαιτίας τόσο των διαφορετικών μεταξύ τους δειγματοληπτικών σχεδιασμών, όσο και των διαφορετικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν. Αναλυτικότερα θεωρούμε αδύνατη τη σύγκριση των εκτιμήσεων των πληθυσμιακών παραμέτρων μεταξύ μελετών, που βασίζονται στην ανάλυση διαφορετικού δειγματοληπτικού μεγέθους (αριθμός ατόμων και έκταση περιοχής). Για παράδειγμα, η δημοσιευμένη εργασία με το μεγαλύτερο αριθμό ατόμων είναι αυτή των Fickel *et al.* (2005), που περιλαμβάνει 307 άτομα από περιοχή διαμέτρου ~250 km. Επιπλέον, ο εκ των προτέρων ορισμός των πληθυσμών που γίνεται στις εργασίες αυτές, που όπως έχει ήδη αναφερθεί προκαλεί υψηλό βαθμό μεροληψίας στις εκτιμώμενες παραμέτρους, καθιστά την σύγκριση προβληματική. Ο βαθμός μεροληψίας αυξάνει ακόμα περισσότερο στις περιπτώσεις εκείνες, όπου οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται είναι επιρρεπείς σε σημαντικά σφάλματα, όπως αυτές που βασίζονται στην εκτίμηση γενετικών αποστάσεων και την προβολή αυτών βάσει φυλογενετικών δένδρων (π.χ. Andersson *et al.* 1999, Estonba *et al.* 2006, Thulin *et al.* 2006b). Για τους λόγους αυτούς, θεωρήσαμε σκόπιμο η σύγκριση να πραγματοποιηθεί μόνο ως προς τα βασικά χαρακτηριστικά των γενετικών τόπων και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Βάσει αυτών, η πληροφορία που παρέχεται από την ανάλυση των μικροδορυφορικών τόπων, αν και επιτρέπει τον διαειδικό διαχωρισμό, με σημαντικό βαθμό γονιδιακής ροής (Andersson *et al.* 1999, Estonba *et al.* 2006, Thulin *et al.* 2006b, Ben Slimen *et al.* 2008), αδυνατεί να περιγράψει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών σε επίπεδο είδους (Andersson *et al.* 1999, Fickel *et al.* 1999, Fickel *et al.* 2005, Estonba *et al.* 2006). Στο σύνολο των μελετών, οι πληθυσμοί του είδους εμφανίζουν ισχυρή μεταξύ τους γονιδιακή ροή και επομένως γενετική ομοιογένεια. Στην πλειοψηφία των μελετών, οι πληθυσμοί, όπως αυτοί ορίστηκαν διαφέρουν, όμως οι τιμές των δεικτών F-statistics είναι

μικρές και σε αρκετές περιπτώσεις μη στατιστικά σημαντικές. Σε αντίθεση με την υπάρχουσα για το είδος βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ενδεικτικά της έντονης πληθυσμιακής δομής του είδους, η οποία δεν εξαντλείται στους νησιώτικους πληθυσμούς, αλλά και σε πληθυσμούς περιοχών της ηπειρωτικής Ελλάδας (ζώνη επαφής) και της Πελοποννήσου. Αν και ο νησιωτισμός αποτελεί τη βασική αιτία διαφοροποίησης των πληθυσμών, δεν φαίνεται να είναι η μόνη. Επιπλέον αιτίες θα μπορούσαν να αποτελούν: α) η διαφοροποίηση των πληθυσμών που έδρασαν ως πηγή και β) η χρονική στιγμή εποίκησης (και επομένως ο χρόνος παραμονής) των πληθυσμών σε αυτά.

Ο βαθμός διαφοροποίησης, που παρατηρείται στην παρούσα μελέτη (μέγιστες τιμές F_{ST} στις δύο ομάδες δεδομένων 0,18-0,47) και ιδιαίτερα αυτός που παρατηρείται μεταξύ των διακριτών ομαδοποιήσεων ($F_{ST} = 0,21$) της βόρειας Ελλάδας, είναι εφάμιλλος ή υπερβαίνει τις υψηλότερες τιμές, που έχουν αναφερθεί μεταξύ ειδών του γένους *Lepus* (βάσει επτά μικροδορυφορικών τόπων οι τιμές F_{ST} κυμαίνονται από 0,18 έως 0,24 μεταξύ πληθυσμών των ειδών *L. timidus* και *L. europaeus* της Σουηδίας) (Thulin *et al.* 2006b).

Οι μέχρι σήμερα μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσπάθεια εντοπισμού υβριδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών του γένους *Lepus* είναι τέσσερις και αφορούν πληθυσμούς που βρίσκονται σε συμπάτρια κατάσταση (Andersson *et al.* 1999, Estonba *et al.* 2006, Thulin *et al.* 2006a, Thulin *et al.* 2006b). Σε δύο από αυτές, αν και υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις υβριδισμού μεταξύ των ειδών (μορφολογικές, οικολογικές και ενδείξεις βάσει του mtDNA), δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός τους (Andersson *et al.* 1999, Estonba *et al.* 2006). Το γεγονός αυτό αποδόθηκε από τους συγγραφείς στην έλλειψη διακριτικής ικανότητας των μικροδορυφορικών τόπων που χρησιμοποιήθηκαν. Στις μελέτες, ωστόσο, των Thulin *et al.* (2006a, 2006b), κατέστη δυνατή η εύρεση υβριδίων μεταξύ του Ευρωπαϊκού και του ορεσίβιου λαγού, εξαιτίας του συνδυασμού της πληροφορίας που παρέχεται από τους μικροδορυφορικούς τόπους (πυρηνικό DNA) και από το μιτοχονδριακό DNA (διείσδυση γονιδιώματος mtDNA από τον ορεσίβιο στον Ευρωπαϊκό λαγό). Ωστόσο, στην περίπτωση των υβριδίων του Ευρωπαϊκού της Βαλκανικής, ο καθορισμός των υβριδίων βασίστηκε εξολοκλήρου στα δεδομένα των μικροδορυφορικών τόπων, ενώ η πληροφορία που παρέχεται από το mtDNA χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει τις υποθέσεις, που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής.

Στο σύνολο των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για τον Ευρωπαϊκό λαγό παρατηρείται ασυμφωνία μεταξύ του βαθμού διαφοροποίησης όπως αυτή εκτιμάται μέσω του mtDNA και των μικροδορυφορικών τόπων, η οποία αποδίδεται στη φυλοεξαρτώμενη διασπορά του είδους (Fickel *et al.* 1999, Thulin *et al.* 2006b), με τα θηλυκά άτομα να χαρακτηρίζονται από φιλοπατρική συμπεριφορά. Ορισμένες οικολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πληθυσμούς του είδους επιβεβαιώνουν μια τέτοιου είδους συμπεριφορά των θηλυκών ατόμων, όπου τα άτομα των δύο φύλων εμφανίζουν διαφορετικό

εύρος χωροκράτειας (10-18 ha για τα αρσενικά και 3,6-6,9 ha για τα θηλυκά) (Schneider 1978). Άλλες πάλι εργασίες αδυνατούν να εντοπίσουν διαφοροποίηση στη μεταναστευτική δραστηριότητα μεταξύ των δύο φύλων (Marboutin 1977). Η αλήθεια είναι πολύ πιθανό να βρίσκεται κάπου στη μέση, αφού το εύρος χωροκράτειας επηρεάζεται τόσο από τη χρονική στιγμή, όσο και από τη διάρκεια της δειγματοληψίας (Fickel *et al.* 2005). Ωστόσο, το εύρος χωροκράτειας δεν σχετίζεται απαραίτητα με αναπαραγωγικώς επιτυχείς μεταναστεύσεις και επομένως με διαφορετικό πρότυπο γονιδιακής ροής μεταξύ των δύο φύλων.

Η συμφωνία που παρατηρείται μεταξύ του μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA στους λαγούς της Βαλκανικής αποτελεί την πρώτη περίπτωση για το είδος, καθιστώντας ωστόσο τις υποθέσεις που διατυπώθηκαν παραπάνω, εξίσου πιθανές. Με άλλα λόγια, δεν παρατηρούνται ισχυρές ενδείξεις διαφορικής μεταναστευτικής δραστηριότητας μεταξύ των δύο φύλων, χωρίς ωστόσο να είναι δυνατή η απόρριψή της.

Συμπερασματικά, οι λαγοί της Ελλάδας παρουσιάζουν έντονη πληθυσμιακή δομή και διαφοροποιούνται σημαντικά από αυτούς της υπόλοιπης Ευρώπης, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις μετατοπίσεων από τις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες. Εξαίρεση θα μπορούσαν να αποτελούν μετατοπίσεις από τη Βουλγαρία, οι οποίες δεν ήταν δυνατό να εντοπιστούν αφού τα δείγματά από τη Βουλγαρία δεν συμπεριλήφθηκαν σε τμήμα των αναλύσεων (με το πρόγραμμα Geneland), λόγω απουσίας της γεωγραφικής προέλευσης των ατόμων. Η πληθυσμιακή δομή του είδους στην ηπειρωτική Ελλάδα είναι ισχυρή και χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό πολυπλοκότητας, κυρίως εξαιτίας της παρουσίας υβριδίων μεταξύ διαφοροποιημένων πληθυσμών.

4.8 Γενικά συμπεράσματα

Ο συνδυασμός της πληροφορίας που παρέχεται από το σύνολο των γενετικών δεικτών που αναλύθηκαν οδηγεί στην διατύπωση μιας υπόθεσης που αφορά στην εξελικτική ιστορία του είδους στην υπό μελέτη περιοχή. Σύμφωνα με αυτή, ο Ευρωπαϊκός λαγός, κατά τη διασπορά του από τις περιοχές της Ασίας προς την Ευρώπη, ήρθε αντιμέτωπος με τις Παγετώδεις περιόδους του Πλειστοκαίνου. Κατά τη διάρκεια αυτών, προγονικοί πληθυσμοί του είδους παρέμειναν στα χαρακτηρισμένα καταφύγια του Καυκάσου, όπου και διαφοροποιήθηκαν σε δύο ομάδες στις βόρειες και νότιες πλαγιές αυτού («δυτικός» και «ανατολικός» τύπος). Οι δύο αυτές ομάδες ακολούθησαν στη συνέχεια (κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους) διαφορετικές μεταναστευτικές οδούς προς τη Βαλκανική. Ο «ανατολικός» τύπος εποίκισε πρώτα τις περιοχές της Ανατολίας και τα παράλια αυτής (πιθανώς και του Ισραήλ) και στη συνέχεια επεκτάθηκε βορειότερα, μέσω των στενών των Δαρδανελίων και του Βοσπόρου σε περιοχές της Ευρωπαϊκής Τουρκίας και της ΒΑ Ελλάδας. Ο «δυτικός» τύπος διέγραψε διαφορετική πορεία, ακολουθώντας μονοπάτια βόρεια της Μαύρης θάλασσας, εποικίζοντας έτσι τις περιοχές της Ελλάδας από το βορρά. Κατά τη

μετανάστευσή τους αυτή, οι δύο ομάδες λαγών αντιμετώπισαν σειρά Παγετωδών περιόδων, κατά τη διάρκεια των οποίων είναι πολύ πιθανό να έμειναν σε καταφύγια της Ανατολίας και των Καρπαθίων αντίστοιχα.

Ο «ανατολικός» τύπος πιθανότατα εποίκισε πρώτος τον ελληνικό χώρο και εγκαθίδρυσε στην περιοχή πληθυσμούς πριν την εποίκησή του από τον «δυτικό» τύπο. Με την έλευση του «δυτικού» τύπου στην περιοχή, ακολούθησε η δευτερογενής επαφή των δύο πολύ διαφοροποιημένων πλέον ομάδων, που οδήγησε στην παραγωγή υβριδίων.

Η παρουσία πληθυσμών λαγού στα περισσότερα νησιά του Αιγαίου (νησιά Ανατολικού Αιγαίου) έλαβε χώρα μέσω φυσικής διασποράς του είδους σε αυτά. Αν και η ανθρωπόχωρη μεταφορά των πληθυσμών λαγού στο νησί της Κύπρου φαίνεται πιο πιθανή, βάσει της γεωλογικής ιστορίας του, η έλλειψη γενετικής πληροφορίας από την Ανατολία δεν επιτρέπει την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής. Αντιθέτως κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να είναι εξίσου πιθανό για τους πληθυσμούς του λαγού της Κρήτης και αυτό εξαιτίας την έντονης διαφοροποίησης που παρουσιάζουν, καθώς και της παρουσίας ενός μικρού μόνο αριθμού δειγμάτων της που αντιστοιχούν σε πληθυσμούς της Πελοποννήσου.

Τέλος, οι πιθανές δράσεις μετατοπίσεων πληθυσμών δεν φαίνεται να έχουν επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό τις αυτόχθονες γενετικές δεξαμενές της Ελλάδας και της Κύπρου. Ωστόσο, η πραγματοποίηση απελευθερώσεων εκτρεφόμενων ατόμων στο προσεχές μέλλον θα έχει ως αποτέλεσμα τη αλλοίωση της εξελικτικής εικόνας που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί και επομένως τη δυσκολότερη διερεύνηση αυτής. Σύμφωνα με τις μελέτες των Mamuris *et al.* (2001, 2002), οι ανεξέλεγκτες εισαγωγές και απελευθερώσεις ατόμων λαγού, θα μπορούσαν να επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην υπάρχουσα γενετική δομή του είδους και επομένως θα πρέπει να αποφευχθούν. Αντιθέτως, σε πρόσφατη μελέτη από την ίδια ομάδα συγγραφέων (Stamatis *et al.* 2007), η εισαγωγή αλλόχθονων ατόμων λαγού δεν θεωρείται ότι εγκυμονεί κινδύνους και προτείνεται ως κατάλληλη για το χειρισμό ορισμένων καταστάσεων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η θέση που υποστηρίζεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αυτή της αποφυγής των δράσεων απελευθέρωσης εκτρεφόμενων ατόμων. Η πολυπλοκότητα που παρουσιάζει η πληθυσμιακή δομή του είδους στην περιοχή σε συνδυασμό με την έλλειψη κατάλληλων εργαλείων για την σαφή διερεύνησή της, καθιστά τις δράσεις απελευθερώσεων ως ακατάλληλες τουλάχιστον στην παρούσα φάση. Τέτοιου είδους δράσεις θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν μόνο μετά τον ακριβή προσδιορισμό της γενετικής κατάστασης των αυτόχθονων πληθυσμών και εφόσον κριθούν απαραίτητες και κατάλληλες για την διατήρησή της.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαν να διατυπωθούν τα ακόλουθα για το είδος στην περιοχή της Βαλκανικής:

- εμφανίζεται μονοφυλετικό, ενώ απουσιάζουν ενδείξεις διείσδυσης γονιδιώματος

- χαρακτηρίζεται από υψηλή γενετική ποικιλότητα (βάσει nDNA & mtDNA), η οποία αντικατοπτρίζεται σε επίπεδο οικολογίας και αναπαραγωγής
- παρουσιάζει έντονη πληθυσμιακή δομή η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας (π.χ. υβρίδια)
- χαρακτηρίζεται από πληθυσμιακή δομή με έντονη την επίδραση του νησιωτισμού, χωρίς ωστόσο να εξαντλείται σε αυτό αλλά να παρατηρείται έντονη και σε πληθυσμούς των ηπειρωτικών περιοχών
- διακρίνεται σε δύο έντονα διαφοροποιημένους κλάδους με φυλογεωγραφικό πρότυπο, διαφορετικούς εξελικτικούς ρυθμούς και ιστορία
- παρουσιάζει ζώνη επαφής των δύο τύπων mtDNA (B. A. Ελλάδα), με χαρακτηριστική γεωγραφική κατανομή, γεγονός που παρατηρείται και σε επίπεδο πυρηνικού DNA
- δεν χαρακτηρίζεται από στατιστικά σημαντικό πρότυπο IBD πιθανά εξαιτίας της πρόσφατης εποίκισής του στην περιοχή ή/και της οικολογίας και ηθολογίας του
- δεν παρουσιάζει ενδείξεις μετατόπισης πληθυσμών με εξαίρεση τους πληθυσμούς από το νησί της Λευκάδας
- χαρακτηρίζεται από πρότυπο γενετικής ποικιλότητας το οποίο δεν επιβεβαιώνει την υποειδική ταξινόμηση του είδους

4.9 Προοπτικές

Η μελλοντικές προεκτάσεις της έρευνας ως προς την πληθυσμιακή γενετική του είδους στην περιοχή προϋποθέτουν τη διεύρυνση των δεδομένων, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο. Αναλυτικότερα, κρίνεται απαραίτητη η ενσωμάτωση στα δείγματα πληθυσμών από περιοχές της Ανατολίας και των γειτονικών προς την Ελλάδα περιοχών. Στόχο της προσπάθειας αυτής θα αποτελεί η καλύτερη αντιπροσώπευση της κατανομής του είδους στην ευρύτερη περιοχή, η ενσωμάτωση του μεγαλύτερου ποσοστού ποικιλότητας που περιέχεται σε αυτή, καθώς και η επιβεβαίωση ή απόρριψη των υποθέσεων που διατυπώθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσπάθεια συσχέτισης των προτύπων γεωγραφικής κατανομής των δύο τύπων δεδομένων η οποία ωστόσο δεν βασίστηκε στη σύγχρονη ανάλυση ατόμων για τους δύο τύπους γενετικών δεικτών. Δεδομένης της δυναμικής της δειγματοληψίας και του πειραματικού προγραμματισμού, καθώς και του αριθμού των ατόμων που μελετήθηκαν κάτι τέτοιο δεν θα ήταν εφικτό σε εύλογο χρονικό πλαίσιο. Η πολύπλευρη και πολύτιμη πληροφορία που παρέχεται από τη σύγχρονη μελέτη ατόμων για έναν αριθμό γενετικών τόπων σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθιστά τη μελέτη των αλληλουχιών mtDNA των ατόμων που εμφανίζονται ως πατρικοί πληθυσμοί, προτεραιότητα για τη μελέτη της ζώνης υβριδισμού.

Η μελέτη επίσης ενός μεγαλύτερου αριθμού γενετικών δεικτών αναμένεται να βελτιώσει την εικόνα που έχουμε σήμερα για τους υπό μελέτη πληθυσμούς. Στην κατεύθυνση αυτή, η μελέτη του “juxtaposed” συστήματος μικροδορυφορικών τόπων που αποκαλύφθηκε, βάσει τόσο των αλληλουχιών, όσο και των γονοτύπων, σε συνδυασμό με τον ακριβή προσδιορισμό των γονοτύπων του μικροδορυφορικού τόπου SAT-12 θα μπορέσει ενδεχομένως να δια φωτίσει τις διαδικασίες εξελικτικής προσαρμογής των δύο διαφοροποιημένων ομάδων λαού που παρουσιάζονται στην περιοχή.

Ωστόσο, η πραγματοποίηση αυτών απαιτεί και την ανάπτυξη κατάλληλων μεθοδολογικών εργαλείων για την ανάλυσή τους. Τα εργαλεία αυτά θα πρέπει να διέπονται από προϋποθέσεις, οι οποίες θα προσεγγίζουν όσο το δυνατόν περισσότερο την πραγματική κατάσταση των πληθυσμών και θα χαρακτηρίζονται από μεγάλης αξιοπιστίας διερευνητικές πρακτικές. Έμφαση θα πρέπει να δοθεί στην διατύπωση ενός λειτουργικού ορισμού της έννοιας του πληθυσμού, καθώς και στο γεγονός ότι οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg παρατηρούνται σε συνεχή και όχι διακριτή κλίμακα στη φύση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ειδών που χαρακτηρίζονται από συνεχείς χωροταξικές κατανομές. Παράλληλα, τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από τη χρήση των μεθοδολογιών αυτών, όπως και αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη θα πρέπει να θεωρούνται ενδεικτικά της υπάρχουσας κατάστασης, εξαιτίας της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει τους φυσικούς πληθυσμούς.

Τέλος, σημαντικό ρόλο, που δεν πρέπει να υποεκτιμάται, στην ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων, διαδραματίζουν οι διάφορες στατιστικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματα των σύγχρονων μελετών υποδεικνύουν ότι ένα μεγάλο τμήμα των έως σήμερα διαφορών που παρατηρούνται στα αποτελέσματα του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού DNA θα μπορούσε να οφείλεται στη μη σωστή στάθμιση της πληροφορίας, που εμπεριέχεται στα δύο αυτά γονιδιώματα και στην λανθασμένη χρήση της στην απάντηση εξελικτικών ερωτημάτων. Παράλληλα, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στον στατιστικό έλεγχο της σημαντικότητας των παραγόμενων αποτελεσμάτων, όπου αποτελέσματα με ασαφή ή ανεπιβεβαίωτη στατιστική υποστήριξη θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό, αφού η απόλυτη αποδοχή τους είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα.

Εν κατακλείδι, η αποκάλυψη της εξελικτικής ιστορίας των πληθυσμών θα πρέπει να βασίζεται στην πολύπλευρη μελέτη τους, βάσει συνδυασμού της πληροφορίας που παρέχεται από όλους τους τομείς της επιστήμης της βιολογίας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Παράρτημα Ι

1. Πίνακας των δειγμάτων που αναλύθηκαν ως προς το μιτοχονδριακό τους DNA, όπου παρουσιάζονται οι περιοχές προέλευσής τους και οι κωδικοί αριθμοί (Accession numbers) των αλληλουχιών, που έχουν κατατεθεί στη Παγκόσμια Βάση Γενετικών Δεδομένων (GenBank).

Απλότυποι ή/και Άτομα	Περιοχή / Νομός / Επαρχία Δειγματοληψίας	Κωδικός GenBank
Yu28	Mokrin (Σερβία)	Παρούσα μελέτη
Yu32	Mokrin (Σερβία)	Παρούσα μελέτη
D1	Offenburg (Γερμανία)	Παρούσα μελέτη
Yu101	Zitiste (Σερβία)	Παρούσα μελέτη
Yu99	Zitiste (Σερβία)	Παρούσα μελέτη
AUS19	Βιέννη (Αυστρία)	Παρούσα μελέτη
Liv15	N. Βοιωτίας	Παρούσα μελέτη
Liv3	N. Βοιωτίας	Παρούσα μελέτη
NG3	Βορειο-Δυτική Γερμανία	Παρούσα μελέτη
Rodos51	N. Δωδεκανήσου (Ρόδος)	Παρούσα μελέτη
Mac114b	N. Έβρου	Παρούσα μελέτη
Mac64Evr	N. Έβρου	Παρούσα μελέτη
Samothraki1	N. Έβρου (Σαμοθράκη)	Παρούσα μελέτη
Samothraki2	N. Έβρου (Σαμοθράκη)	Παρούσα μελέτη
Samothraki3	N. Έβρου (Σαμοθράκη)	Παρούσα μελέτη
Zakynthos21	N. Ζακύνθου	Παρούσα μελέτη
Crete1435Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete16Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete18Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete218Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete270Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete283Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete61Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete966Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete967Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete970Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete980Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Crete9Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
NHMC52Irk	N. Ηρακλείου	Παρούσα μελέτη
Thassos111	N. Καβάλας (Θάσος)	Παρούσα μελέτη
Kef17	N. Κεφαλληνίας (Κεφαλονιά)	Παρούσα μελέτη
Kef21	N. Κεφαλληνίας (Κεφαλονιά)	Παρούσα μελέτη
Mac100	N. Κιλκίς	Παρούσα μελέτη
Kimolos04	N. Κυκλάδων (Κίμωλος)	Παρούσα μελέτη
Nax10	N. Κυκλάδων (Νάξος)	Παρούσα μελέτη
Pel1Kilinis	N. Κυλλήνης	Παρούσα μελέτη
ElafonisosLak	N. Λακωνίας	Παρούσα μελέτη
NeapoliLak	N. Λακωνίας	Παρούσα μελέτη
Pel181Lak	N. Λακωνίας	Παρούσα μελέτη
Cyprus32Lar	N. Λάρνακας	Παρούσα μελέτη
Cyprus37Lar	N. Λάρνακας	Παρούσα μελέτη
Crete1696Las	N. Λασιθίου	Παρούσα μελέτη
Crete1698Las	N. Λασιθίου	Παρούσα μελέτη
Crete726bLas	N. Λασιθίου	Παρούσα μελέτη
Crete968Las	N. Λασιθίου	Παρούσα μελέτη
Cyprus47Lem	N. Λεμεσού	Παρούσα μελέτη
Myt17	N. Λέσβου	Παρούσα μελέτη

Myt18	N. Λέσβου	Παρούσα μελέτη
Lef33	N. Λευκάδα	Παρούσα μελέτη
Cyprus105Lef	N. Λευκωσίας	Παρούσα μελέτη
Cyprus110Lef	N. Λευκωσίας	Παρούσα μελέτη
Cyprus111Lef	N. Λευκωσίας	Παρούσα μελέτη
Mac62	N. Ξάνθης	Παρούσα μελέτη
Mac67Xanthi	N. Ξάνθης	Παρούσα μελέτη
Cyprus123Paf	E. Πάφου	Παρούσα μελέτη
Cyprus125Paf	E. Πάφου	Παρούσα μελέτη
Cyprus68Paf	E. Πάφου	Παρούσα μελέτη
Cyt1	N. Πειραιά (Κύθηρα)	Παρούσα μελέτη
Cyt15	N. Πειραιά (Κύθηρα)	Παρούσα μελέτη
Cyt25	N. Πειραιά (Κύθηρα)	Παρούσα μελέτη
Ard12	N. Πέλλας	Παρούσα μελέτη
Per12	N. Πιερίας	Παρούσα μελέτη
Crete1273Re	N. Ρεθύμνου	Παρούσα μελέτη
Crete244Re	N. Ρεθύμνου	Παρούσα μελέτη
Crete469Re	N. Ρεθύμνου	Παρούσα μελέτη
Crete474Re	N. Ρεθύμνου	Παρούσα μελέτη
Crete475Re	N. Ρεθύμνου	Παρούσα μελέτη
Crete915Re	N. Ρεθύμνου	Παρούσα μελέτη
Mac161	N. Ροδόπης	Παρούσα μελέτη
Mac61	N. Ροδόπης	Παρούσα μελέτη
Samos41	N. Σάμου	Παρούσα μελέτη
Samos45	N. Σάμου	Παρούσα μελέτη
Samos47	N. Σάμου	Παρούσα μελέτη
Samos65	N. Σάμου	Παρούσα μελέτη
BulPP177	Σύνορα Ελλάδας-Βουλγαρίας	Παρούσα μελέτη
BulPP25	Σύνορα Ελλάδας-Βουλγαρίας	Παρούσα μελέτη
Art5	N. Τρικόλων	Παρούσα μελέτη
Liv6	N. Φθιώτιδας	Παρούσα μελέτη
Flr7	N. Φλώρινας	Παρούσα μελέτη
Mac98	N. Χαλκιδικής	Παρούσα μελέτη
Crete1271Xania	N. Χανίων	Παρούσα μελέτη
Crete1294Xania	N. Χανίων	Παρούσα μελέτη
Crete1302Xania	N. Χανίων	Παρούσα μελέτη
Crete1303Xania	N. Χανίων	Παρούσα μελέτη
Crete1310Xania	N. Χανίων	Παρούσα μελέτη
Crete721Xania	N. Χανίων	Παρούσα μελέτη
CHI11	N. Χίου	Παρούσα μελέτη
CHI13	N. Χίου	Παρούσα μελέτη
CHI4	N. Χίου	Παρούσα μελέτη
CHI6	N. Χίου	Παρούσα μελέτη
Ark1_2_18 (B10)	N. Αρκαδίας	AY466807
Ark7 (B11)	N. Αρκαδίας	AY466808
Art4 (B26)	N. Άρτας	AY466823
Art9 (B30)	N. Άρτας	AY466827
Leul6	Αυστρία	AF157439
Liv1 (B29)	N. Βοιωτίας	AY466826
Bul1709 (B32)	Βουλγαρία	AY466829
Bul2890 (B31)	Βουλγαρία	AY466828
Bul2897 (B41)	Βουλγαρία	AY466838
Bul2900 (B40)	Βουλγαρία	AY466837
Grv1 (B38)	N. Γρεβενών	AY466835
Grv11 (B27)	N. Γρεβενών	AY466824
Grv5 (B23)	N. Γρεβενών	AY466820
Grv7 (B25)	N. Γρεβενών	AY466822
MacA12 (B45)	N. Δράμας	AY466842
MacA4_59_63_64 (A1)	N. Δράμας/Θες/νίκης/Εβρου	AY466782
Rod1 (A9)	N. Δωδεκανήσου (Ρόδος)	AY466790
Rod2 (A8)	N. Δωδεκανήσου (Ρόδος)	AY466789

ALX2 (A2)	N. Έβρου	AY466783
Mac70 (B43)	N. Έβρου	AY466840
Mac71_77_99 (B47)	N. Έβρου	AY466844
Mac85 (B46)	N. Έβρου	AY466843
Leu2	Εθνικό Πάρκο Abruzzo (Ιταλία)	AF157454
Bel2_Kok8 (B37)	N. Θεσ/νίκης, Κιλκίς	AY466834
Mac60 (B36)	N. Θεσσαλονίκης	AY466833
Mac62 (A3)	N. Θεσσαλονίκης	AY466784
Mac65 (A5)	N. Θεσσαλονίκης	AY466786
Mac73 (B48)	N. Θεσσαλονίκης	AY466845
Art1 (B22)	N. Ιωαννίνων	AY466819
Mac79 (A4)	N. Καβάλας	AY466785
Nax7 (B12)	N. Κυκλάδων (Νάξος)	AY466809
CYP1 (A14)	E. Λεμεσού	AY466795
Myt1_8_16 (A7)	N. Λέσβου	AY466788
Lef_Ith8 (B55)	N. Λευκάδα	AY466852
Lam14 (B34)	N. Μαγνησίας	AY466831
Leu1	Όρος Cusna (Ιταλία)	AF157453
CYP15 (A13)	E. Πάφου	AY466794
CYP2 (A12)	E. Πάφου	AY466793
Cyt16 (B9)	N. Πειραιά (Κύθηρα)	AY466806
Cyt5_10 (B8)	N. Πειραιά (Κύθηρα)	AY466805
Ard20 (B24)	N. Πέλλας	AY466821
Per18 (B21)	N. Πιερίας	AY466818
Per2_15 (B44)	N. Πιερίας	AY466841
SAM1_5_6 (A6)	N. Σάμου	AY466787
MacA2_80_90 (B42)	N. Σερρών/Καβάλας/Ροδόπης	AY466839
Lam12_13_1 (B35)	N. Φθιώτιδας/Μαγνησίας	AY466832
Flr16 (B33)	N. Φλώρινας	AY466830
Flr17 (B28)	N. Φλώρινας	AY466825
Han1 (B5)	N. Χανίων	AY466802
Han7 (B7)	N. Χανίων	AY466804
CHI1 (A10)	N. Χίου	AY466791
CHI9_17 (A11)	N. Χίου	AY466792
LN3	B. Ισραήλ (Hulata Ha'ufon)	AY466797
Lcapensismediterraneus (Lme2)(1 individual)	Ιταλία:Σαρδηνία	AF157458
Lgranatensis Lgr1 (1 individual)	Ισπανία	AF157432
Lcorsicanus Lco4 (2 individuals)	Νότια Ιταλία: Campania	AF157422

2. Πίνακας αριθμού αλληλουχιών και απλοτύπων mtDNA που παρατηρούνται ανά γεωγραφική περιοχή (νομό, νησί ή επαρχία). Στις τελευταίες σειρές παρουσιάζονται οι περιοχές εκείνες που χαρακτηρίζονται από κοινούς απλοτύπους, καθώς και ο αριθμός των απλοτύπων αυτών.

Γεωγραφική Περιοχή (νομός, επαρχία νησί)	Αριθμός αλληλουχιών	Αριθμός Απλοτύπων		
N. Έβρου	10	7	Ηπειρωτική Ελλάδα	
N. Περίας	4	3		
N. Θεσ/κης	7	6		
N. Άρτας	2	2		
N. Τρικάλων	1	1		
N. Φθιώτιδας	3	2		
N. Μαγνησίας	2	2		
N. Φλώρινας	3	3		
N. Σερρών	1	1		
N. Ιωαννίνων	1	1		
N. Δράμας	5	4		
N. Γρεβενών	4	4		
N. Ροδόπης	2	2		
N. Πέλλας	2	2		
N. Κιλκίς	2	2		
N. Βοιωτίας	3	3		
N. Καβάλας	2	2		
N. Ξάνθης	1	1		
N. Χαλκιδικής	1	1		
Θάσος	1	1		Ελληνικά Νησιά
Ζάκυνθος	1	1		
Κεφαλλονιά	2	2		
Λευκάδα	3	2		
Νάξος	2	1		
Κίμωλος	1	1		
Κύθηρα	6	3		
Σαμοθράκη	3	1		
Ρόδος	3	3		
Μυτιλήνη	5	1		
Σάμος	7	2		
Χίος	7	4		
Κρήτη				
N. Ηρακλείου	13	4		
N. Λασιθίου	4	2		
N. Ρεθύμνου	6	3		
N. Χανίων	8	5		
N. Λακωνίας	3	2	Πελοπόννησος	
N. Αρκαδίας	4	2		
N. Ηλείας	1	1		
E. Πάφου	5	4	Κύπρος	
E. Λευκωσίας	3	2		
E. Λεμεσού	2	2		
E. Λάρνακας	2	2		
Βουλγαρία	4	4	Άλλες Χώρες	
Σερβία				

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Zitiste	2	2
Mokrin	2	2
Αυστρία	2	2
Γερμανία	2	2
Ιταλία	2	2
Ισραήλ	1	1

Κοινοί Απλότυποι

Αρκαδίας-Λακωνίας	5	1
Ηρακλείου-Ρεθύμνου- Λασιθίου-Χανίων	20	1
Δράμας-Θες/κης- Έβρου	5	1
Λεμεσού-Λάρνακας- Πάφου-Λευκωσίας	5	1
Έβρου-Θάσος	2	1
Zitiste-Mokrin	2	1
Ροδόπης-Θες/κης	2	1
Σερρών-Καβάλας- Ροδόπης	3	1
Φθιώτιδας-Μαγνησίας	3	1
Θες/κης-Κιλκίς	2	1

Σύνολο	143	99
---------------	------------	-----------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abildgård F, Andersen J, Barnorff-Nielsen O (1972) The hare population (*Lepus europaeus*, Pallas) of Illumø Island, Denmark. A report on the analysis of the data from 1959 to 1970. . *Danish Review of Game Biology* **6**, 1-31.
- Adachi J, Hasegawa M (1996) Instability of quartet analyses of molecular sequence data by the maximum likelihood method: The Cetacea/Artiodactyla relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 72-76.
- Aksu AE, Hiscott RN, Yasar D (1999) Oscillating Quaternary water levels of the Marmara Sea and vigorous outflow into the Aegean Sea from the Marmara Sea Black Sea drainage corridor. *Marine Geology* **153**, 275-302.
- Alroy J (1999) The fossil record of North American mammals: Evidence for a Paleocene evolutionary radiation. *Systematic Biology* **48**, 107-118.
- Alves PC, Branco M, Matias O, Ferrand N (2000) New genetic variation in European hares, *Lepus granatensis* and *L-europaeus*. *Biochemical Genetics* **38**, 87-96.
- Alves PC, Ferrand N (1999) Genetic variability in Portuguese populations of the Iberian hare, *Lepus granatensis*. *Folia Zoologica* **48**, 3-10.
- Alves PC, Ferrand N, Suchentrunk F, Harris DJ (2003) Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L-granatensis* and *L-europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 70-80.
- Alves PC, Goncalves H, Santos M, Rocha A (2002) Reproductive biology of the Iberian hare, *Lepus granatensis*, in Portugal. *Mamm. biol.* **67**, 358-371.
- Amaya JN, Alsina MG, Brandani AA (1979) Ecologia de la liebre europea *Lepus europaeus* P. Parte 2. In: *Reproduccion y peso corporal de una poblacion del area de San Carlos de Bariloche*. Ecologia y Control de la Fauna Silvestre.
- Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill AVS (2006) Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* **7**, 10-14.
- Andersson AC, Thulin CG, Tegelstrom H (1999) Applicability of rabbit microsatellite primers for studies of hybridisation between an introduced and a native hare species. *Hereditas* **130**, 309-315.
- Angelici FM, Luiselli L (2001) Distribution and status of the Apennine hare *Lepus corsicanus* in continental Italy and Sicily. *Oryx* **35**, 245-249.
- Angelici FM, Riga F, Boitani L, Luiselli L (2000) Fate of captive-reared brown hares *Lepus europaeus* released at a mountain site in central Italy. *Wildlife Biology* **6**, 173-178.
- Angermann R, Flux JEC, Chapman JA, Smith AT (1990) Lagomorph classification. In: *Rabbits, Hares and Pikas: Status Conservation Action Plan* (eds. Chapman JA, Flux

- JEC), pp. 7–13. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland.
- Arnason U, Adegoke JA, Bodin K, Born EW, Esa YB, Gullberg A, Nilsson M, Short RV, Xu XF, Janke A (2002) Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8151-8156.
- Arnold HR (1993) *Distribution Maps of the Mammals of the British Isles* Institute of Terrestrial Ecology, Abbots Ripton.
- Averianov A, Niethammer J, Pegel M (2003) *Lepus europaeus* Pallas, 1778 - Feldhase. In: *Handbuch der Säugetiere Europas: Hasentiere* (ed. Krapp F), pp. 35-104. Aula-Verlag, Wiebelsheim, Germany.
- Averianov AO (1999) Phylogeny and classification of Leporidae (Mammalia, Lagomorpha). *Vestnik Zoologii* **33**, 41–48.
- Avise JC (1991) 10 unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial-DNA. *Annual Review of Genetics* **25**, 45-69.
- Avise JC (2000) *Phylogeography. The history and Formation of Species* Harvard University Press.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography - the Mitochondrial-DNA Bridge between Population-Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Avise JC, Bowen BW, Lamb T (1989) DNA Fingerprints from Hypervariable Mitochondrial Genotypes. *Molecular Biology and Evolution* **6**, 258-269.
- Avise JC, Walker D, Johns GC (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1707-1712.
- Ayala FJ (1997) Vagaries of the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7776-7783.
- Azzaroli Pucetti ML, Corti M, Scanzani A, Civitelli MV, Cappana E (1996) Karyotypes of two endemic species of hare from Ethiopia, *Lepus habessinicus* and *L. starcki* (Lagomorpha, Leporidae). A comparison with *L. europaeus*. *Mammalia* **60**, 223–230.
- Beaumont MA, Rannala B (2004) The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics* **5**, 251-261.
- Beck NR, Double MC, Cockburn A (2003) Microsatellite evolution at two hypervariable loci revealed by extensive avian pedigrees. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 54-61.

- Berli P (2004) Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. *Molecular Ecology* **13**, 827-836.
- 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.
- Ben Slimen H, Suchentrunk F, Memmi A, Elgaaied ABA (2005) Biochemical genetic relationships among Tunisian hares (*Lepus* sp.), South African Cape hares (*L. capensis*), and European brown hares (*L. europaeus*). *Biochemical Genetics* **43**, 577-598.
- Ben Slimen H, Suchentrunk F, Memmi A, Sert H, Kryger U, Alves PC (2006) Evolutionary relationships among hares from North Africa (*Lepus* sp.), South African cape hares (*L. capensis*), and European brown hares (*L. europaeus*), as inferred from mtDNA PCR-RFLP and allozyme data. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **44** 88-99.
- Ben Slimen H, Suchentrunk F, Stamatis C, Mamuris Z, Sert H, Alves PC, Kryger U, Shahin AB, Elgaaied ABA (2008) Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): A test of Petter' s hypothesis of conspecificity. *Biochemical Systematics and Ecology* **36**, 22-39.
- Bennett KD, Tzedakis PC, Willis KJ (1991) Quaternary Refugia of North European Trees. *Journal of Biogeography* **18**, 103-115.
- Bergengren A (1969) On genetics, evolution and history of distribution of the heath-hare, a distinct population of the Arctic hare, *Lepus timidus* Lin. *Viltrevy* **6**, 381-460.
- Berger A (1992) *Le climat de la Terre. Un Passé Pour Quel Avenir?* De Boeck-Wesmael, Bruxelles.
- Bhagwat SA, Willis KJ (2008) Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits? *Journal of Biogeography* **35**, 464-482.
- Biju-Duval C, Ennaffaa H, Dennebouy N, Monnerot M, Mignotte F, Soriguer RC, Gaaied AE, Hili AE, Mounolou J-C (1991) Mitochondrial DNA Evolution in Lagomorphs: Origin of Systematic Heteroplasmy and Organization of Diversity in European Rabbits. *Journal of Molecular Evolution* **33**, 92-102.
- Bininda-Emonds ORP, Cardillo M, Jones KE, MacPhee RDE, Beck RMD, Grenyer R, Price SA, Vos RA, Gittleman JL, Purvis A (2007) The delayed rise of present-day mammals. *Nature* **446**, 507-512.
- Blankenship SM, May B, Hedgecock D (2002) Evolution of a perfect simple sequence repeat locus in the context of its flanking sequence. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1943-1951.
- Blaxter KL (1975) Conventional and Unconventional Farmed Animals. *Proceedings of the Nutrition Society* **34**, 51-56.

- Bohlin B (1942) The fossil mammals from the Tertiary deposit of Taben-buluk, western Kansu. Part I. Insectivora and Lagomorpha. *Pal. Sinica, n. s.* **C**, 1-110.
- Bonhomme F, Fernandez J, Palacios F, Catalan J, Machordon A (1986) Caracterisation biochimique du complexe d' especes du genre *Lepus* en Espagne. *Mammalia* **50**, 495.
- Bonino N, Montenegro A (1997) Reproduction of the European hare in Patagonia, Argentina. *Acta Theriologica* **42**, 47-54.
- Bossart JL, Prowell DP (1998) Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons, and new directions. *TREE* **13**, 202–206.
- Branco M, Ferrand N, Monnerot M (2000) Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity* **85**, 307-317.
- Brassel KE, Reif D (1979) A procedure to generate Thiessen polygons. *Geogr. Anal.* **325**, 31–36.
- Broekhuizen S (1976) The situation of the hare populations in the Netherlands. In: *Ecology and management of European hare populations* (eds. Pielowski Z, Pucek Z), pp. 105-114. Polish Hunting Association, Warsaw.
- Broekhuizen S, Maaskamp F (1981) Annual Production of Young in European Hares (*Lepus-Europaeus*) in the Netherlands. *Journal of Zoology* **193**, 499-516.
- Bromham L, Penny D (2003) The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics* **4**, 216-224.
- Bromham LD, Hendy MD (2000) Can fast early rates reconcile molecular dates with the Cambrian explosion? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**, 1041-1047.
- Brown JH, Lomolino MV (1998) *Biogeography*, 2 edn. Sinauer Associates.
- Brown WM (1983) Evolution of animal mitochondrial DNA. In: *Evolution of Genes and Proteins* (eds. Nei M, Koehn RK), pp. 62-68. Sinauer, Sunderland, MA.
- Brown WM (1985) The mitochondrial genomes of animals. In: *Molecular evolutionary genetics* (ed. MacIntyre RD), pp. 85-130. Plenum, New York.
- Burke JJ (1936) *Ardynomys* and *Desmatolagus* in the North American Oligocene. *Ann. Carnegie Mus.* **25**, 135-154.
- Cary JR, Keith LB (1979) Reproductive Change in the 10-Year Cycle of Snowshoe Hares. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **57**, 375-390.
- Casane D, Dennebouy N, Derochambeau H, Mounolou JC, Monnerot M (1994) Genetic-Analysis of Systematic Mitochondrial Heteroplasmy in Rabbits. *Genetics* **138**, 471-480.

- Chapman JA, Flux JEC (1990) Introduction and overview of the Lagomorpha. In: *Rabbits, hares and pikas: status survey and conservation action plan* (eds. Chapman JA, Flux JEC), pp. 1-6. GB. IUCN/CSE, Cambridge.
- Chapman JA, Flux JEC, Smith AT, Bell DJ, Ceballos GC, Dixon KR, Dobler FC, Formozov NA, Ghose RK, Oliver WLR, Robinson TJ, Schneider E, Stuart SN, Sugimura K, Changlin Z (1990) Conservation action needed for rabbits, hares and pikas. In: *Rabbits, Hares and Pikas: Status Survey and Conservation Action Plan* (eds. Chapman JA, Flux JEC), pp. 154–167. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland.
- Chaworth-Musters JL (1932) A contribution to our knowledge of the mammals of Macedonia and Thessaly. *Ann. Mag. Nat. Hist. Ser.* **10**, 169.
- Corbet GB (1983) A review of classification in the family Leporidae. *Acta Zoologica Fennica* **174**, 11-15.
- Corbet GB, Hill JE (1986) *A World List of Mammalian Species* British Museum (Nat. Hist.), London.
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**, 1989-2000.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, Angibault JMA, Aulagnier S, Cargnelutti B, Galan M, Hewison AJM (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* **15**, 1669-1679.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 290-295.
- Crida A, Manel S (2007) WOMBSOFT: an R package that implements the Wombling method to identify genetic boundary. *Molecular Ecology Notes* **7**, 588-591.
- Cruzan MB (1998) Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology* **79**, 400-412.
- Cummings MP, Otto SP, Wakeley J (1995) Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 814–822.
- D’Erchia AM, Gissi C, Pesole G, Saccone C, Arnason U (1996) The guinea-pig is not a rodent. *Nature* **381**, 597–600.
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, 504-509.
- Davies N, Villablanca FX, Roderick GK (1999) Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 17-21.
- Dawson MR (1958) *Later Tertiary Leporidae of North America* Univ. Kansas Paleont. Contr., Vertebrata.

- Dawson MR (1981) Evolution of the modern lagomorphs, 1–8.
- De Beaufort F (1991) La faune des mammifères de Grece: Caracteristiques, endemisme, particularismes. *Biologia Gallo-hellenica* **18**, 99-106.
- De Beaux O (1929) Ricerche faunistiche nelle isole Italiane dell' Egeo. *Mammiferi. Arch. Zool. Ital.* **13**, 1-25.
- DeBlase FA, Martin ER (1981) The rabbits, hares and pikas Order Lagomorpha. In: *A Manual of Mammalogy with keys to families of the world* (eds. DeBlase FA, Martin ER), pp. 215-217. WCB McGraw-Hill.
- DeBry RW, Sagel RM (2001) Phylogeny of Rodentia (Mammalia) inferred from the nuclear-encoded gene IRBP. *Mol. Phylogenet. Evol.* **19**, 290–301.
- Deffontaine V, Libois R, Kotlik P, Sommer R, Nieberding C, Paradis E, Searle JB, Michaux J (2005) Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* **14**, 1727-1739.
- Dermitzakis DM (1990) Paleogeography, Geodynamic Processes and event Stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area. *Atti Convegna Lincei* **85**, 263–288.
- Dermitzakis DM, Papanikolaou DJ (1981) Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene. *Annales Geologique des Pays Hellenic* **30**, 245-289.
- Dermitzakis MD, De Vos J (1987) Faunal succession and the evolution of mammals in Crete during the Pleistocene. *Neues Jahrbuch fuer Geologie und Palaontologie, Abhandlungen* **173**, 377–408.
- Di Prisco G, Verde C (2006) Predicting the impacts of climate change on the evolutionary adaptations of polar fish. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol* **5**, 309-321.
- Dice LR (1929) The phylogeny of the Leporidae with the description of a new genus. *Journal of Mammology* **10**, 340–344.
- Dickerson RE (1971) The structure of cytochrome c and the rates of molecular evolution. *J. Mol. Evol.* **1**, 26–45.
- Dixon KR, Chapman JA, Willner GR, Wilson DE, Lopez-Forment W (1983) The New World jackrabbits and hares (genus *Lepus*). 2. Numerical taxonomic analysis. *Acta Zoologica Fennica* **174**, 53-56.
- Djan M, Obreht D, Vapa L (2006) Polymorphism of mtDNA regions in brown hare (*Lepus europaeus*) populations from Vojvodina (Serbia and Montenegro). *European Journal of Wildlife Research* **52**, 288-291.
- Douzery EJP, Huchon D (2004) Rabbits, if anything, are likely Glires. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**, 922-935.
- Doyle JJ (1992) Gene trees and species trees: Molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst. Bot.* **17**, 144-163.

- Dubey S, Zaitsev M, Cosson JF, Abdukadier A, Vogel P (2006) Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**, 635-647.
- Edwards PJ, Fletcher MR, Berny P (2000) Review of the factors affecting the decline of the European brown hare, *Lepus europaeus* (Pallas, 1778) and the use of wildlife incident data to evaluate the significance of paraquat. *Agriculture Ecosystems & Environment* **79**, 95-103.
- Eisen JA (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. Goldstein DB, Schlotterer C), pp. 34–48. Oxford University Press, Oxford.
- Eisenberg JF (1966) The social organization of mammals. *Handb. Zool. VIII* **10**, 1-92.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5**, 435-445.
- Ellegren H, Moore S, Robinson N, Byrne K, Ward W, Sheldon BC (1997) Microsatellite evolution - A reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 854-860.
- Ellerman JR, Morrison-Scott TCS, Hayman RW (1953) *Southern African Mammals 1758 to 1951: A Reclassification* BM (NH), London.
- Epperson BK (2005) Mutation at high rates reduces spatial structure within populations. *Molecular Ecology* **14**, 703-710.
- Ersts PJ Geographic Distance Matrix Generator. American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation.
- Estonba A, Solis A, Iriondo M, Sanz-Martin MJ, Perez-Suarez G, Markov G, Palacios F (2006) The genetic distinctiveness of the three Iberian hare species: *Lepus europaeus*, *L. granatensis*, and *L. castroviejoi*. *Mammalian Biology* **71**, 52-59.
- Estoup A, Cornuet JM, Rousset F, Guyomard R (1999) Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: Theoretical aspects. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 898-908.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**, 1591-1604.
- Estoup A, Largiader CR, Cornuet JM, Gharbi K, Presa P, Guyomard R (2000) Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: an empirical evaluation with brown trout (*Salmo trutta*) as model organism. *Molecular Ecology* **9**, 1873-1886.
- Estoup A, Tailliez C, Cornuet JM, Solignac M (1995) Size Homoplasy and Mutational Processes of Interrupted Microsatellites in 2 Bee Species, *Apis-Mellifera* and *Bombus-Terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* **12**, 1074-1084.

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary Trees from DNA-Sequences - a Maximum-Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**, 368-376.
- Felsenstein J (1988) Phylogenies and Quantitative Characters. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**, 445-471.
- Felsenstein J (2004) *Inferring Phylogenies* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Fickel J, Lieckfeldt D, Pitra C (1999) Analysis of genetic diversity and structure in neighboring populations of the European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). *Zeitschrift Fur Jagdwissenschaft* **45**, 230-237.
- Fickel J, Schmidt A, Putze M, Spittler H, Ludwig A, Streich WJ, Pitra C (2005) Genetic structure of populations of European brown hare: Implications for management. *Journal of Wildlife Management* **69**, 760-770.
- Fiore I, Gala M, Tagliacozzo A (2004) Ecology and subsistence strategies in the eastern Italian Alps during the Middle Palaeolithic. *International Journal of Osteoarchaeology* **14**, 273-286.
- Flux JE (1981) Reproductive strategies in the genus *Lepus*, 155-174.
- Flux JEC (1967) Reproduction and Body Weights of Hare *Lepus Europaeus* Pallas in New Zealand. *New Zealand Journal of Science* **10**, 357-&.
- Flux JEC (1970) Life History of Mountain Hare (*Lepus-Timidus-Scoticus*) in North-East Scotland. *Journal of Zoology* **161**, 75-&.
- Flux JEC (1990) Brown hare. In: *The handbook of New Zealand mammals* (ed. King CM), pp. 162-172. Oxford University Press, Auckland.
- Flux JEC, Angermann R (1990) The hares and jackrabbits. In: *Rabbits, Hares and Pikas: Status Conservation Action Plan* (eds. Chapman JA, Flux JEC), pp. 61-94. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland.
- Flux JEC, Flux MM (1983) Taxonomy and distribution of East African hares. *Acta Zoologica Fennica* **174**, 41-43.
- Fredsted T, Wincenz T, Villesen P (2006) Introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into wild brown hares (*Lepus europaeus*) in Denmark. *BMC Ecology* **6**, 1-6.

- Frylestam B (1980) Reproduction in the European Hare in Southern Sweden. *Holarctic Ecology* **3**, 74-80.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L, Hausser J (1996) Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 31-46.
- Garza JC, Freimer NB (1996) Homoplasmy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Research* **6**, 211-217.
- Gidley JW (1912) The lagomorphs an independent order. *Sci. n. s.* **36**, 285-286.
- Gillespie JH (1998) Nonrandom Mating. In: *Population Genetics A Concise Guide* (ed. Gillespie JH), pp. 85-101. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Gonzalez FX, Cervantes FA (1996) Karyotype of the white-sided jackrabbit (*Lepus callotis*). *Southwestern Naturalist* **41**, 93-95.
- Graur D, Duret L, Gouy M (1996) Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* **379**, 333-335.
- Graur D, Hide WA, Li WH (1991) Is the Guinea-Pig a Rodent. *Nature* **351**, 649-652.
- Graybeal A (1994) Evaluating the phylogenetic utility of genes: a search for genes informative about deep divergences among vertebrates. *Syst. Biol.* **43**, 174- 193.
- Grillitsch M, Hartl GB, Suchentrunk F, Willing R (1992) Allozyme Evolution and the Molecular Clock in the Lagomorpha. *Acta Theriologica* **37**, 1-13.
- Gu X, Li WH (1992) Higher rates of amino acid substitution in rodents than in humans. *Mol. Phyl. Evol.* **1**, 211-214.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* **5**, 712-715.
- Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* **24**, 1406-1407.
- Gustavsson I (1971) Mitotic and Meiotic Chromosomes of Variable Hare (*Lepus-Timidus* L), Common Hare (*Lepus-Europaeus* Pall) and Their Hybrids. *Hereditas-Genetiskt Arkiv* **67**, 27-&.
- Gustavsson I, Sundt CO (1965) Anwendung von kunstlicher befruchtung bei der hybridisierung von zwei hasenarten. *Z. Jagdwiss.* **11**, 155-158.
- Halanych KM (1998) Lagomorphs misplaced by more characters and fewer taxa. *Systematic Biology* **47**, 138-146.
- Halanych KM, Robinson TJ (1999) Multiple substitutions affect the phylogenetic utility of cytochrome b and 12S rDNA data: Examining a rapid radiation in Leporid (Lagomorpha) evolution. *Journal of Molecular Evolution* **48**, 369-379.

- Hansen K (1992) Reproduction in European hare in a Danish farmland. *Acta Theriologica* **37**, 27-40.
- Hansen RM, Flinders JT (1969) *Food habits of North American hares* Colorado State Univ., Science Ser., Range Sci.Dept.
- Harrison RG (1989) Mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* **4**, 6-11.
- Hartl GB (1987) Biochemical Differentiation between the Wild Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus* L), the Domestic Rabbit and the Brown Hare (*Lepus-Europaeus-Pallas*). *Zeitschrift Fur Zoologische Systematik Und Evolutionsforschung* **25**, 309-316.
- Hartl GB (1991) Genetic-Polymorphism of Sorbitol Dehydrogenase in the Brown Hare and the Distribution of the Variation in Central-Europe. *Biochemical Genetics* **29**, 49-54.
- Hartl GB, Ferrand N (1993) Genetic-Polymorphism of Transferrin (Tf) and the Hemoglobin Alpha-Chain (Hba) in the Brown Hare (*Lepus-Europaeus*). *Animal Genetics* **24**, 439-440.
- Hartl GB, Markowski J, Kovacs G, Grillitsch M, Willing R (1990) Biochemical Variation and Differentiation in the Brown Hare (*Lepus-Europaeus*) of Central-Europe. *Zeitschrift Fur Säugetierkunde-International Journal of Mammalian Biology* **55**, 186-193.
- Hartl GB, Markowski J, Swiatecki A, Janiszewski T, Willing R (1992) Studies on the European Hare .43. Genetic Diversity in the Polish Brown Hare *Lepus-Europaeus Pallas*, 1778 - Implications for Conservation and Management. *Acta Theriologica* **37**, 15-25.
- Hartl GB, Suchentrunk F, Nadlinger K, Willing R (1993) An Integrative Analysis of Genetic Differentiation in the Brown Hare *Lepus-Europaeus* Based on Morphology, Allozymes, and Mitochondrial-DNA. *Acta Theriologica* **38**, 33-57.
- Hartl GB, Suchentrunk F, Willing R, Grillitsch M (1989) Biochemical-Genetic Variability and Differentiation in the Brown Hare (*Lepus-Europaeus*) of Lower Austria. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **76**, 279-284.
- Hartl GB, Suchentrunk F, Willing R, Petznek R (1995) Allozyme heterozygosity and fluctuating asymmetry in the brown hare (*Lepus europaeus*): A test of the developmental homeostasis hypothesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **350**, 313-323.
- Hartl GB, Willing R, Nadlinger K (1994) Allozymes in mammalian population genetics and systematics: indicative function of marker system reconsidered. In: *Molecular ecology and evolution approaches and applications* (eds. Schierwater B, Streit B, Wagner GP, Desalle R), pp. 299-310. Birkhauser Verlag Basel.
- Hartman CG (1925) On some characters of taxonomic value appertaining to the egg and ovary of rabbits. *J. Mammal.* **6**, 114-121.

- Hasegawa M, Kishino H, Yano TA (1985) Dating of the Human Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial-DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**, 160-174.
- Hay J (1953) Wyniki badań schorzeń zajęcy z odstrzalu 1952/53. *Lowiec Warszawa* **9**, 138-139.
- Hellberg ME (1994) Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in a philopatric coral, *Balanophyllia elegans*. *Evolution* **48**, 1829-1854.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hewitt GM (1985) The structure and maintenance of hybrid zones. In: *Orthoptetra* (eds. Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, de la Vega CG), pp. 15-54. Fundacion, Ramon Areces, Madrid.
- Hewitt GM (1989) The subdivision of species by hybrid zones. In: *Speciation and its consequences* (eds. Otte D, Endler J), pp. 85-110. Sinauer Associates, INC., Sunderland, Mass.
- Hewitt GM (1993) Postglacial distribution and species substructure: lessons from pollen, insects and hybrid zones. In: *Evolutionary Patterns and Processes* (eds. Lees DR, Edwards D), pp. 97-123. Linnean Society of London. Academic Press, London.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-549.
- Hewitt GM, Nichols RA (2005) Genetic and Evolutionary Impacts of Climate Change. In: *Climate Change and Biodiversity* (eds. Lovejoy TE, Hannah L), pp. 176-192. Harvard University Press, Boston.
- Hewson R, Taylor M (1975) Embryo counts and length of the breeding season in European hares in Scotland from 1960-1972. *Acta Theriologica* **20**, 247-254.
- Hibbard CW (1963) The origin of the P3 pattern of *Sylvilagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus* and *Lepus*. *J. Mammal.* **44**, 1-15.
- Hickson RE, Slack KE, Lockhart P (2000) Phylogeny recapitulates geography, or why New Zealand has so many species of skinks. *Biological Journal of the Linnean Society* **70**, 415-433.
- Hill WG, Robertson A (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* **38**, 226-231.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (1996) *Molecular Systematics*, 2 edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hilzheimer M (1906) Die europäischen Hasen. *Zool. Anz.* **30**, 510-513.

- Hilzheimer M (1908) Die Hasenarten Europas. *Mitt. Kgl. Naturalienkab. zu Stuttgart* **59**, 1-39.
- Hockett B, Haws JA (2002) Taphonomic and methodological perspectives of leporid hunting during the Upper Paleolithic of the western Mediterranean basin. *Journal of Archaeological Method and Theory* **9**, 269-302.
- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1991) Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region. *Molecular Biology and Evolution* **8**, 475-493.
- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1993) Generation of Vntrs and Heteroplasmy by Sequence Turnover in the Mitochondrial Control Region of 2 Elephant Seal Species. *Journal of Molecular Evolution* **37**, 190-197.
- Holley AJF (1986) A Hierarchy of Hares - Dominance Status and Access to Estrous Does. *Mammal Review* **16**, 181-186.
- Holley AJF, Greenwood PJ (1984) The Myth of the Mad March Hare. *Nature* **309**, 549-550.
- Homolka M (1985) Spatial Activity of Hares (*Lepus Europaeus*). *Folia Zoologica* **34**, 217-226.
- Howell-Meurs S (2001) Archaeozoological evidence for pastoral systems and herd mobility: The remains from Sos Hoyuk and Buyuktepe Hoyuk. *International Journal of Osteoarchaeology* **11**, 320-328.
- Huchon D, Madsen O, Sibbald MJJB, Ament K, Stanhope MJ, Catzeflis F, de Jong WW, Douzery EJP (2002) Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of glires: Evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1053-1065.
- Hudson RR (1983) Testing the constant-rate neutral allele model with protein sequence data. *Evolution* **37**, 203-217.
- Hughes PD, Gibbard PL, Woodward JC (2007) Geological controls on Pleistocene glaciation and cirque form in Greece. *Geomorphology* **88**, 242-253.
- Hutchinson DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**, 1898-1914.
- Ibrahim KM, Nichols RA, Hewitt GM (1996) Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* **77**, 282-291.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the Cytochrome-B Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**, 128-144.
- Jacquez G, Maruca S, Fortin M (2000) From fields to objects: a review of geographic boundary analysis. *Journal of Geographic Systems* **2**, 221-241.

- Jansson G, Thulin CG, Pehrson A (2007) Factors related to the occurrence of hybrids between brown hares *Lepus europaeus* and mountain hares *L. timidus* in Sweden. *Ecography* **30**, 709-715.
- Jaramillo-Correa JP, Bousquet J (2005) Mitochondrial genome recombination in the zone of contact of two hybridising conifers. *Genetics* **171**, 1951-1962.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *Bmc Genetics* **6**, -.
- Jones RL, Keen DH (1993) *Pleistocene environments in the British Isles* Chapman and Hall, London.
- Jorde LB (1995) Linkage Disequilibrium as a Gene-Mapping Tool. *American Journal of Human Genetics* **56**, 11-14.
- Jorde LB (2000) Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Research* **10**, 1435-1444.
- Jorde LB, Watkins WS, Carlson M, Groden J, Albertsen H, Thliveris A, Leppert M (1994) Linkage Disequilibrium Predicts Physical Distance in the Adenomatous Polyposis-Coli Region. *American Journal of Human Genetics* **54**, 884-898.
- Kaeuffer R, Reale D, Coltman DW, Pontier D (2007) Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. *Heredity* **99**, 374-380.
- Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G (2005) 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 55-66.
- Kattinger E (1972) Beitrage zur Säugetierkunde der südlichen Balkaninsel und des Vorderen Orients (Syrien und Unteragypfen). *Ber. d. Naturf. Ges. Bamberg* **46**, 11-32.
- Keith LB (1963) *Wildlife's ten-year cycle* Univ. Wisconsin Press, Madison.
- Keith LB (1981) Population dynamics of hares. In: *Proceedings of the World Lagomorph Conference* (eds. Myers K, MacInnes CD), pp. 395-440. Univ. of Guelph, Ontario.
- Keith LB, Rongstad OJ, Meslow EC (1966) Regional Differences in Reproductive Traits of Snowshoe Hare. *Canadian Journal of Zoology* **44**, 953-&.
- Keith LB, Windberg LA (1978) Demographic-Analysis of Snowshoe Hare Cycle. *Wildlife Monographs*, 6-70.
- Kimura M, Ohta T (1971) Protein Polymorphism as a Phase of Molecular Evolution. *Nature* **229**, 467-&.
- Kimura M, Weiss GH (1964) Stepping Stone Model of Population Structure + Decrease of Genetic Correlation with Distance. *Genetics* **49**, 561-&.

- Kishino H, Thorne JL, Bruno WJ (2001) Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 352-361.
- Koh HS, Chun TY, Yoo HS, Zhang Y-P, Wang J, Zhang M, Wu C-H (2001) Mitochondrial cytochrome b gene sequence diversity in the Korean hare, *Lepus coreanus* Thomas (Mammalia, Lagomorpha). *Biochemical Genetics* **39**, 417-429.
- Kolosov AM (1941) Reproduction in the common hare (*Lepus europaeus* Pallas). *Zool. Zhur* **20**, 154-171.
- Kovács G (1983) Variability of fecundity rates in a population of European hare. In: *IUGB XVI*. (eds. Spenik M, Hell P), pp. 450-458. IUGB Strbske Pleso.
- Kryger U (2002) *Genetic variation among South African hares (Lepus spec.) as inferred from mitochondrial DNA and microsatellites*, University of Pretoria.
- Kryger U, Robinson TJ, Bloomer P (2002) Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in South African hares (*Lepus saxatilis* F. Cuvier, 1823 and *Lepus capensis* Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology Notes* **2**, 422-424.
- Kryger U, Robinson TJ, Bloomer P (2004) Population structure and history of southern African scrub hares, *Lepus saxatilis*. *Journal of Zoology* **263**, 121-133.
- Kukla GJ, Bender ML, de Beaulieu JL, Bond G, Broecker WS, Cleveringa P, Gavin JE, Herbert TD, Imbrie J, Jouzel J, Keigwin LD, Knudsen KL, McManus JF, Merkt J, Muhs DR, Muller H, Poore RZ, Porter SC, Seret G, Shackleton NJ, Turner C, Tzedakis PC, Winograd IJ (2002) Last interglacial climates. *Quaternary Research* **58**, 2-13.
- Kumar S, Hedges SB (1998) A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* **392**, 917-920.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Ladoukakis ED, Zouros E (2001) Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus gallprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1168-1175.
- Landry SOJ (1999) A proposal for a new classification and nomenclature for the Glires (Lagomorpha and Rodentia). *Mitt. Mus. Nat.kd. Berl. Zool. Reihe* **75**, 283-316.
- Larizza A, Pesole G, Reyes A, Sbisa E, Saccone C (2002) Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region in rodents. *Journal of Molecular Evolution* **54**, 145-155.
- Lawlor TE (1979) Lagomorpha. In: *Handbook to the orders and families of living mammals* (ed. Lawlor TE), pp. 144-147. Mad River Press, Eureka, California.
- Lechleiner RR (1959) Sex ratio, age classes and reproduction of the black-tailed jack rabbit. *J. Mammal.* **40**, 63-81.

- Li CK, Wilson RW, Dawson MR, Krishtalka L (1987) The origin of Rodents and Lagomorphs. In: *Current Mammalogy* (ed. Genoways HH), pp. 97-108. Plenum Press, New York.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**, 2453-2465.
- Likevičienė N (1962) Ekologia zajca rusaka v uslovijah litovskoj SSR. *Vtoraja zool. Konferencija litovskoj SSR*, 61-63.
- Lin Y-H, Waddell PJ, Penny D (2002) Pika and vole mitochondrial genomes increase support for both rodent monophyly and glires. *Gene* **294** 119–129.
- Lincoln GA (1974) Reproduction and March Madness in Brown Hare, *Lepus-Europaeus*. *Journal of Zoology* **174**, 1-14.
- Liu FGR, Miyamoto MM (1999) Phylogenetic assessment of molecular and morphological data for eutherian mammals. *Systematic Biology* **48**, 54-64.
- Lopez-Martinez N (1977) *Revision sistematica y biostratigrafica de los lagomorphos (Mammalia) del neogeno y cuaternario de Espana*, Universidad de Madrid.
- Lopez-Martinez N (1980) Les lagomorphes (Mammalia) du Pleistocene superieur de Jaurens. *Nouv. Arch. Mus. Hist. Nat. Lyon* **18** 5-16.
- Lorenzo C, Cervantes FA, Vargas J (2003) Chromosomal relationships among three species of jackrabbits (*Lepus* : Leporidae) from Mexico. *Western North American Naturalist* **63**, 11-20.
- Luckett WP, Hartenberger J-L (1993) Monophyly or polyphyly of the order Rodentia: possible conflict between morphological and molecular interpretations. *J. Mammal. Evol.* **1**, 127–147.
- Luikart G, England PR (1999) Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 253-256.
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits* Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA.
- Lyrholm T, Leimar O, Gyllensten U (1996) Low diversity and biased substitution patterns in the mitochondrial DNA control region of sperm whales: Implications for estimates of time since common ancestry. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 1318-1326.
- Macdonald D, Barret P (1995) *Mammals of Britain and Europe. Collins Field Guide* Harper Collins Publishers, London.
- Maddison W (1989) Reconstructing Character Evolution on Polytomous Cladograms. *Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society* **5**, 365-377.
- Maddison WP (1997) Gene trees in species trees. *Syst. Biol.* **46**, 523-536.
- Malecot G (1968) *The Mathematics of Heredity* Freeman, San Fransisco, CA, USA.

- Mamuris Z, Sfougaris AI, Stamatis C (2001) Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biological Conservation* **101**, 187-196.
- Mamuris Z, Sfougaris AI, Stamatis C, Suchentrunk F (2002) Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biochemical Genetics* **40**, 323-338.
- Manceau V, Despres L, Bouvet J, Taberlet P (1999) Systematics of the genus *Capra* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**, 504-510.
- Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS (2005) Assignment methods: matching biological questions techniques with appropriate. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 136-142.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 189-197.
- Manni F, Guerard E (2004) Barrier vs. 2.2. Manual of the user. Population genetics team, Museum of Mankind (Musée de l'Homme), Paris.
- Manni F, Guerard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* **76**, 173-190.
- Marboutin E (1977) A note on home range in the European hare (*Lepus europaeus*). *Gibier Faune Sauvage, Game Wildlife* **14**, 349-357.
- Marboutin E, Bray Y, Peroux R, Mauvy B, Lartiges A (2003) Population dynamics in European hare: breeding parameters and sustainable harvest rates. *Journal of Applied Ecology* **40**, 580-591.
- Marboutin E, Peroux R (1995) Survival pattern of European hare in a decreasing population. *Journal of Applied Ecology* **32**, 809-816.
- Margoliash E (1963) Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **50**, 672-679.
- Markowski J, Osmulski P, Duda W, Dynier E, Swiatecki A, Ulanska M, Janiszewski T (1990) Relation between haptoglobin polymorphism and the health status of brown hare populations in Poland. *Acta Theriologica* **35**, 215.
- Marra AC (2005) Pleistocene mammals of Mediterranean islands. *Quaternary International* **129**, 5-14.
- Martin AP, Palumbi SR (1993) Body Size, Metabolic-Rate, Generation Time, and the Molecular Clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4087-4091.

- Martinet L (1980) Estrous Behavior, Follicular-Growth and Ovulation during Pregnancy in the Hare (*Lepus-Europaeus*). *Journal of Reproduction and Fertility* **59**, 441-445.
- Martinet L, Legouis JJ, Moret B (1970) Observations on Reproduction in Captive Brown Hare (*Lepus-Europaeus-Pallas*). *Annales De Biologie Animale Biochimie Biophysique* **10**, 195-&.
- Maruyama T (1971) Analysis of Population Structure .2. 2-Dimensional Stepping Stone Models of Finite Length and Other Geographically Structured Populations. *Annals of Human Genetics* **35**, 179-&.
- Matthee CA, van Vuuren BJ, Bell D, Robinson TJ (2004) A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five intercontinental exchanges during the Miocene. *Systematic Biology* **53**, 433-447.
- Matzarakis A, Karatarakis N, Sarantopoulos A (2005) Tourism climatology and tourism potential for Crete, Greece. *Annalen der Meteorologie* **41**, 616-619.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Randi E, Kryukov A, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC (2007) The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* **16**, 605-618.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC (2005) Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* **14**, 2459-2464.
- Meng J, Wyss AR, Dawson MR, Zhai R (1994) Primitive fossil rodent from Inner Mongolia and its implications for mammalian phylogeny. *Nature* **370**, 134-136.
- Meriggi A, Verri A (1990) Population dynamics and habitat selection of the European hare on poplar monocultures in northern Italy. *Acta Theriologica* **35**, 69-76.
- Meyer A (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (eds. Hochaka PW, Mommsen TP), pp. 1-38. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Miller GS (1912) *Catalogue of the Mammals of Western Europe (Europe exclusive of Russia) in the collection of the British Museum* British Museum, London.
- Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W, Krystufek B, Reijnders PJH, Spitzenberger F, Stubbe M, Thissen JBM, Vohralik V, Zima J (1999) *The Atlas of European Mammals* Academic Press, T. & A. D. Poyser Natural History, London.
- Miyamoto MM, Goodman M (1986) Biomolecular Systematics of Eutherian Mammals: Phylogenetic Patterns and Classification. *Systematic Zoology* **35**, 230-240.

- Möller D (1971) Beitrag zur Reproduktion des Feldhasen (*Lepus europaeus* Pall.) in der Deutschen Demokratischen Republik. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung VII* **113**, 191-202.
- Möller D (1976) Die Fertilität der Feldhasenpopulationen. In: *Ecology and management of European hare populations* (eds. Pielowski Z, Pucek Z), pp. 69-74. Polish Hunting Association, Warszawa.
- Möller D (1980) Der Verlauf der Fortpflanzungsaktivität beim Feldhasen (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) im Jahresablauf. *Beitr. Zur Jagd-und Wildforsch* **11**, 310-324.
- Monaghan P, Metcalfe NB (1985) Group Foraging in Wild Brown Hares - Effects of Resource Distribution and Social-Status. *Animal Behaviour* **33**, 993-999.
- Monmonier M (1973) Maximum-Difference Barriers - Alternative Numerical Regionalization Method. *Geographical Analysis* **5**, 245-261.
- Morgan-Richards M, Trewick SA, Wallis GP (2000) Characterization of a hybrid zone between two chromosomal races of the weta *Hemideina thoracica* following a geologically recent volcanic eruption. *Heredity* **85**, 586-592.
- Moritz C (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 373-375.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of Animal Mitochondrial-DNA - Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 269-292.
- Mougel F, Mounolou JC, Monnerot M (1997) Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics* **28**, 58-59.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryderk OA, O'Brien SJ (2001a) Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* **409**, 614-618.
- Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS (2001b) Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* **294**, 2348-2351.
- Muse SV, Weir BS (1992) Testing for Equality of Evolutionary Rates. *Genetics* **132**, 269-276.
- Myers K, MacInnes CD (1981).
- Nagylaki T (1976) Decay of Genetic-Variability in Geographically Structured Population .2. *Theoretical Population Biology* **10**, 70-82.
- Narita Y, Oda S, Takenaka O, Kageyama T (2001) Phylogenetic position of Eulipotyphla inferred from the cDNA sequences of pepsinogens A and C. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**, 32-42.
- Neff BD, Gross MR (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* **55**, 1717-1733.

- Nei M (1978) Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nei M (1986) Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. In: *Evolutionary Perspectives and the New Genetics* (eds. Gershowitz H, Rucknagel DL, Tashian RE), pp. 133–147. A. R. Liss, New York.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press, New York.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics* Oxford University Press, New York.
- Neigel JE (1997) A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28** 105
- Neigel JE, Avise JC (1986) Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: *Evolutionary Processes and Theory* (eds. Karlin S, Nevo E), pp. 515–534. Academic Press, New York.
- Nichols R (2001) Gene trees and species trees are not the same. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 358-364.
- Nielsen EEG, Bach LA, Kotlicki P (2006) HYBRIDLAB (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes* **6**, 971-973.
- Nordborg M (2001) Coalescent theory. In: *Handbook of Statistical Genetics* (eds. Balding DJ, Cannings C, Bishop M), pp. 179–212. Wiley, Chichester,UK.
- Novacek MJ (1990) Morphology, paleontology, and the higher clades of mammals. In: *Current mammalogy* (ed. Genoways HH), pp. 507-543. Plenum Press, New York.
- Novacek MJ (1992) Mammalian Phylogeny - Shaking the Tree. *Nature* **356**, 121-125.
- Novacek MJ (1993) Reflections on higher mammalian phylogenetics. *J. Mammal. Evol.* **1**, 3-30.
- Novacek MJ, Wyss AR, McKenna MC (1988) The major groups of eutherian mammals. In: *The phylogeny and classification of the tetrapods Vol. 2* (ed. Benton MJ), pp. 31-71. Clarendon Press, Oxford.
- Ohta T (2002) Near-neutrality in evolution of genes and gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16134–16137.
- Olsen JB, Bentzen P, Banks MA, Shaklee JB, Young S (2000) Microsatellites reveal population identity of individual pink salmon to allow supportive breeding of a population at risk of extinction. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 232-242.
- Ondrias JC (1965) Die Säugetiere Griechenlands. *Säugetierkundliche Mitteilungen* **13**, 109-127.

- Orth A, Auffray J-C, Bonhomme F (2002) Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse *Mus macedonicus* reveal multiple glacial refuges south of Caucasus. *Heredity* **89**, 353-357.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**, 55-65.
- Paetkau D, Strobeck C (1995) The Molecular-Basis and Evolutionary History of a Microsatellite Null Allele in Bears. *Molecular Ecology* **4**, 519-520.
- Parkes JP (1989) Annual patterns in reproduction and perirenal fat of hares (*Lepus europaeus*) in sub-alpine Canterbury, New Zealand. *J. Zool. (London)* **217**, 9-21.
- Pearse DE, Crandall KA (2004) Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* **5**, 585-602.
- Peltonen L (2000) Positional cloning of disease genes: advantages of genetic isolates. *Hum. Hered.* **50**, 66-75.
- Pepin D (1975) L'anoestrus saisonnier du lievre (*Lepus europaeus*) et sa prise en compte pour fixer l'ouverture de sa chasse. *Bulletin de l' Office National de la Chasse special* **4**, 127-135.
- Pepin D (1987) Dynamics of a Heavily Exploited Population of Brown Hare in a Large-Scale Farming Area. *Journal of Applied Ecology* **24**, 725-734.
- Pepin D (1989) Variation in Survival of Brown Hare (*Lepus-Europaeus*) Leverets from Different Farmland Areas in the Paris Basin. *Journal of Applied Ecology* **26**, 13-23.
- Pépin D, Meunier M, Angibault J (1981) Etude de la reproduction du lièvre (*Lepus europaeus*) dans le Bassin Parisien. *Bull. O.N.C. Scientifique et Technique* **11**, 3-26.
- Pérez-Suarez G, Palacios F, Boursot P (1994) Speciation and parapatry in western Mediterranean hares (*Lepus castroviejoi*, *L. europaeus*, *L. granatensis* and *L. capensis*) revealed by mitochondrial DNA phylogeny. *Biochemical Genetics* **32**, 423-437.
- Perissoratis C, Conispoliatis N (2003) The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). *Marine Geology* **196**, 145-156.
- Petit RJ, Deguilloux MF, Chat J, Grivet D, Garnier-Gere P, Vendramin GG (2005) Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. *Molecular Ecology* **14**, 885-890.
- Pèvet P (1987) Environmental control of the annual reproductive cycle in mammals. In: *Comparative Physiology of Environmental Adaptations* (ed. Pèvet P), pp. 82-100. ESCP Conference, Strasbourg.

- Philippe H (1997) Rodent monophyly: pitfalls of molecular phylogenies. *J. Mol. Evol.* **45**, 712–715.
- Philippe H, Douzery E (1994) The pitfalls of molecular phylogeny based on four species as illustrated by the Cetacea/Artiodactyla relationships. *J. Mammal. Evol.* **2**, 133-152.
- Pielowski Z (1972) Home range and degree of residence of the European hare. *Acta Theriologica* **17**, 93-103.
- Pielowski Z (1976) Number of young born and dynamics of the European hare population. In: *Ecology and Management of European Hare Populations* (eds. Pielowski Z, Pucek Z), pp. 75-78. Polish Hunting Association, Warszawa.
- Pielowski Z, Raczyński J (1976) Ecological conditions and rational management of hare populations. In: *Ecology and Management of European Hare Populations* (eds. Pielowski Z, Pucek Z), pp. 269-286. Polish Hunting Association, Warszawa.
- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E (1999) Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* **8**, 1805-1817.
- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E (2003) Hare populations in Europe: intra and interspecific analysis of mtDNA variation. *Comptes Rendus Biologies* **326**, S80-S84.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Primmer CR, Ellegren H, Saino N, Moller AP (1996) Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genetics* **13**, 391-393.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Pritchard JK, Wen W (2004) Documentation for the STRUCTURE software Version 2, Chicago.
- Puffenberger EG, Kauffman ER, Bolk S, Matise TC, Washington SS, Angrist M, Weissenbach J, Garver KL, Mascari M, Ladda R, Slaugenhaupt SA, Chakravarti A (1994) Identity-by-Descent and Association Mapping of a Recessive Gene for Hirschsprung Disease on Human-Chromosome 13q22. *Human Molecular Genetics* **3**, 1217-1225.
- Pupko T, Huchon D, Cao Y, Okada N, Hasegawa M (2002) Combining multiple data sets in a likelihood analysis: which models are the best? *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2294–2307.
- Raczyński J (1964) Studies on the European hare. V: Reproduction. *Acta Theriologica* **19**, 305-352.
- Rambaut A, Drummond A (2004) TRACER. Version 1.4: MCMC Trace Analysis Tool. University of Oxford.

- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Remington CL (1968) Suture-zones of hybrid interaction between recently joined biotas. In: *Evolutionary biology* (eds. Dobzhansky MK, Hecht T, Steere W, C.), pp. 321-428. Plenum, New York.
- Reyes A, Gissi C, Catzeflis F, Nevo E, Pesole G, Saccone C (2004) Congruent mammalian trees from mitochondrial and nuclear genes using Bayesian methods. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 397-403.
- Reynolds JK, Stinson RH (1959) Reproduction in the European hare in southern Ontario. *Can. J. Zool.* **37**, 627-631.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Ricklefs RE (1980) *Ecology*, 2 edn. Nelson, Sunbury, Thames (Middlesex).
- Rico C, Rico I, Webb N, Smith S, Bell D, Hewitt GM (1994) Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics* **25**, 367.
- Robertson A, Hill WG (1984) Deviations from Hardy-Weinberg Proportions - Sampling Variances and Use in Estimation of Inbreeding Coefficients. *Genetics* **107**, 703-718.
- Robinson TJ (1982) Key to the South-African Leporidae (Mammalia, Lagomorpha). *South African Journal of Zoology* **17**, 220-222.
- Robinson TJ, Elder FFB, Chapman JA (1983) Karyotypic Conservatism in the Genus *Lepus* (Order Lagomorpha). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **25**, 540-544.
- Robinson TJ, Matthee CA (2005) Phylogeny and evolutionary origins of the Leporidae: a review of cytogenetics, molecular analyses and a supermatrix analysis. *Mammal Review* **35**, 231-247.
- Robinson TJ, Yang F, Harrison WR (2002) Chromosome painting refines the history of genome evolution in hares and rabbits (order Lagomorpha). *Cytogenetic and Genome Research* **96**, 223-227.
- Rodenhouse NL, Sherry TW, Holmes RT (1997) Site-dependent regulation of population size: A new synthesis. *Ecology* **78**, 2025-2042.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574.
- Rosenberg NA, Burke T, Elo K, Feldmann MW, Freidlin PJ, Groenen MAM, Hillel J, Maki-Tanila A, Tixier-Boichard M, Vignal A, Wimmers K, Weigend S (2001) Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* **159**, 699-713.
- Rousset F (1996) Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* **142**, 1357-1362.

- Rousset F, Raymond M (1995) Testing Heterozygote Excess and Deficiency. *Genetics* **140**, 1413-1419.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.
- Ruvolo M (1994) Molecular evolutionary processes and conflicting gene trees: The Hominoid case. *Am. J. Phys. Anthropol.* **94**, 89-113.
- Ryman N, Palm S, Andre C, Carvalho GR, Dahlgren TG, Jorde PE, Laikre L, Larsson LC, Palme A, Ruzzante DE (2006) Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology* **15**, 2031-2045.
- Saccone C, Pesole G, Sbisa E (1991) The Main Regulatory Region of Mammalian Mitochondrial-DNA - Structure-Function Model and Evolutionary Pattern. *Journal of Molecular Evolution* **33**, 83-91.
- Saccone S, Desario A, Wiegant J, Raap AK, Dellavalle G, Bernardi G (1993) Correlations between Isochores and Chromosomal Bands in the Human Genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11929-11933.
- Sanderson MJ (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1218-1231.
- Sanderson MJ (2003) r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* **19**, 301-302.
- Sarich VM, Wilson AC (1973) Generation time and genomic evolution. *Science* **179**, 1144-1147.
- Sarris A, Maniadakis M, Lazaridou O, Kalogrias V, Bariotakis M, Pirentos S (2005) Studying land use patterns in Crete island, Greece, through a time sequence of landsat images and mapping vegetation patterns. In: *Wseas International Multiconference on Int. Conf. on Environment, Ecosystems and Development (EED05)*.
- Sbisa E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* **205**, 125-140.
- Scandura M, Iacolina L, Ben Slimen H, Suchentrunk F, Apollonio M (2007) Mitochondrial CR-1 variation in Sardinian hares and its relationships with other old world hares (genus *Lepus*). *Biochemical Genetics* **45**, 305-323.
- Schlotterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365-371.
- Schmitz J, Ohme M, Zischler H (2000) The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of Scandentia to other eutherian orders. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1334-1343.

- Schneider E (1978) *Der Feldhase* Biologie, Verhalten, Hege und BLV Verlagsgesellschaft, Munich.
- Schneider E, Leipoldt M (1983) DNA relationship within genus *Lepus* in S. W. Europe. *Acta Zoologica Fennica* **174**, 31-33.
- Seddon JM, Santucci F, Reeve N, Hewitt GM (2002) Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 463-467.
- Seddon JM, Santucci F, Reeve NJ, Hewitt GM (2001) DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E.concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* **10**, 2187-2198.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.
- Sert H, Suchentrunk F, Erdogan A (2005) Genetic diversity within Anatolian brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammalian Biology* **70**, 171-186.
- Sesé C, Sevilla P (1996) Los micromamíferos del Cuaternario peninsular español: cronoestratigrafía e implicaciones bioestratigráficas. *Rev. Esp. Paleont. Mem. No Extraordinario*, 278-287.
- Shoemaker JS, Painter IS, Weir BS (1999) Bayesian statistics in genetics - a guide for the uninitiated. *Trends in Genetics* **15**, 354-358.
- Simon C (1991) Molecular systematics at species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA. In: *Molecular Techniques in Taxonomy* (eds. Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW), pp. 33-71. Springer-Verlag, Berlin.
- Simpson GG (1945) The Principles of Classification and a Classification of Mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **85**, 1-307.
- Slatkin M (1993) Isolation by Distance in Equilibrium and Nonequilibrium Populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Slatkin M (1994) Linkage Disequilibrium in Growing and Stable-Populations. *Genetics* **137**, 331-336.
- Slatkin M (2005) Seeing ghosts: the effect of unsampled populations on migration rates estimated for sampled populations. *Molecular Ecology* **14**, 67-73.
- Smith TB, Wayne RK (1996) *Molecular Genetic Approaches in Conservation* Oxford University Press.
- Smouse PE, Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* **82**, 561-573.

- Sommer RS, Benecke N (2005) The recolonization of Europe by brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 after the Last Glacial Maximum. *Mammal Review* **35**, 156-164.
- SPSS. SPSS Incorporated, 233 South Wacker Drive, Chicago, Illinois 60606-6307, USA.
- Stadler T, Delph LF (2002) Ancient mitochondrial haplotypes and evidence for intragenic recombination in gynodioecious plant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 11730-11735.
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688-2690.
- Stamatis C, Suchentrunk F, Sert H, Triantaphyllidis C, Mamuris Z (2007) Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hares *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. *Oryx* **41**, 548-551.
- Stanhope MJ, Czelusniak J, Si J-S, Nickerson J, Goodman M (1992) A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**, 148-160.
- Stieve H (1952) Zur Fortpflanzungsbiologie des europäischen Feldhasen (*Lepus europaeus*). *Zool. Anz.* **148**, 101-114.
- Stott P, Harris S (2006) Demographics of the European hare (*Lepus europaeus*) in the Mediterranean climate zone of Australia. *Mammalian Biology* **71**, 214-226.
- Suchentrunk F, Ben Slimen H, Stamatis C, Sert H, Scandura M, Apollonio M, Mamuris Z (2006) Molecular approaches revealing prehistoric, historic, or recent translocations and introductions of hares (Genus *Lepus*) by humans. *Human Evolution* **21**, 151-165.
- Suchentrunk F, Hartl GB, Flux JEC, Parkes J, Haiden A, Tapper S (1998) Allozyme heterozygosity and fluctuating asymmetry in brown hares *Lepus europaeus* introduced to New Zealand: Developmental homeostasis in populations with a bottleneck history. *Acta Theriologica*, 35-52.
- Suchentrunk F, Jaschke C, Haiden A (2001) Little allozyme and mtDNA variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from New Zealand and Britain - A legacy of bottlenecks? *Mammalian Biology* **66**, 48-59.
- Suchentrunk F, Mamuris Z, Sfougaris AI, Stamatis C (2003) Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *Biochemical Genetics* **41**, 127-140.
- Suchentrunk F, Mamuris Z, Stamatis C, Ben Slimen H, Hackländer K, Haerer G, Giacometti M (2005) Introgressive hybridization in wild living mountain hares (*Lepus timidus*) and brown hares (*L. europaeus*) and morphological consequences. *Mammalian Biology* **70**, 39-40.
- Suchentrunk F, Michailov C, Markov G, Haiden A (2000) Population genetics of Bulgarian brown hares *Lepus europaeus*: allozymic diversity at zoogeographical crossroads. *Acta Theriologica* **45**, 1-12.

- Sullivan J, Swofford DL (1997) Are guinea pigs rodents? The importance of adequate models in molecular phylogenetics. *J. Mammal. Evol.* **4**, 77–86.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 199-203.
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taberlet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **255**, 195-200.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Tajima F (1993) Simple Methods for Testing the Molecular Evolutionary Clock Hypothesis. *Genetics* **135**, 599-607.
- Takezaki N, Rzhetsky A, Nei M (1995) Phylogenetic Test of the Molecular Clock and Linearized Trees. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 823-833.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial-DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 512-526.
- Tapper SC, Barnes RFW (1986) Influence of Farming Practice on the Ecology of the Brown Hare (*Lepus-Europaeus*). *Journal of Applied Ecology* **23**, 39-52.
- Tegelstrom H, Wyoni PI, Gelter H, Jaarola M (1988) Concordant Divergence in Proteins and Mitochondrial-DNA between 2 Vole Species in the Genus *Clethrionomys*. *Biochemical Genetics* **26**, 223-237.
- Thenius E (1980) *Grundzüge der Faunen und Verbreitungsgeschichte der Säugetiere* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart & New York.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Thorne JL, Kishino H, Painter IS (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1647–1657.
- Thulin CG (2003) The distribution of mountain hares *Lepus timidus* in Europe: a challenge from brown hares *L-europaeus* ? *Mammal Review* **33**, 29-42.
- Thulin CG, Fang M, Averianov AO (2006a) Introgression from *Lepus europeus* to *L. timidus* in Russia revealed by mitochondrial single nucleotide polymorphisms and nuclear microsatellites. *Hereditas* **143**, 68-76.
- Thulin CG, Jaarola M, Tegelstrom H (1997) The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares. *Molecular Ecology* **6**, 463-467.

- Thulin CG, Stone J, Tegelstrom H, Walker CW (2006b) Species assignment and hybrid identification among Scandinavian hares *Lepus europaeus* and *L. timidus*. *Wildlife Biology* **12**, 29-38.
- Thulin CG, Tegelstrom H (2002) Biased geographical distribution of mitochondrial DNA that passed the species barrier from mountain hares to brown hares (genus *Lepus*): an effect of genetic incompatibility and mating behaviour? *Journal of Zoology* **258**, 299-306.
- Tullberg T (1899) *Ueber das System der Nagetiere: eine phylogenetische Studie* Nova Acta Reg. Soc. Sci., Upsala.
- Tzedakis C (2003) Timing and duration of Last Interglacial conditions in Europe: a chronicle of a changing chronology. *Quaternary Science Reviews* **22**, 763-768.
- Tzedakis PC (2000) Vegetation variability in Greece during the last interglacial. *Geologie En Mijnbouw-Netherlands Journal of Geosciences* **79**, 355-367.
- Tzedakis PC, Bennett KD (1995) Interglacial vegetation succession: A view from southern Europe. *Quaternary Science Reviews* **14**, 967-982.
- Tzedakis PC, Frogley MR, Heaton THE (2003a) Last Interglacial conditions in southern Europe: evidence from Ioannina, northwest Greece. *Global and Planetary Change* **36**, 157-170.
- Tzedakis PC, Hooghiemstrab H, Palike H (2006) The last 1.35 million years at Tenaghi Philippon: revised chronostratigraphy and long-term vegetation trends. *Quaternary Science Reviews* **25**, 3416–3430.
- Tzedakis PC, McManus JF, Hooghiemstra H, Oppo DW, Wijmstra TA (2003b) Comparison of changes in vegetation in northeast Greece with records of climate variability on orbital and suborbital frequencies over the last 450 000 years. *Earth and Planetary Science Letters* **212**, 197-212.
- Ujvari B, Dowton M, Madsen T (2007) Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biology Letters* **3**, 189-192.
- Vaha JP, Primmer CR (2006) Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* **15**, 63-72.
- van Kolfshoten T (2000) The Eemian mammal fauna of central Europe. *Geologie en Mijnbouw / Netherlands Journal of Geosciences* **79**, 269-281.
- Vapa L, Obreht D, Vapa M, Sad N, Selmic V (2002) Genetic variability in Brown Hare (*Lepus europeus*) populations in Yugoslavia. *Zeitschrift Fur Jagdwissenschaft* **48**, 261-266.
- Velek J, Semizorova I (1976) Biologie rozmnozovanizajice polnicho (*Lepus europeus* Pall.) ve strednich echach. *Lesnictvi* **22**, 923-938.

- Viard F, Franck P, Dubois MP, Estoup A, Jarne P (1998) Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution* **47**, 42-51.
- Vigne JD (1992) Zooarchaeology and the Biogeographical History of the Mammals of Corsica and Sardinia since the Last Ice-Age. *Mammal Review* **22**, 87-96.
- Von Wettstein O (1943) Eine neue Hasenrasse vom Peloponnes. *Zool. Anz.* **143**, 282-284.
- Voorhies MR, Timperley CL (1997) A new Pronotolagus (Lagomorpha: Leporidae) and other leporids from the Valentine railway quarries (Barstovian, Nebraska), and the archaeolagine-leporine transition. *Journal of Vertebrate Paleontology* **17**, 725-737.
- Voronoi MG (1908) Nouvelles application des parametres continus a` la theorie des formes quadratiques, deuxieme memoire, recherche sur le paralleloedres primitifs. *J. Reine Angew. Math.* **134**, 198-207.
- Waddell PJ, Cao Y, Hasegawa M, Mindell DP (1999) Assessing the Cretaceous Superordinal Divergence Times within Birds and Placental Mammals by Using Whole Mitochondrial Protein Sequences and an Extended Statistical Framework, pp. 119 - 137. Taylor & Francis.
- Waddell PJ, Shelley S (2003) Evaluating placental inter-ordinal phylogenies with novel sequences including RAG1, gamma-fibrinogen, ND6, and mt-tRNA, plus MCMC-driven nucleotide, amino acid, and codon models. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28**, 197-224.
- Wallau BR, Schmitz A, Perry SF (2000) Lung morphology in rodents (Mammalia, Rodentia) and its implications for systematics. *Journal of Morphology* **246**, 228-248.
- Waltari E, Cook JA (2005) Hares on ice: phylogeography and historical demographics of *Lepus arcticus*, *L. othus*, and *L. timidus* (Mammalia : Lagomorpha). *Molecular Ecology* **14**, 3005-3016.
- Waltari E, Demboski JR, Klein DR, Cook JA (2004) A molecular perspective on the historical biogeography of the northern high latitudes. *Journal of Mammalogy* **85**, 591-600.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* **15**, 1419-1439.
- Waples RS, Smouse PE (1990) Gametic disequilibrium analysis as a means of identifying mixtures of salmon populations. *Am. Fisher Soc. Symp.* **7**, 439-458.
- Wasilewski M (1991) Population dynamics of the European hare (*Lepus europaeus* Pallus 1978) in central Poland. *Acta Theriologica* **36**, 267-274.
- Watson JS, Taylor RH (1955) Reingestion in the Hare *Lepus-Europaeus* Pal. *Science* **121**, 314-314.

- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- White JA (1991) North American Leporidae (Mammalia, Lagomorpha) from Late Miocene (Clarendonian) to late Pliocene (Blancan). *Journal of Vertebrate Paleontology* **1**, 67–89.
- Willis KJ, Rudner E, Sümegi P (2000) The full-glacial forests of central and southeastern Europe. *Quaternary Research* **53**, 203–213.
- Wilson AC, Cann RL, Cart S, George M, Gyllenstein UB, Helm-Bychowsky KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**, 375-400.
- Wilson DE, Reeder DM (1993) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, Second edn. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Wilson EO, Brown WL (1953) The Subspecies Concept and Its Taxonomic Application. *Systematic Zoology* **2**, 97-111.
- Womble WH (1951) Differential Systematics. *Science* **114**, 315-322.
- Wood AE (1940) The mammalian fauna of the White River Oligocene. Part III. Lagomorpha. *Transactions of the American Philosophical Society, n,s*, **28**, 271-362.
- Wood AE (1957) What, If Anything, Is a Rabbit. *Evolution* **11**, 417-425.
- Wright S (1938) Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* **87**, 430-431.
- Wright S (1940) Breeding structure of populations in relation to speciation. *American Naturalist* **74**, 232-248.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28** 114–138.
- Wright TF, Johns PM, Walters JR, Lerner AP, Swallow JG, Wilkinson GS (2004) Microsatellite variation among divergent populations of stalk-eyed flies, genus *Cyrtodiopsis*. *Genetical Research* **84**, 27-40.
- Wu CH, Li HP, Wang YX, Zhang YP (2000) Low genetic variation of the Yunnan hare (*Lepus comus* G. Allen 1927) as revealed by mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Biochemical Genetics* **38**, 149-155.
- Wu CH, Wu JP, Bunch TD, Li QW, Wang YX, Zhang YP (2005) Molecular phylogenetics and biogeography of *Lepus* in Eastern Asia based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**, 45-61.
- Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**, 371-373.
- Yamada F, Takaki M, Suzuki H (2002) Molecular phylogeny of Japanese Leporidae, the Amami rabbit *Pentalagus furnessi*, the Japanese hare *Lepus brachyurus*, and the

- mountain hare *Lepus timidus*, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genes & Genetic Systems* **77**, 107-116.
- Yu X (2004) *Molecular Systematics of the Genus Lepus in China*.
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K (2001) Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65Ma to present. *Science* **292**, 686-693.
- Zagwijn WH (1992) Migration of vegetation during the Quaternary in Europe. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg* **153**, 9–20.
- Zar J (1996) *Biostatistical Analysis*, 3rd edn. Prentice-Hall, New Jersey.
- Zhang DX, Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* **12**, 563-584.
- Zimina RP (1978) Main Features of Caucasian Natural Landscapes and Their Conservation, Ussr. *Arctic and Alpine Research* **10**, 479-488.
- Zimmermann K (1953) Die Carnivora von Kreta. In: *Die Wildsauger von Kreta* (eds. Zimmermann K, Werrstein O, Siewert H, Pohle H), pp. 56-65. *Z. Säugetierk.*
- Zimmermann K, von Wettstein O, Pohle O (1953) Die Wildsauger von Kreta. *Z. Säugetierk.* **17**, 1-72.
- Zorner H (1977) Ergebnisse der untersuchung uber die Ernährung des Feldhasen-*Lepus europaeus* (Pallas 1778)- im Wildforschungsgebiet Hakel. *Beitr. Jagd.-u. Wildforsch* **10**, 255-266.
- Αντωνίου Α (2002) *Πληθυσμιακή δομή των λαγών της Κρήτης σε σχέση με πληθυσμούς της υπόλοιπης Ελλάδας*, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Όντριας ΙΧ (1996) Τάξη Λαγόμορφα. In: *Συστηματική Ζωολογία* (ed. Όντριας ΙΧ), pp. 360-361. Αθανασόπουλος-Παπαδάμης.

