



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μετακινήσεις πληθυσμών και ανθρωπογενείς παρεμβάσεις:
γονιδιακή ροή στο είδος *Lepus europaeus***



Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

Μπεγκόλλι Ροντιόλα

Λάρισα, 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

**Population translocations and anthropogenic interventions:
the gene flow of the species *Lepus europaeus***

Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology

Begkolli Rontiola

Larissa, 2018

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Υπεύθυνος καθηγητής)

Σταμάτης Κώστας, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό στο Εκπαιδευτικό Εργαστήριο Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αικατερίνη Μούττου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον, κ. Κώστα Σταμάτη και την Κα Αικατερίνη Μούτου για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Θεμιστοκλή Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις χρήσιμες συμβουλές του, καθώς και τη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus Pallas, 1778*) είναι ένα ευρέως διαδεδομένο είδος στην Ευρώπη με μεγάλο οικονομικό και ερευνητικό ενδιαφέρον, διότι αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα θηράματα στην Ευρώπη. Το είδος αυτό ευνοεί τη μελέτη εξελικτικών διεργασιών, όπως η γονιδιακή ροή και την επίδραση που έχει στη διαμόρφωση των φυλογεωγραφικών προτύπων του είδους.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, η οποία έρχεται να προστεθεί σε μια σειρά αντίστοιχων μελετών που διενεργηθήκαν στην Ελλάδα και στην Ευρώπη τα προηγούμενα χρόνια, πραγματοποιήθηκε πληθυσμιακή ανάλυση δειγμάτων ευρωπαϊκού λαγού σε ένα εκτεταμένο δίκτυο δειγματοληψίας σε ελληνικά νησιά, (Σάμος, Χίος, Ρόδος, Μυτιλήνη) στη Κύπρο, στη Νέα Ζηλανδία και στο Ηνωμένο Βασίλειο.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δημοσιευμένα δείγματα από προηγούμενες μελέτες, από την κεντρική Ευρώπη και την ηπειρωτική Ελλάδα. Η μελέτη στηρίχτηκε στην ανάλυση δύο μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Y του γονιδίου SRY και DBY8 με χρήση τεχνικών όπως PCR, PCR-SSCP και αλληλούχιση DNA. Κατά την εργασία αυτή επιλέχτηκε να μελετηθούν κυρίως νησιωτικοί πληθυσμοί λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν λόγω της γεωγραφικής και άρα αναπαραγωγικής απομόνωσης που υφίστανται.

Τα δείγματα που εξετάστηκαν, κατανεμήθηκαν φυλογεωγραφικά στις δύο απλοομάδες που είχαν προκύψει από την εργασία των Mamuris *et al.* 2010 ανάλογα με τη περιοχή προέλευσης τους. Τέλος εξετάστηκε η ύπαρξη ανθρωπογενών παρεμβάσεων ως προς τη διαμόρφωση των φυλογεωγραφικών προτύπων.

ABSTRACT

The brown hare (*Lepus europaeus Pallas, 1778*) is a widely known species throughout Europe with great economic and research interest, as it is one of the most important game species in Europe. This species favors the study of evolutionary events, such as gene flow and its effect on the formation of phylogenetic patterns of the species.

In this thesis, that comes after a series of similar studies conducted in Greece and Europe over the last few years, a population analysis was conducted on samples of brown hare, across a widespread network of sampling, in greek islands (Samos, Chios, Rodos, Mytilini), in Cyprus, in New Zealand, and in the United Kingdom. Also we used previously published samples from central Europe and from the Greek mainland. The study was based in the analysis of two Y-DNA molecular markers, the gene SRY and the gene DBY8, using techniques as PCR, PCR-SSCP and DNA sequencing. In this study, we chose to analyze mainly island populations because of their special traits, that occur because of their geographic and thus reproductive isolation.

All the samples that we examined, were allocated to the two haplogroups that have been found from the study of Mamuris *et al.* 2010 according to their regions of origin. Finally, the existence of anthropogenic interventions in the formulation of phylogenetic patterns was examined.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ	1
1.1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	1
1.1.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ VS ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	2
1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ	5
1.3 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	5
1.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ	7
1.5 ΠΑΓΕΤΩΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΔΟΙ ΚΑΙ ΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ	8
1.6 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΟΗ	9
1.6.1 ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ: ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΝΔΟ ΚΑΙ ΔΙΑ-ΕΙΔΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΟΗΣ	11
1.7 ΥΒΡΙΔΙΑΚΕΣ ΖΩΝΕΣ	12
1.8 <i>Lepus europaeus</i>	14
1.8.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ	14
1.8.2 ΦΥΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	15
1.8.3 ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ.....	15
1.8.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	16
1.8.5 ΔΙΑΤΡΟΦΗ	16
1.8.6 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	17
1.8 ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ ΤΟΥ <i>L. europaeus</i>	17
1.9 ΣΚΟΠΟΣ	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1. ΥΛΙΚΑ	21
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	21
2.2.2. ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ DNA.....	22
2.2.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	22
2.2.4. PCR-ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	24
2.2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-SSCP	26
2.2.6. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ (AgNO ₃)-Silver Staining	28
2.2.7. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	30
3.2 PCR	30
3.3 SSCP	31
3.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	34

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	36
4.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ mtDNA	36
4.2 ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ Y-DNA.....	37
4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΕΒΑΛΑΝ ΣΤΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ.....	39
4.4 ΝΗΣΙΩΤΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ.....	41
4.5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	43
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ

1.1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗΣ

Ο κλάδος της φυλογένεσης ασχολείται με τη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών, όπως αυτές διαμορφώνονται με το πέρασμα του χρόνου. Οι σχέσεις αυτές, αποτελούν ένα πολύπλοκο φαινόμενο σύνθετων διαδικασιών που περιλαμβάνουν την ειδογένεση, τη διασταύρωση ή την εξαφάνιση των πληθυσμών. Η ταξινόμηση των ειδών παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην ερμηνεία των φυλογενετικών σχέσεων.

Παλαιότερα η περιγραφή των σχέσεων μεταξύ των οργανισμών γινόταν με τη χρήση μεθόδων, οι οποίες στηρίζονταν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τη συγκριτική μορφολογία, τη φυσιολογία και άλλα. Οι μέθοδοι ανάλυσης των χαρακτήρων (που ονομάστηκαν κλαδιστικές μέθοδοι) βασίζονται εν γένει στις αρχές που περιγράφηκαν από το Γερμανό εντομολόγο Willi Hennig στο βιβλίο του *Phylogenetic Systematics* (1966). Εφόσον ήταν γνωστό ότι ο γενότυπος ενός ατόμου αντικατοπτρίζεται στο φαινότυπό του, οι μορφολογικοί χαρακτήρες ήταν εκείνοι που χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο στις κλαδιστικές μελέτες, γιατί έφεραν πληροφορίες που αντιστοιχούσαν σε μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού. Επιπρόσθετα, ο φαινότυπος είναι εκείνος που υφίσταται τις πιέσεις της φυσικής επιλογής και εξελίσσεται ορατά. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης των μορφολογικών χαρακτήρων, είναι η δυνατότητα χρήσης μεγάλου δείγματος ατόμων στις αναλύσεις, μειώνοντας με τον τρόπο αυτόν την πιθανότητα στατιστικού σφάλματος, καθώς και η δυνατότητα επανάληψης των αναλύσεων με τη χρήση των ίδιων ατόμων, εφόσον είναι δυνατή η διατήρησή τους. Για τους παραπάνω λόγους, η χρήση της μορφολογίας βρισκόταν σε άνθιση μέχρι τη δεκαετία του '80.

Οι αναλύσεις που στηρίζονται στη μορφολογία των ατόμων παρουσιάζουν όμως και μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι οι διαφορετικοί χαρακτήρες είναι, κάποιες φορές, δύσκολο να διακριθούν, συνεπώς πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η υποκειμενικότητα του ερευνητή. Επίσης, είναι δυνατό τα μορφολογικά χαρακτηριστικά να συγκλίνουν ή να εξελίσσονται παράλληλα, γεγονός που δυσχεραίνει τον εντοπισμό ομοπλασιών (Moore & Willmer 1997, Conway, 2003), ενώ και τα πρότυπα της κληρονομικότητας των μορφολογικών χαρακτήρων δεν είναι πάντα σαφή. Υπάρχουν ακόμη, περιπτώσεις όπου το πλήθος των δεδομένων (διαθέσιμων χαρακτήρων) δεν επαρκεί για τη στήριξη των φυλογενετικών υποθέσεων.

1.1.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ VS ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Με την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε όλους τους οργανισμούς και σε κάθε μόριο το οποίο φέρει κάποια πληροφορία για τον οργανισμό, από το DNA μέχρι τις πρωτεΐνες, δόθηκε λύση σε πολλά προβλήματα. Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR), δόθηκε στους ερευνητές η δυνατότητα προσδιορισμού αλληλουχιών DNA σε μεγάλη κλίμακα, οπότε οι μοριακοί χαρακτήρες έγιναν αναπόσπαστο κομμάτι των φυλογενετικών αναλύσεων.

Ωστόσο, από την αρχή σχεδόν της χρήσης των μοριακών δεδομένων, ήταν γνωστό ότι οι μέθοδοι αυτές, όπως και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούσαν μορφολογικά δεδομένα, είχαν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα, τα οποία έχουν ως ακολούθως: Η μελέτη μιας συγκεκριμένης δομής σε έναν οργανισμό, δεν παρέχει βεβαιότητα για τον τρόπο κληρονόμησης της, μιας και η διαμόρφωση της δομής μπορεί να οφείλεται σε άμεσες περιβαλλοντικές επιρροές και όχι στην κληρονομικότητα, ενώ το DNA των σύγχρονων οργανισμών προέρχεται από τους προγονικούς οργανισμούς και αντανακλά τη γενεαλογία. Εφόσον λοιπόν, για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων είναι απαραίτητη η μελέτη των κληρονομούμενων χαρακτηριστικών, η μορφολογία καθίσταται λιγότερο αξιόπιστη για τις φυλογενετικές μελέτες. Ένα από τα προβλήματα των μορφολογικών μελετών είναι το

γεγονός ότι οι υπό μελέτη οργανισμοί μπορεί να μοιάζουν εξαιρετικά μεταξύ τους στη μορφολογία, με αποτέλεσμα οι ομοιότητες αυτές να καθιστούν δυσκολότερη την εύρεση ενός αριθμού χαρακτήρων, ικανού για αξιόπιστη συστηματική ανάλυση (Hillis & Wiens 2000).

Αντιθέτως, οι αλληλουχίες του DNA αποδείχθηκε ότι είναι ευμετάβλητες ανάμεσα στα είδη και κατά συνέπεια είναι δυνατό να βρεθεί μεγάλος αριθμός θέσεων που είναι πληροφοριακές για τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα σε ταξινομικές ομάδες. Παρόλα τα πλεονεκτήματα, η μελέτη των αλληλουχιών DNA εμφανίζει ένα μειονέκτημα ως προς το κόστος. Η μελέτη της μορφολογίας υπερτερεί του DNA καθώς είναι πολύ πιο φθηνή από τη μελέτη των αλληλουχιών του DNA. Ωστόσο, η τεχνολογία αλληλούχησης του DNA γίνεται όλο και πιο φθηνή και γρήγορη με το πέρασμα του χρόνου, οπότε το πλεονέκτημα αυτό της μορφολογίας συνεχώς φθίνει. Επιπλέον, ένα πιθανό πρόβλημα που μπορεί να προκύψει από τη μελέτη ενός μόνο γονιδίου είναι η έλλειψη γνώσης σχετικά με την ύπαρξη αλληλεπίδρασης με άλλα γονίδια, επομένως χαρακτήρες που αναφέρονται ως ξεχωριστοί, μπορεί να εξελίσσονται κατά συσχετιζόμενο τρόπο, καθιστώντας τη φυλογένεση λιγότερο αξιόπιστη. Εάν η μελέτη αφορά χαρακτηριστικά που κωδικοποιούνται από πολλά γονίδια, είναι λιγότερο πιθανό η εξέλιξή τους να συσχετίζεται.

Ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών που εμφανίζουν ομολογία, μπορεί να αποτελεί πρόβλημα τόσο για τα μορφολογικά όσο και για τα μοριακά δεδομένα. Για τα μορφολογικά δεδομένα, συνήθως δεν είναι γνωστό ποια γονίδια κωδικοποιούν για συγκεκριμένες δομές, δηλαδή η ομολογία προκύπτει από την παρατήρηση της ομοιότητας, ενώ στην πραγματικότητα είναι πολύ πιθανό να κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και θα έπρεπε να θεωρούνται διαφορετικοί. Αυτό μπορεί να κάνει τη φυλογένεση αναξιόπιστη. Στην εξέλιξη του DNA, ένα αρκετά σύνηθες συμβάν είναι ο διπλασιασμός των γονιδίων, οπότε αντί για ένα αντίγραφο του γονιδίου σε μια θέση στα χρωμοσώματα, υπάρχουν δύο αντίγραφα σε διαφορετικές θέσεις που εξελίσσονται παράλληλα και αυτόνομα. Εφόσον λοιπόν η μελέτη αφορά γονίδια, υπάρχει η πιθανότητα της τυχαίας σύγκρισης του αρχικού γονιδίου ενός είδους με τη διπλασιασμένη μορφή του, σε κάποιο άλλο είδος. Αυτά τα δύο γονίδια δεν είναι πραγματικά ομόλογα. Ένα ακόμη πρόβλημα που παρουσιάζεται στον καθορισμό της

ομολογίας του DNA είναι η συχνή εμφάνιση μεταλλάξεων που προσθέτουν ή αφαιρούν ζεύγη βάσεων σε ένα γονίδιο. Το αποτέλεσμα είναι το διαφορετικό μήκος του ίδιου γονιδίου σε διαφορετικά είδη. Όταν συμβαίνει αυτό, είναι δύσκολη η σωστή στοίχιση των γονιδίων, ώστε να είναι βέβαιο ότι συγκρίνονται οι σωστές βάσεις μεταξύ των γονιδίων δύο ή περισσότερων ειδών. Συνεπώς, τόσο η μορφολογία όσο και το DNA, εμφανίζουν μειονεκτήματα στην εύρεση των κατάλληλων χαρακτήρων για τον προσδιορισμό της ομολογίας.

Από την άλλη, μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού μπορεί να είναι ουδέτερο στη δράση της φυσικής επιλογής, που σημαίνει ότι όλες οι διαφορετικές μορφές DNA σε έναν πληθυσμό έχουν την ίδια αρμοστικότητα και δεν εξελίσσονται μέσω της φυσικής επιλογής. Για την περίπτωση αυτή λοιπόν, η φυσική επιλογή δεν μπορεί να προκαλέσει συγκλίνουσα εξέλιξη εφόσον δεν επηρεάζει το τμήμα αυτό του DNA. Αυτό μπορεί να είναι ένα προνόμιο για τη μελέτη της φυλογένεσης βάσει του DNA. Όμως, τα μοριακά δεδομένα μπορεί να εμφανίσουν τυχαία συγκλίνουσα εξέλιξη, λόγω μεταλλάξεων υποκατάστασης ζευγών βάσεων, που είναι και τα σημεία τα οποία μελετώνται στις φυλογενετικές αναλύσεις βάσει μοριακών δεδομένων. Επειδή υπάρχουν μόνο τέσσερις διαφορετικές βάσεις, δεν αποκλείεται δύο διαφορετικά είδη να έχουν τυχαία την ίδια μετάλλαξη στο ίδιο σημείο, ενώ εξελίσσονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Το πρόβλημα, λοιπόν, της τυχαίας σύγκλισης παρατηρείται συχνά στις φυλογενετικές αναλύσεις βάσει του DNA.

Συμπερασματικά, οι πλέον αξιόπιστες φυλογενετικές μελέτες βασίζονται σε συνδυασμό διαφορετικών ειδών δεδομένων ώστε να καθίστανται πιο ολοκληρωμένες και να μειώνεται η πιθανότητα των σφαλμάτων (Bininda-Emonds, 2000).

Η χρήση των μοριακών δεικτών βρίσκονται στην κορυφή των σύγχρονων φυλογενετικών αναλύσεων, και εμφανίζουν μια ποικιλομορφία ανάλογα με τους σκοπούς και τις απαιτήσεις της κάθε ανάλυσης.

1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ

Μια από τις πιο συναρπαστικές εξελίξεις κατά την τελευταία δεκαετία ήταν η εφαρμογή ισχυρών και εξαιρετικά γρήγορων τεχνικών προσδιορισμού της αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων στις φυλογενετικές μελέτες. Η απαίτηση μεγάλων ποσοτήτων δεδομένων αλληλουχιών για την ανάπτυξη αξιόπιστων μαθηματικών και στατιστικών εργαλείων ανάλυσης για την επεξήγηση των εξελικτικών διαδικασιών, οδήγησε στην ανάπτυξη της μοριακής συστηματικής. Ενώ η μοριακή φυλογένεση, μπορεί να είναι ένας τομέας της εξελικτικής βιολογίας που καλύπτει ένα ευρύ φάσμα, η μοριακή συστηματική μπορεί να θεωρηθεί περισσότερο ως μια στατιστική επιστήμη στην οποία χρησιμοποιούνται ισχυρά υπολογιστικά πειράματα προσομοίωσης για την εξαγωγή φυλογενετικών δέντρων από τα βιολογικά δεδομένα που λαμβάνονται από τις μελέτες που βασίζονται στους μοριακούς δείκτες (Patwardhan *et al.* 2014).

1.3 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο και χρησιμοποιούνται στη μελέτη της κληρονομικότητας και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών με την αξιοποίηση του πολυμορφισμού που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA (Fanourakis, 2004).

Η φυλογένεση που συνάγεται από ένα γονίδιο ενός δείκτη ή από μια αλληλουχία πρωτεΐνης αντανακλά μόνο την εξέλιξη αυτού του συγκεκριμένου γονιδίου. Ωστόσο, η χρήση ενός μόνο δείκτη μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα ερμηνείας, διότι κάθε γονίδιο σε έναν οργανισμό μπορεί να έχει διαφορετικούς εξελικτικούς ρυθμούς (Patwardhan *et al.* 2014).

Δεν είναι όλα τα γονίδια ή τα μακρομόρια κατάλληλα ως φυλογενετικοί δείκτες όπως επίσης δεν είναι όλοι οι δείκτες χρήσιμοι για την ανάλυση μιας δεδομένης ομάδας οργανισμών. Υπάρχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει ένα μοριακός δείκτης για να θεωρηθεί ιδανικός (Cruickshank, 2002):

→ Ένα γονίδιο ενός αντιγράφου μπορεί να είναι πιο χρήσιμο από ένα γονίδιο πολλαπλών αντιγράφων, προϋπόθεση που πληρείται από μιτοχονδριακούς και πυρηνικούς δείκτες.

→ Καθώς οι αλληλουχίες του γονιδίου/δείκτη στοιχίζονται πριν τη φυλογενετική ανάλυση, θα πρέπει αυτή να είναι όσο το δυνατόν πιο εύκολη. Αυτό εξαρτάται από το μήκος του γονιδίου.

→ Βαθμός υποκατάστασης: ένα γονίδιο/δείκτης που εξελίσσεται πολύ γρήγορα μπορεί να φτάσει σε κατάσταση κορεσμού λόγω πολλαπλών υποκαταστάσεων.

→ Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμοι εκκινητές για την επιλεκτική ενίσχυση του γονιδίου/δείκτη. Ωστόσο, οι εκκινητές δεν θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από μεγάλη καθολικότητα, διότι αυτό θα οδηγούσε στην ενίσχυση και μη ειδικών γονιδίων (Yli-Mattila *et al.* 2000).

Μερικά επιπλέον χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει ένας μοριακός δείκτης είναι τα εξής: (Avisé *et al.* 1987, Hu *et al.* 1995)

→ Παρουσία πολυμορφισμού και ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο

→ Μεντελικός τρόπος κληρονομής με συνεπικρατή αλληλόμορφα

→ Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας: σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι η παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων

→ Άμεσος τρόπος μετάδοσης, χωρίς ανασυνδυασμό ή άλλες γενετικές αναδιτάξεις

→ Απλή γενετική δομή χωρίς πολύπλοκα στοιχεία όπως, μεταθετά στοιχεία, ψευδογονίδια και ιντρόνια

→ Δυνατή η διάκριση μεταξύ ομόζυγης και ετερόζυγης κατάστασης

→ Χαμηλό κόστος και γρήγορη μεθοδολογία απομόνωσης

1.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι δείκτες αναφέρονται παρακάτω (Patwardhan *et al.* 2014):

Πυρηνικά ριβοσωμικά γονίδια: Το ριβοσωμικό RNA θεωρείται ως ο καλύτερος στόχος για τη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων διότι παρουσιάζει μια καθολικότητα, και αποτελείται από εξαιρετικά συντηρημένες καθώς και από μεταβλητές περιοχές (π.χ. 16S rRNA) (Woese, 1987, Goerge *et al.* 1977).

Μιτοχονδριακά γονίδια (mtDNA): Η σειρά των γονιδίων στο μιτοχόνδριο είναι μεταβλητή και διαχωρίζονται μεταξύ τους από μεγάλες περιοχές μη κωδικού DNA. Επίσης έχει την δυνατότητα συχνής αναδιάταξης, έτσι ώστε πολλές αναδιαταγμένες μορφές να μπορούν να εμφανιστούν στο ίδιο κύτταρο (π.χ. κυτόχρωμα-β) (Brown, 1982).

Χλωροπλαστικά γονίδια (cpDNA): Στα φυτά, είναι μικρότερο σε μέγεθος συγκριτικά με τα μιτοχόνδρια και το πυρηνικό γονιδίωμα. Θεωρείται ότι διατηρείται στην διάρκεια της εξέλιξης όσον αφορά την υποκατάσταση νουκλεοτιδίων με πολύ μικρές αναδιατάξεις που επιτρέπουν στο μόριο να χρησιμοποιηθεί για την διαλεύκανση φυλογενετικών σχέσεων σε βαθιά εξελικτικά επίπεδα (πχ. rbcL) (Zurawski & Clegg, 1987).

Η ευκολία στον πολλαπλασιασμό, οι σχετικά γρήγοροι εξελικτικοί ρυθμοί, καθώς και η απουσία γενετικού ανασυνδυασμού, έκαναν το mtDNA αναπόσπαστο κομμάτι της συστηματικής και της γενετικής πληθυσμών (Avisé, 1986, Awadalla *et al.* 1999, Simon *et al.* 2006). Επειδή όλο το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται ως μία μονάδα, ή ένας απλότυπος, η σύγκριση του μιτοχονδριακού DNA από διαφορετικά άτομα μπορεί να παρουσιαστεί με τη μορφή φυλογενετικού δέντρου. Παρ' όλα αυτά, το μιτοχονδριακό DNA αντανακλά μόνο την ιστορία των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού και έτσι μπορεί να μην αντιπροσωπεύει την εξελικτική ιστορία όλου του πληθυσμού. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται συνήθως συμπληρωματικά και μελέτες του πυρηνικού DNA ή περιοχή του χρωμοσώματος Y, το οποίο είναι πληροφοριακό για την πατρική κληρονομία (Garrigan & Hammer, 2006). Επίσης η φυλογένεση με βάση το mtDNA (καθώς και η φυλογένεση που βασίζεται

σε μεμονωμένους πυρηνικούς δείκτες) συχνά επηρεάζονται από την γονιδιακή ροή και επομένως μπορεί να μην αντανακλούν την πραγματική φυλογενετική ιστορία ενός είδους ή ενός πληθυσμού (Leache *et al.* 2016).

Η γενετική διαφοροποίηση είναι ένα γεγονός που προκύπτει από τη δράση δύο κύριων διαδικασιών: της προσαρμοστικής επιλογής και της γενετικής παρέκκλισης. Η προσαρμοστική επιλογή αφορά την φυσική επιλογή των γονιδίων που σχετίζονται με την αρμοστικότητα και την προσαρμογή στα περιβάλλοντα, τα οποία συνεχώς μεταβάλλονται και απαιτούν τη δράση της επιλογής που οδηγεί στην προσαρμογή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα των περιβαλλοντικών αλλαγών είναι οι συνεχόμενοι κύκλοι παγετωνικών περιόδων που εμφανίζονται στην ιστορία της Γης και επηρεάζουν τα φυλογεωγραφικά πρότυπα των ειδών.

1.5 ΠΑΓΕΤΩΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΔΟΙ ΚΑΙ ΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ

Το παγκόσμιο κλίμα έχει παρουσιάσει σημαντικές διακυμάνσεις τα τελευταία τρία εκατομμύρια χρόνια, οδηγώντας στις πρόσφατες μεγάλες παγετωνικές εποχές. Μια αναπόφευκτη συνέπεια για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς είναι οι μεγάλες αλλαγές στην κατανομή τους, οι οποίες εκφράζονται διαφορετικά στις βόρειες, στις εύκρατες και τροπικές ζώνες. Τα είδη εξαφανίστηκαν σε μεγάλα τμήματα του φάσματός τους, μερικά διασκορπίστηκαν σε νέες τοποθεσίες, ενώ μερικά επιβίωσαν σε καταφύγια και στη συνέχεια επεκτάθηκαν πάλι, και αυτό έχει συμβεί επανειλημμένα (Hewitt, 2000).

Κατά τη διάρκεια των μεγάλων παγετώνων τα πολικά φύλλα πάγου εξαπλώθηκαν σημαντικά και οι θερμοκρασίες, οι θάλασσες και οι ζώνες βλάστησης συμπιέστηκαν προς τον Ισημερινό. Οι ορεινές περιοχές όπως οι Άλπεις, οι Άνδεις, οι βραχώδεις ακτές και οι περιοχές Yakutsk είχαν επίσης σημαντικά ποσοστά παγετού, έτσι ώστε η συγκέντρωση μεγάλου όγκου πάγου να οδηγήσει σε μείωση του θαλάσσιου επιπέδου κατά περίπου 120 μέτρα (Rohling *et al.* 1998). Αυτό δημιούργησε χερσαίες γέφυρες σε διάφορα μέρη του κόσμου. Τα είδη μετακινήθηκαν από τα βουνά σε θερμότερα μέρη, τα τροπικά δάση περιορίστηκαν ενώ υπήρξε επέκταση των ερήμων και της σαβάνας (Colinvaux, 1997). Η μετα-

παγετωνική επέκταση των ειδών σε νέο έδαφος είχε προηγουμένως προταθεί ότι είναι σημαντική στη γεωγραφική κατανομή του πληθυσμού και των γονιδιωμάτων των ειδών (Hewitt *et al.* 1989). Η σημερινή γενετική δομή των πληθυσμών, των ειδών και των βιοτόπων έχουν σχηματιστεί κυρίως από τις παγετωνικές εποχές της περιόδου Quaternary και η συσχέτιση γενετικών και φυσικών στοιχείων σε συνδυασμό με τα δεδομένα απολιθωμάτων μπορούν να απαντήσουν σε ερωτήματα αναφορικά με το πώς επηρεάστηκαν οι οργανισμοί (Hewitt, 2000).

Οι αλλαγές στην κατανομή των πληθυσμών ύστερα από αυτές τις μεγάλες κλιματικές αλλαγές, είχαν αξισημείωτο αντίκτυπο και σε γονιδιακό επίπεδο, καθώς αρκετά είδη εξαφανίστηκαν, ή μειώθηκαν δραματικά σε αριθμό ή ακόμα και μετακινήθηκαν σε νοτιότερες και θερμότερες περιοχές. Η μετα-παγετωνική εξάπλωση των πληθυσμών αυτών επηρέασε σαφώς τα φυλογεωγραφικά πρότυπα των ειδών όπως αυτά παρατηρούνται από σύγχρονες μελέτες, και είναι σαφώς επηρεασμένα από γεγονότα γονιδιακής ροής μεταξύ πληθυσμών ή και ειδών.

1.6 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΟΗ

Η γονιδιακή ροή μπορεί να οριστεί ως η ανταλλαγή αλληλόμορφων (αλλαγή συχνότητας γονιδίων) ανάμεσα σε γονιδιακές δεξαμενές γειτονικών πληθυσμών, και λαμβάνει χώρα είτε μέσω μετακίνησης ατόμων ή ομάδων ατόμων μεταξύ δύο πληθυσμών (π.χ. μέσω της μετανάστευσης) είτε μέσω μεταφοράς γαμετών (Slatkin, 1987). Εάν ο ρυθμός της γονιδιακής ροής είναι αρκετά υψηλός μεταξύ δύο πληθυσμών, τότε θεωρείται ότι οι πληθυσμοί αυτοί έχουν ισοδύναμη γενετική ποικιλότητα (Frankham, 2002).

Τα άτομα που μεταναστεύουν αλλάζουν την κατανομή της γενετικής ποικιλότητας μέσα στους πληθυσμούς, τροποποιώντας τις συχνότητες αλληλόμορφων. Οι υψηλοί ρυθμοί γονιδιακής ροής μπορούν να μειώσουν τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων, αυξάνοντας την ομοιογένεια. Για το λόγο αυτό, θεωρήθηκε ότι η γονιδιακή ροή περιορίζει την ειδογένεση μέσω του συνδυασμού των γενετικών δεξαμενών των ομάδων, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη

διαφορών στη γενετική ποικιλότητα που θα είχαν οδηγήσει σε πλήρη ειδογένεση (Daniel *et al.* 2007).

Το είδος των φραγμών της γονιδιακής ροής, έχει αντίκτυπο και στον τρόπο ειδογένεσης. Όταν γίνεται λόγος για φυσικούς φραγμούς, τότε το αποτέλεσμα είναι η αλλοπάτρια ειδογένεση ή η γεωγραφική απομόνωση που δεν επιτρέπει στους πληθυσμούς του ίδιου είδους να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό. Στην περίπτωση των αναπαραγωγικών φραγμών, προκύπτουν νέα είδη από τα ίδια προγονικά είδη κατά μήκος της ίδιας σειράς, ένα φαινόμενο γνωστό ως συμπάτρια ειδογένεση (Dieckmann & Doebeli, 1999).

Η γονιδιακή ροή συμβάλει σημαντικά στη σταθερότητα των ειδών, αποτρέποντας την απόκλιση των μερικώς απομονωμένων πληθυσμών και τη στάση των πολυπληθών ειδών. Διαφέρει ανάλογα με τον πληθυσμό και το είδος μειώνοντας τις διαφορές των γενετικών δεξαμενών. Διακρίνονται διαφορετικά μοντέλα γονιδιακής ροής, ανάλογα με τη δομή των πληθυσμών που εξετάζονται, συνήθως με την παραδοχή πως ο ρυθμός της γονιδιακής ροής παραμένει σταθερός από γενιά σε γενιά (Futuyma, 1983).

1. Το μοντέλο «ήπειρος-νησί» [continent-island] εστιάζει στη μεταφορά γονιδίων από ένα μεγάλο πληθυσμό (ήπειρος) σε έναν πολύ μικρότερο (νησί).
2. Το «μοντέλο των νησιών» εξετάζει τη γονιδιακή ροή μεταξύ μικρών πληθυσμών που γίνεται με τυχαίο τρόπο.
3. Το «μοντέλο του βηματισμού» [stepping-stone] αναφέρεται σε πολλούς πληθυσμούς με γονιδιακή ροή μόνο μεταξύ των γειτονικών, σε διάστημα μιας γενιάς.
4. Το «μοντέλο της απομόνωσης λόγω απόστασης» [isolation-by-distance], στο οποίο η γονιδιακή ροή μελετάται ως συνάρτηση της απόστασης τοπικών πληθυσμών που συναποτελούν μια συνέχεια.

Με βάση τον ορισμό της γονιδιακής ροής καθώς επίσης και τις επιπτώσεις της στην ειδογένεση και στην συχνότητα των αλληλομόρφων, είναι αξιοσημείωτη η συμβολή της στην οριοθέτηση των ειδών.

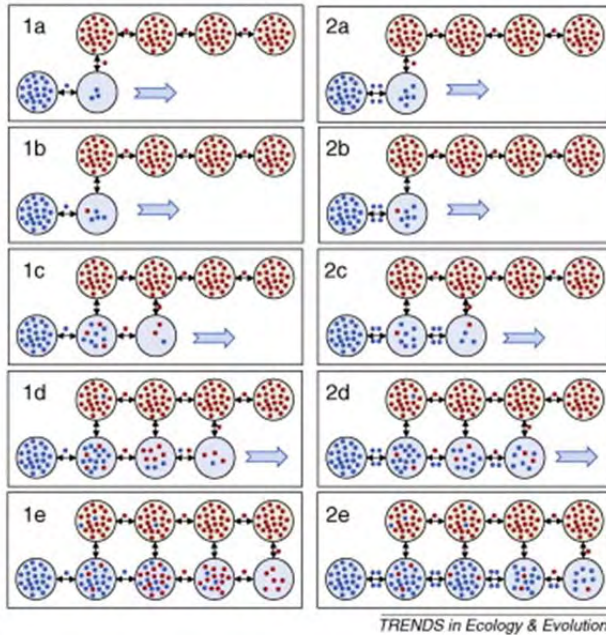
1.6.1 ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ: ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΝΔΟ ΚΑΙ ΔΙΑ-ΕΙΔΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΟΗΣ

Όσον αφορά την οριοθέτηση των ειδών, πέρα από τη χρήση δεικτών για την ανίχνευση ατόμων που εισέρχονται μέσα σ έναν πληθυσμό (Vaaha *et al.* 2006), εξίσου σημαντική είναι η αναγνώριση των αναπαραγωγικών στοιχείων που χρησιμοποιούν συστατικά του γονιδιώματος που εισρέουν πιο δύσκολα από το υπόλοιπο γονιδίωμα, κι επομένως μπορεί να μην είναι ενδεικτικά της πρόσμιξης.

Με μια πρώτη ματιά, εάν υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ της ενδοειδικής και της διαειδικής γονιδιακής ροής, η χρήση δεικτών που βιώνουν χαμηλά ποσοστά ενδοειδικής γονιδιακής ροής θα φαινόταν κατάλληλη για την οριοθέτηση των ειδών. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές δημογραφικές μελέτες που διερευνούν την κοινή δυναμική των γενετικών και δημογραφικών διεργασιών και δείχνουν ακριβώς το αντίθετο: ο ρυθμός της εισροής πρέπει συχνότερα να συσχετίζεται αρνητικά με το ρυθμό της ενδοειδικής γονιδιακής ροής (Currat *et al.* 2008). Το σκεπτικό είναι το ακόλουθο:

Οι περισσότερες επεκτάσεις των ειδών είναι δυναμικές. Εάν ένα είδος επεκτείνει το εύρος του και συναντήσει ένα στενά συγγενικό είδος με το οποίο τα αναπαραγωγικά εμπόδια παραμένουν ατελή, θα πραγματοποιηθεί ασύμμετρη εισροή από το τοπικό είδος στα εισβολικά είδη (Currat *et al.* 2004). Εντούτοις, εάν υπάρχει επαρκής ενδοειδική γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών των αποικιστικών ειδών, η γενετική μετατόπιση θα μειωθεί και τα αλληλόμορφα που εισρέουν θα είναι λιγότερο πιθανό να αυξήσουν τυχαία την συχνότητά τους στα είδη που εισβάλλουν (Currat *et al.* 2008). Ως εκ τούτου, το συμπέρασμα που προκύπτει είναι το εξής:

Όσο πιο ενισχυμένη ενδοειδική γονιδιακή ροή υπάρχει, αναμένεται μικρότερη διαειδική γονιδιακή ροή (Εικ.1) Αυτό το αντίθετο και αρκετά οξύμωρο έυρημα, υποστηρίζει την ιδέα ότι για την οριοθέτηση των ειδών θα πρέπει να προτιμούνται δείκτες που βιώνουν υψηλά ποσοστά ενδοειδικής γονιδιακής ροής (Remy & Excoffier, 2009).



Εικόνα 1 Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της ενδοειδικής γονιδιακής ροής στον περιορισμό της γονιδιακής εισροής μεταξύ μιας αποικίας και ενός τοπικού είδους. Σε αυτό το παράδειγμα, το μπλε είδος προοδευτικά αποικίζει την επικράτεια ενός τοπικού είδους (κόκκινο χρώμα). Η πορεία του αποικισμού εμφανίζεται από πάνω προς τα κάτω. Η διασταύρωση (κατακόρυφα βέλη) μπορεί να συμβεί τοπικά μεταξύ ειδών και οι πληθυσμοί από το ίδιο είδος μπορούν να ανταλλάξουν άτομα (οριζόντια διπλά βέλη). Η αριστερή στήλη (1a-1e) αντιστοιχεί στην περίπτωση χαμηλής γονιδιακής ροής που έχει ως αποτέλεσμα την (1e) μαζική γονιδιακή εισροή των τοπικών κόκκινων αλληλόμορφων στις τελικώς αποικισμένες περιοχές εξαιτίας επαναλαμβανόμενων συμβάντων εισροής. Η δεξιά στήλη (2a-2e) αντιστοιχεί στην

περίπτωση υψηλής γονιδιακής ροής, όπου η γονιδιακή εισροή των κόκκινων αλληλόμορφων είναι περιορισμένη από την ενδοειδική γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών των αποικιστικών ειδών (η παραμονή των μπλε αλληλόμορφων στον χρόνο)(Remy & Excoffier, 2009).

Για τη μελέτη της γονιδιακής ροής, βασική προϋπόθεση είναι η εύρεση των κατάλληλων οργανισμών μοντέλων καθώς και κατάλληλων πληθυσμών που θα αντιπροσωπεύουν συγκεκριμένα πρότυπα γεωγραφικής κατανομής και εξάπλωσης καθώς και αναπαραγωγικά σχήματα. Τέτοια παραδείγματα πληθυσμών αποτελούν οι νησιωτικοί πληθυσμοί καθώς και οι πληθυσμοί των υβριδιακών ζωνών.

1.7 ΥΒΡΙΔΙΑΚΕΣ ΖΩΝΕΣ

Από τη φύση τους, οι υβριδιακές ζώνες θεωρούνται ως "φυσικά εργαστήρια" για τη μελέτη ενεργών εξελικτικών δυνάμεων σε πληθυσμούς που κατοικούν σε αυτές τις περιοχές (Emerson, 2002). Οι πληθυσμοί των νησιών είναι συχνά μικροί, που προέρχονται από έναν μεγαλύτερο ηπειρωτικό πληθυσμό μέσω του φαινομένου του ιδρυτή (founder effect), με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων ετεροζυγωτίας (Baker *et al.* 1987). Οι μεταναστεύσεις προς και από τον πληθυσμό είναι συνήθως σπάνιες, ειδικά για είδη με χαμηλή ικανότητα διασποράς. Έτσι, η γενετική παρέκκλιση (drift) διαμορφώνει τα επίπεδα των

διακυμάνσεων μέσα από τις γενιές. Οι μετατοπίσεις τέτοιων πληθυσμών είναι συνήθως μεσολαβούμενες από τον άνθρωπο, ειδικά όταν τα είδη δεν έχουν την ικανότητα να πετούν (π.χ. το παράδειγμα του Iberian red deer, Fernandez-Garcia *et al.* 2014). Βέβαια υπάρχουν και περιπτώσεις που οι μετατοπίσεις πραγματοποιούνται από μόνιμες ή παροδικές χειρσαίες γέφυρες (van Andel *et al.* 1982, Sfethourakis *et al.* 2017).

Υβριδιακοί πληθυσμοί σχηματίζονται σε περιοχές όπου δύο διαφορετικά γονιδιώματα συναντώνται και υβριδοποιούνται (Barton *et al.* 1989). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων παγετώνων που έλαβαν χώρα την περίοδο του Quaternary, οι πληθυσμοί του Βορρά μειώθηκαν δραματικά λόγω εξαφάνισης ή με μετανάστευσης προς νότια και θερμότερα εδάφη (Hewitt, 2000, Hewitt, 2004, Wayne *et al.* 1992).

Στο παράδειγμα της Ευρώπης, ο βόρειος πληθυσμός έχει μεταναστεύσει στον Νότο, όπου μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί ορισμένες και ξεχωριστές φυλές για τα είδη στην Ιταλία, την Ιβηρική Χερσόνησο, τα Βαλκάνια και την Ανατολή (Hewitt, 2000, Orth *et al.* 2002, Dubey *et al.* 2006, Taberlet *et al.* 1998).

Η απομόνωση αυτών των πληθυσμών για μεγάλο χρονικό διάστημα είχε σαν αποτέλεσμα τη γενετική διαφοροποίησή τους. Η επακόλουθη μεταπαγετωνική επέκταση των πληθυσμών οδήγησε στο σχηματισμό των υβριδιακών ζωνών, όπου συναντήθηκαν διαφορετικά γονιδιώματα, αλλά οι διαφορές τους ήταν υπεύθυνες για την υβριδιακή αναρμοστικότητα (Hewitt, 2004).

Η γενετική διαφοροποίηση των γονιδιωμάτων μπορεί να είναι αποτέλεσμα επιλογής ή μετατόπισης. Εκτός από την υβριδοποίηση, οι ενδοειδικές σειρές δεν αναμιγνύονται γεωγραφικά, πράγμα που θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της κλασικής υβριδιακής αναρμοστικότητας: τα υβρίδια F1 είναι συνήθως γόνιμα και καλά προσαρμοσμένα, αλλά τα υβρίδια F2 τείνουν να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα αρμοστικότητας και προσαρμογής (Hewitt, 1988, Burton *et al.* 2006, Smith *et al.* 2010). Πιστεύεται ότι οι υβριδιακές ζώνες διατηρούνται με τη δράση δύο διαφορετικών διεργασιών: την τυχαία διασπορά και την επιλογή έναντι υβριδίων (Barton *et al.* 1989). Η μειωμένη αρμοστικότητα των υβριδίων προκαλείται συνήθως από πολλά γονίδια με μικρή επίδραση, τα οποία διαδίδονται σε όλα τα γονιδιώματα,

αντί για τη μεγάλη συμβολή μερικών γονιδίων (Hewitt, 1988). Έτσι, τα αλληλόμορφα που διασχίζουν τη ζώνη υφίστανται αρνητική επιλογή: βρίσκονται σε λανθασμένο περιβάλλον ή συνδυάζονται με λανθασμένα αλληλόμορφα (Barton *et al.* 1989). Αυτοί οι παραπάτριοι πληθυσμοί και οι υβριδιακές ζώνες μπορεί να αντικατοπτρίζουν τα διαφορετικά στάδια που αντιστοιχούν στα επίπεδα κλιμάκωσης της διαφοροποίησης, από διαφορετικούς πληθυσμούς, μέχρι διαφορετικά είδη (Hewitt, 1988). Η ύπαρξη υβριδιακών ζωνών έχει χαρακτηριστεί καλά για μια ποικιλία ειδών, όπως η ακρίδα, ο σκαντζόχοιρος, η μυγαλή, ο ποντικός και ο ευρωπαϊκός λαγός (Bilgin, 2011).

Ένα παράδειγμα ενός είδους για τη μελέτη των παραπάνω εξελικτικών δυνάμεων που δρουν σε πολλαπλά επίπεδα της πληθυσμιακής δυναμικής είναι ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus* Pallas, 1778).

1.8 *Lepus europaeus*

1.8.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη του *Lepus europaeus*.

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Chordata
Υπό-φυλο	Vertebrate
Κλάση	Mammalia
Τάξη	Lagomorpha
Οικογένεια	Leporidae
Γένος	<i>Lepus</i>
Είδος	<i>europaeus</i>



Εικόνα 2. *Lepus europaeus*

1.8.2 ΦΥΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο ευρωπαϊκός λαγός έχει συνολικό μήκος 600-750 mm και ζυγίζει από 3-5 κιλά (Peterson, 1966, Hall και Kelson, 1959). Το τρίχωμά του κυμαίνεται σε τόνους γκριζου, μαύρου και καφέ, με εξαίρεση την κοιλιά η οποία είναι γκριζα-άσπρη. Έχει μακριά αυτιά με μαύρες άκρες που είναι γκριζα στο εσωτερικό. Τα πίσω πόδια του είναι πιο μακριά από τα μπροστινά, ενώ τα πέλματά του καλύπτονται από παχύ τρίχωμα για να εμποδίζουν την ολίσθηση. Το κεφάλι είναι καφέ, και τα μάτια του έχουν στρογγυλό σχήμα. Η ουρά του είναι μαύρη στην κορυφή και λευκή στο κάτω μέρος με μήκος 7-11 εκατοστά. Το χειμώνα, το τρίχωμά του γίνεται λίγο πιο γκριζο (Peterson, 1966, Bansfields, 1974). Επίσης, δεν έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτος διμορφισμός ανάμεσα στα δύο φύλα. Η μοναδική διαφορά που έχει παρατηρηθεί είναι ότι τα αρσενικά έχουν συνήθως πιο παχύ και κοντό λαιμό σε σχέση με τα θηλυκά άτομα (Bansfield, 1974, Dragg, 1974).

1.8.3 ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί είναι κυρίως μοναχικά ζώα με εξαίρεση την εποχή του ζευγαρώματος. Παραμένουν ενεργοί καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Κατά τη διάρκεια της ημέρας εμφανίζουν ένα είδος κατάθλιψης που ονομάζεται «μορφή», και με την στάση του σώματός τους καταφέρνουν να κρύψουν την εμφάνισή τους με την πλάτη τους (Bansfield, 1974). Παρουσιάζουν εξαιρετική αίσθηση όρασης, οσμής και ακοής. Παρουσία κάποιου θηρευτή, έχουν την ικανότητα να τρέχουν με μεγάλη ταχύτητα και να αλλάζουν εύκολα κατεύθυνση εάν χρειαστεί. Η ταχύτητά τους φτάνει μέχρι τα 60 km/h σε ευθεία γραμμή. Επίσης, είναι αξιοπρεπείς κολυμβητές μιας και έχουν την ικανότητα να βουτάνε σε ρέματα εάν χρειαστεί (William and Whitaker, Bansfield, 1974). Ο *L. europaeus* έχει χαρακτηριστεί ως ήσυχος ζώο. Όμως έχει προταθεί ότι όταν τρίβει τα δόντια του είναι ένα σήμα ότι βρίσκεται σε κίνδυνο. Επιπλέον βγάζει ένα διαπεραστικό ήχο όταν είναι πληγωμένος ή όταν αιχμαλωτιστεί (Peterson 1966, Bansfield 1974). Στους φυσικούς εχθρούς του κατατάσσονται η

κόκκινη αλεπού, ο λύκος, ο ύλικας, τα μεγάλα γεράκια και η κουκουβάγια (Bansfield, 1974).

1.8.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί έχουν παρατεταμένη αναπαραγωγική περίοδο που διαρκεί από τον Ιανουάριο έως τον Αύγουστο (Holly, 2001). Η μέγιστη αναπαραγωγική δραστηριότητα συμβαίνει τον Μάρτιο, φαινόμενο γνωστό και ως «March madness», με αποτέλεσμα τον Απρίλιο τα περισσότερα θηλυκά άτομα να είναι έγκυα με περισσότερα από 3-4 έμβρυα το καθένα (Lincoln, 1974). Το σύστημα ζευγαρώματος του λαγού δεν είναι περιορισμένο, καθώς έχει περιγραφεί πως ένα αρσενικό ζευγαρώνει με πολλαπλά θηλυκά (Bray *et al.* 2007). Τα θηλυκά γεννούν σε κοιλάτητες στο έδαφος και οι νεαροί λαγοί έχουν κατά μέσο όρο βάρος περίπου 130 γραμμάρια (4.6 oz) κατά τη γέννηση (Kurta and Allen, 1995). Η περίοδος κυοφορίας κυμαίνεται από 30 έως 42 ημέρες, ενώ ο απογαλακτισμός υπολογίζεται ότι διαρκεί περίπου ένα μήνα (Broekhuizen *et al.* 1980, Bansfield, 1974). Οι νεαροί λαγοί διασκορπίζονται κατά τη διάρκεια της ημέρας και ξανασυναντιούνται το βράδυ στο σημείο που γεννήθηκαν, ώστε να τα φροντίσει η μητέρα και ύστερα να διασκορπιστούν ξανά. Σκοπός αυτής της τακτικής είναι να αποφύγουν την προσέλκυση αρπακτικών (Naughton, 2012). Οι νεαροί, γνωστοί και ως «leverets», φτάνουν στη σεξουαλική ωριμότητα σε διάστημα 8-12 μηνών απ' την στιγμή της γέννησης (Bansfield, 1974).

1.8.5 ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί είναι φυτοφάγα ζώα και τρέφονται με χόρτα, βότανα και αγρωστώδη φυτά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Το χειμώνα, η διατροφή τους αποτελείται από κλαδιά, μπουμπούκια, φλοιούς θάμνων, φλοιούς μικρών δέντρων και φλοιούς φρούτων. Η κοπροφαγία αποτελεί χαρακτηριστικό του είδους, καθώς καταναλώνουν τα δικά τους πράσινα σφαιρίδια κοπράνων ώστε να ανακτήσουν

βιταμίνες και πρωτεΐνες που δεν έχουν υποστεί βλαβή (Banfield, 1974, Peterson, 1966).

1.8.6 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Ο ευρωπαϊκός λαγός συναντάται στο μεγαλύτερο τμήμα της Ευρώπης και ανατολικά της Μ.Ασίας έως την Κεντρική Ασία (Lincoln, 1974, Broekhuizen & Maaskamp, 1980, Caillol & Meunier, 1989, Poli *et al.*, 1991). Επίσης έχει εισαχθεί στην Αμερική, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία (Lincoln, 1974, Caillol & Meunier, 1989, Bonino & Montenegro, 1997).

1.8 ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ ΤΟΥ *L. europaeus*

Οι Kasapidis *et al.* 2005, μελέτησαν τη φυλογεωγραφική κατανομή του ευρωπαϊκού λαγού, αναλύοντας αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου του mtDNA από 98 δείγματα λαγών από την ηπειρωτική και τη νησιωτική Ελλάδα, τη Βουλγαρία, την Κύπρο και το βόρειο Ισραήλ καθώς και 44 δημοσιευμένες αλληλουχίες που προέρχονταν από λαγούς της κεντρικής Ευρώπης και της Ιταλίας. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν δύο διακριτούς τύπους μιτοχονδρικού DNA, έναν «ανατολικό τύπο» και ένα «δυτικό τύπο», με μέση νουκλεοτιδική διαφοροποίηση 6.6%. Ο «ανατολικός τύπος» περιλαμβάνει απλότυπους από τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου, την Κύπρο, το Βόρειο Ισραήλ, τη Θράκη και την ανατολική Μακεδονία ενώ στον «δυτικό τύπο» περιλαμβάνονται οι απλότυποι από την Κρήτη, τη Λευκάδα, τη Νάξο, τα Κύθηρα και την ηπειρωτική Ελλάδα καθώς και οι απλότυποι της Αυστρίας, της Γερμανίας, της Ουγγαρίας, της Σερβίας, της Ρουμανίας, της Βουλγαρίας και της Ιταλίας. Μια ζώνη επικάλυψης ή αλλιώς υβριδική ζώνη των δύο τύπων μιτοχονδριακού DNA εντοπίζεται στην περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας.

Στη μελέτη των Stamatis *et al.* 2009 πραγματοποιήθηκε ανάλυση του mtDNA με τη μέθοδο RFLP σε 3 τμήματα του γονιδιώματος (cytb/CR, COI και 12S/16S rRNA). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 926 δείγματα ευρωπαϊκού λαγού, από 33 περιοχές δειγματοληψίας που προέρχονταν

από 15 χώρες της Ευρώπης και της Ασίας. Επιπλέον αναλύθηκαν αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου (CR) του μιτοχονδριακού DNA από 69 δείγματα λαγού, αντιπροσωπευτικά από τις περιοχές δειγματοληψίας, οι οποίες συγκρίθηκαν με 137 αλληλουχίες που προήλθαν από την τράπεζα δεδομένων GenBank. Από την ανάλυση προέκυψαν 112 απλότυποι οι οποίοι ομαδοποιούνται σε πέντε, εμφανώς διαχωρισμένες, φυλογεωγραφικές απλοομάδες, οι οποίες είναι οι εξής:

1. Νοτιοανατολικού Ευρωπαϊκού τύπου Απλοομάδα (**SEeh**)
2. Ανατολικού-Μεσανατολικού τύπου Απλοομάδα (**AMh**)
3. Ευρωπαϊκού τύπου Απλοομάδα-Υποομάδα A (**EUh-A**)
4. Ευρωπαϊκού τύπου Απλοομάδα-Υποομάδα B (**EUh-B**)
5. Ενδιάμεση Απλοομάδα (**INTERh**)

Από την ανάλυση αποδεικνύεται η ύπαρξη της υβριδιακής ζώνης στη Βορειοανατολική Ελλάδα και τη Βουλγαρία, λόγω της παρουσίας απλοτύπων και από τις πέντε απλοομάδες, που προαναφέρθηκε στην μελέτη των Kasapidis *et al.* 2005.

Οι Mamuris *et al.* 2001 μελέτησαν τη γενετική διαφοροποίηση και τη φυλογενετική κατάσταση πληθυσμών του *L.europraeus* της κεντρικής Ελλάδας, καθώς και την επίδραση των απελευθερώσεων εκτρεφόμενων ατόμων στη γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών. Από την ανάλυση, προσδιορίστηκαν συγκεκριμένα πρότυπα mtDNA, τα οποία διαφοροποιούσαν εντελώς τους εκτρεφόμενους από τους φυσικούς πληθυσμούς και αποδείκνυαν, σε μεγάλο βαθμό, την ύπαρξη εκτρεφόμενων λαγών εντός των φυσικών πληθυσμών, πιθανόν από παλαιότερες απελευθερώσεις. Επίσης, η ανάλυση του mtDNA απέδειξε τη διείσδυση αλλόχθονων γονιδιακών αποθεμάτων στους φυσικούς πληθυσμούς.

Στην εργασία των Mamuris *et al.* 2010, παράλληλα με την ανάλυση του κυτοχρώματος b, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Y του ευρωπαϊκού λαγού, οι οποίοι κληρονομούνται

μονογονεϊκά, με σκοπό να συγκριθεί το πρότυπο κατανομής της γονιδιακής τους ροής με αυτό του μιτοχονδριακού DNA αλλά και με δείκτες οι οποίοι κληρονομούνται διγονεϊκά (αλλοένζυμα, μικροδορυφόροι, RAPDs). Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα τμήμα του εξονίου του γονιδίου SRY και μια περιοχή ιντρονίου μεταξύ των εξονίων 8 και 9 του γονιδίου DBY (DEAD box Y-linked), οι οποίοι δεν εμφανίζουν κανένα ανασυνδυασμό (Gubbay *et al.* 1990, Sinclair *et al.* 1990, Hellborg και Ellegren, 2004) και χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα Y.

Η πληθυσμιακή ανάλυση αποκάλυψε τρεις διαφορετικές αλληλουχίες για το εξόνιο SRY (EX-A, EX-B, EX-C) και δύο αλληλουχίες για το ιντρόνιο DBY (IN-A, INB). Από την ανάλυση του εξονίου προέκυψε ότι η συντριπτική πλειονότητα των λαγών είχαν τον απλότυπο EX-A. Όσον αφορά την πληθυσμιακή ανάλυση του ιντρονίου, ο απλότυπος IN-A βρέθηκε σε όλους τους λαγούς της Τουρκίας, του Ισραήλ, στο 27% των λαγών της Βουλγαρίας και στο 6,8 % των λαγών της Ελλάδας, ενώ ο απλότυπος IN-B βρέθηκε στην πλειονότητα των λαγών της Ευρώπης ενώ απουσίαζε εντελώς από την Τουρκία και το Ισραήλ. Τα δεδομένα της ανάλυσης αποκάλυψαν χαμηλά επίπεδα ενδοειδικού γενετικού πολυμορφισμού των δεικτών του χρωμοσώματος Y, κάτι που είχε αναφερθεί και σε προηγούμενη μελέτη του γονιδίου SRY στον ευρωπαϊκό λαγό (Putze *et al.* 2007).

Οι λαγοί που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή, είχαν προηγουμένως αναλυθεί σε επίπεδο μιτοχονδριακού DNA (Stamatis *et al.* 2009), δίνοντας τη δυνατότητα για σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο δεικτών που κληρονομούνται μονογονεϊκά. Επίσης τα ίδια άτομα είχαν μελετηθεί ως προς την γενετική τους διαφοροποίηση σε επίπεδο πυρηνικού DNA, χρησιμοποιώντας δείκτες μικροδορυφόρων, αλλοενζύμων και RAPDs. Οι μελέτες αυτές, έδειξαν ένα γενικευμένο πρότυπο πληθυσμιακής ποικιλομορφίας και διαφοροποίησης, με σχετικά μεγάλο αριθμό μοναδικών αλληλομόρφων αλλά με ενδείξεις για παρουσία γονιδιακής ροής μεταξύ πληθυσμών που βρίσκονται σε γειτονικές περιοχές (Mamuris *et al.* 2002, Suchentrunk *et al.* 2003, Sert *et al.* 2005, Ben Slimen *et al.* 2008). Αντιθέτως, τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεικτών του χρωμοσώματος Y υποδηλώνουν την παρουσία δύο κύριων φυλογενετικών κλάδων, για τον

ευρωπαϊκό λαγό, ανάμεσα σε Ευρώπη και Ανατολή. Από τις προηγούμενες μελέτες στο μιτοχονδριακό DNA αποδείχτηκε η παρουσία μίας μεγάλης ζώνης επικάλυψης απλοτύπων στη Βουλγαρία και τη Βορειοανατολική Ελλάδα. Στην περιοχή αυτή παρατηρήθηκε επίσης, και η παρουσία των δύο απλοτύπων που προέκυψαν από την ανάλυση των δεικτών του χρωμοσώματος Y, του ευρωπαϊκού και του ανατολικού απλοτύπου, γεγονός που ενισχύει την θεωρία περί ύπαρξης γονιδιακής ροής από περιοχές της Ανατολής προς την Ευρώπη, μέσω μίας χερσαίας γέφυρας στην περιοχή του Βόσπορου την τελευταία περίοδο της Πλειστόκαινου, η οποία εξαφανίστηκε, λόγω της αύξησης της στάθμης της θάλασσας, 8000 χρόνια π.Χ. (Geoffrey και Hosey, 1982, Gökaşan *et al.* 1997). Σε αντίθεση με το μιτοχονδριακό DNA, βρέθηκαν λαγοί στην Κεντρική Ελλάδα οι οποίοι είχαν ανατολικού τύπου Y-DNA. Είναι πιθανόν η τάση των θηλυκών λαγών για φιλοπατρία να καθιστά πιο δύσκολη τη διασπορά του mtDNA σε σχέση με το DNA του Y χρωμοσώματος, όπως επίσης, υπάρχει η πιθανότητα οι λαγοί αυτοί να προέρχονται από προγενέστερες απελευθερώσεις λαγών, οι οποίοι εισήχθησαν από περιοχές της Βουλγαρίας (Stamatis *et al.* 2007).

1.9 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της φυλογεωγραφίας και της επίδρασης των μετακινήσεων των πληθυσμών του είδους *Lepus europaeus* στην εμφάνιση των προτύπων αυτών, με τη χρήση μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Y πάνω σε νησιωτικούς πληθυσμούς, καθώς και η σύγκριση των προτύπων που προέκυψαν με αυτά προηγούμενων μελετών που βασίστηκαν σε μιτοχονδριακούς και πυρηνικούς δείκτες.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.ΥΛΙΚΑ

Πίνακας 2: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

1.Ammonium persulfate	10.dNTPs
2.Bromophenol Blue	11.Proteinase K
3.EtOH	12.Formaldehyde
4.Glycerol	13.MgCl ₂
5.Tris Acetate Acid/EDTA (TAE)	14.NaBH ₄
6.Tris Borate Acid/EDTA (TBE)	15.TEMED
7.Acrylamide	16.AgNO ₃
8.Agarose	17.100bp Ladder
9.Bis Acrylamide	18.Kappa Taq Polymerase

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για την πειραματική διαδικασία, χρειάστηκε να γίνει απομόνωση του DNA από 229 δείγματα ευρωπαϊκού λαού. Ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε ήταν ηπατικός, και ύστερα από κατάτμησή του ακολουθήθηκαν τα βήματα του πρωτοκόλλου NucleoSpin® Tissue “Genomic DNA from tissue” kit. Ύστερα από την απομόνωση, το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% για να εκτιμηθεί η ποσότητα και η ποιότητα του.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA που απομονώθηκε δεν μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την ακριβή ποσότητα του, και γι'αυτό ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής του.

2.2.2. ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ DNA

Η φωτομέτρηση του DNA πραγματοποιήθηκε ύστερα από αραιώση της ολικής ποσότητας DNA με τις εξής αναλογίες: 1μL DNA προς 99 μL H₂O. Η διαδικασία έλαβε χώρα με χρήση ειδικής κυψελίδας και η μέτρηση έγινε σε φωτόμετρο Eppendorf, το οποίο ύστερα από τις κατάλληλες ρυθμίσεις μετατρέπει τις τιμές απορρόφησης σε συγκέντρωση DNA με μονάδα μέτρησης το ng/mL.

2.2.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτής αγαρόζης είναι ο πλέον αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού θραυσμάτων DNA ποικίλων μεγεθών που κυμαίνονται από 100 bp έως 25 kb (Sambrook *et al.* 2001)

Κατά τη δημιουργία της πηκτής, τα πολυμερή αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών στο οποίο, τα μεγέθη των πόρων προσδιορίζουν τις ικανότητες της μοριακής διήθησης της πηκτής. Η χρήση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης προκάλεσε επανάσταση στον διαχωρισμό του DNA. Πριν από την υιοθέτηση πηκτωμάτων αγαρόζης, το DNA διαχωριζόταν κυρίως χρησιμοποιώντας φυγοκέντρηση βάσει βαθμίδωσης πυκνότητας σακχαρόζης, η οποία παρείχε μόνο μια προσέγγιση μεγέθους. Για να διαχωριστεί το DNA χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης, το DNA φορτώνεται σε φρεάτια στο πήκτωμα και εφαρμόζεται ρεύμα. Ο φωσφορικός σκελετός του μορίου DNA (και RNA) είναι αρνητικά φορτισμένος, επομένως όταν τοποθετείται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, τα θραύσματα DNA μετακινούνται προς τον θετικό πόλο (Pei Yun Lee *et al.* 2012).

Ο ρυθμός μετακίνησης ενός μορίου DNA μέσω πηκτής εξαρτάται από τα ακόλουθα:

- 1) μέγεθος μορίου DNA
- 2) συγκέντρωση αγαρόζης
- 3) διαμόρφωση DNA (Aaji *et al.* 1972)
- 4) εφαρμοζόμενη τάση
- 5) παρουσία χρωστικής
- 6) τύπος αγαρόζης
- 7) ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Μετά το διαχωρισμό, τα μόρια DNA μπορούν να φανούν σε φως UV ύστερα από χρώση με κατάλληλη χρωστική (Pei Yun Lee *et al.* 2012).

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

Ζυγίστηκε η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης. Τα πηκτώματα αγαρόζης παρασκευάζονται με χρήση εκατοστιαίας αναλογίας επί τοις εκατό κατά βάρος. Η συγκέντρωση της αγαρόζης σε ένα πήκτωμα εξαρτάται από τα μεγέθη των θραυσμάτων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν.

Παρασκευή πηκτώματος:

Στη συγκεκριμένη διαδικασία για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1% ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 0,6 gr αγαρόζης σε 50 mL TAE 1x με χρήση κωνικής φιάλης (200 mL) και ήπια ανάδευση
2. Διάλυση της αγαρόζης με θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων
3. Προσθήκη 1μL της χρωστικής SERVA© Electrophoresis GmbH (1X)
4. Ήπια μείωση της θερμοκρασίας του διαλύματος με εξωτερική πλύση της κωνικής με τρεχούμενο νερό βρύσης
5. Χρήση ενός δίσκου γέλης με σφραγισμένα άκρα για να δημιουργηθεί ένα καλούπι, και τοποθέτηση κατάλληλης χτένας για τη δημιουργία των φρεατίων
6. Ρίξη του διαλύματος αγαρόζης στο καλούπι και αναμονή για 30 λεπτά ώστε να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου.

Ηλεκτροφόρηση:

1. Προετοιμασία των δειγμάτων DNA που προορίζονται προς διαχωρισμό με ανάμιξη με διάλυμα χρωστικής/φόρτωσης (loading buffer) το οποίο περιλαμβάνει μπλε της βρωμοφαινόλης. Το διάλυμα φόρτωσης χρησιμεύει στην καθήζιση του DNA στον πάτο του φρεατίου καθώς επίσης και στην παρακολούθηση της κίνησης των ζωνών κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης
2. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x στη συσκευή ηλεκτροφόρησης μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια της γέλης
3. Φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια, χρησιμοποιήθηκε επίσης και ένας μάρτυρας-δείκτης γνωστών μεγεθών DNA

4. Σύνδεση των καλωδίων της συσκευής στην τροφοδοσία ρεύματος και ενεργοποίηση της τροφοδοσίας
5. Παρατήρηση των ζωνών μετά από περίπου 20 λεπτά και τερματισμός της τροφοδοσίας όταν οι ζώνες φτάσουν στην κατάλληλη απόσταση

Παρατήρηση των ζωνών:

1. Αφαίρεση της γέλης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και αφαίρεση της περίσσειας του ρυθμιστικού διαλύματος μέσω απορρόφησης με χαρτί
2. Αφαίρεση της γέλης από το δίσκο και έκθεση της σε φως UV για παρατήρηση των ζωνών. Οι ζώνες εμφανίζονται με πράσινο φθορίζον χρώμα κάτω από το UV.

2.2.4. PCR-ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Πραγματοποιήθηκε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) για κάθε δείγμα με δύο σκοπούς:

- 1) Να διαχωριστούν τα δείγματα αρσενικού φύλου από τα δείγματα θηλυκού φύλου και
- 2) Να ενισχυθούν τα επιθυμητά τμήματα γονιδίων, τα οποία βρίσκονται πάνω στο Y χρωμόσωμα και είναι τα εξής: SRY (239 bp) και DBY8 (179bp)

Πίνακας 3: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR.

Εκκινητές	Αλληλουχία
SRY-Fw	5'- CGGCCAGGAACGGTCAAGCG- 3'
SRY-Rv	5'- CCTTCCGGCGAGGTCTGTAC- 3'
DBY8-Fw	5'- CCCCAACAAGAGAATTGGCT- 3'
DBY8-Rv	5'- CAGCACCACCATAKACTACA- 3'

Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν ειδικά Eppendorf tubes. Επίσης λήφθηκαν υπόψη και τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης ώστε σε κάθε αντίδραση να υπάρχουν περίπου 100 ng DNA. Έτσι στην αρχή δημιουργήθηκε ένα mix που περιείχε κάθε απαραίτητο συστατικό επι των αριθμό των επιθυμητών αντιδράσεων. Στα eppendorf tubes προστέθηκε 1μL DNA και 49 μL από το Mix για κάθε δείγμα με τελικό όγκο στα 50 μL. Τα συστατικά της κάθε αντίδρασης καθώς και οι αντίστοιχες ποσότητες παρατίθενται στον Πίνακα 4. Βασικό βήμα της διαδικασίας είναι η χρήση ενός αρνητικού μάρτυρα ο οποίος περιλαμβάνει όλα τα συστατικά, εκτός του DNA, για τον έλεγχο των αντιδραστηρίων.

Οι συνθήκες της PCR, με βάση τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, αναλύονται στον πίνακα 5. Τα στάδια της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης συμπλήρωσαν 35 κύκλους.

Στο τέλος, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v για να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης.

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος για την αντίδραση PCR

Συστατικά			Ποσότητες/ PCR tube
Buffer	10x	1x	5 μL
MgCl₂	50mM	2mM	1 μL
Primers Fw	50pM	1pM	1 μL
Primers Rv	50pM	1pM	1 μL
DNTPs	10mM	0.2mM	1 μL
DNA Πολυμεράση- Kappa Taq	5U/μL		0.2 μL
DNA	100 ng		
ddH₂O	Μέχρι τελικό όγκο 50 μL ανά αντίδραση		

Πίνακας 5: Συνθήκες PCR

Στάδια	Θερμοκρασίες-Χρόνοι
Αρχική Αποδιάταξη	95 C για 4 min
Αποδιάταξη	95 C για 40 sec
Υβριδοποίηση	51 C για 40 sec
Επιμήκυνση	72 C για 40 sec
Τελική επιμήκυνση	72 C για 10 min

2.2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-SSCP

Η ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (**Single-Strand Conformation Polymorphism**) περιλαμβάνει PCR ενίσχυση του τμήματος υπό μελέτη, αποδιάταξη του δίκλωνου PCR προϊόντος με θερμότητα και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, μονοκλωνικά θραύσματα DNA διπλώνονται σε ένα τρισδιάστατο σχήμα σύμφωνα με την πρωτοταγή τους αλληλουχία. Η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα εξαρτάται από το σχήμα του διπλωμένου, μονόκλωνου μόριου. Σ' αυτήν την τεχνική είναι δυνατόν να ανιχνευτούν μικρές διαφορές στην αλληλουχία ακόμη και η διαφορά σε ένα νουκλεοτίδιο διότι αυτή η αλλαγή στην αλληλουχία μπορεί να δώσει διαφορετική δευτεροταγή δομή και κατ'επέκταση διαφορετική κινητικότητα στην πηκτική (Nataraj *et al.* 1999).

Πολλές παράμετροι έχουν βρεθεί εμπειρικά ότι επηρεάζουν την ευαισθησία της ανάλυσης SSCP. Μεταξύ αυτών είναι:

1. τύπος της μετάλλαξης
2. μέγεθος θραύσματος DNA
3. περιεχόμενο σε βάσεις G και C
4. περιεκτικότητα πολυακρυλαμίδης
5. μέγεθος πηκτής
6. θερμοκρασία πηκτώματος κατά τη διάρκεια ηλεκτροφόρησης
7. συγκέντρωση DNA
8. χρόνος εκτέλεσης της ηλεκτροφόρησης
9. σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος, συμπεριλαμβανομένης της ιοντικής ισχύος και του pH
10. πρόσθετα ρυθμιστικού διαλύματος, όπως γλυκερόλη ή σακχαρόζη (Kakavas *et al.* 2008)

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται με πολυμερισμό ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή N,N' methylene bisacrylamide (Bis). Η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από την ποσότητα της ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή στο μείγμα. Όσο πιο μεγάλοι είναι οι πόροι της πηκτής, τόσο πιο γρήγορα κινούνται τα μόρια.

Ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων που θα ηλεκτροφορηθούν και την ποιότητα των αποτελεσμάτων που απαιτείται, χρησιμοποιούνται πηκτές πολυακρυλαμίδης με διαφορετικές συγκεντρώσεις σε κάθε περίπτωση. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα πιο αργά. Επομένως, ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR επιλέχθηκε και η συγκέντρωση της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Τα δείγματα που ενισχύθηκαν ύστερα από PCR με εκκινητές DBY (179bp) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική συγκέντρωσης 12%, ενώ τα δείγματα SRY (239bp) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική 10%. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Σύσταση διαλύματος για πηκτική πολυακρυλαμίδης

	10% w/v	12% w/v
Ακρυλαμίδη	7,8 g	6 g
Bis-ακρυλαμίδη	0.25 g	0.2 g
Γλυκερόλη 50%	6 ml	6 ml
10x TBE Buffer	6.4ml	6.4ml
TEMED	70 μ l	70 μ l
APS 20% w/v	400 μ l	400 μ l
ddH ₂ O	Μέχρι 60ml	

Βήματα για τη δημιουργία της πηκτής:

- 1) Προσθήκη ακρυλαμίδης, Bis-ακρυλαμίδης, γλυκερόλης και ρυθμιστικού διαλύματος TBE σε ένα ποτήρι ζέσεως χωρητικότητας 500mL
- 2) Συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 60mL και ανάδευση μέχρι να διαλυθούν
- 3) Διήθηση διαλύματος σε ογκομετρικό σωλήνα μέχρι τελικό όγκο 65mL
- 4) Ύστερα από προσθήκη TEMED και APS το διάλυμα τοποθετήθηκε στο εκμαγείο δημιουργίας της πηκτής για να επιτευχθεί η πήξη της σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 12μL PCR προϊόντος και 10μL χρωστικής SSCP και ακολούθησε αποδιάταξη των δειγμάτων.

Η χρωστική της SSCP περιείχε τα εξής:

- I. 95% formamide
- II. 10 mM NaOH
- III. 0,05% Bromophenol blue
- IV. 0,05% xylene cyanol
- V. 10% glycerol

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης στα 220 Volt, ύστερα από προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, 0,5x TBE buffer σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες.

2.2.6. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ (AgNO_3)-Silver Staining

Με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών στο τζελ ακρυλαμίδης απαραίτητη ήταν η χρώση του με νιτρικό αργυρο. Ο νιτρικός άργυρος έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA και να αντιδρά με το διάλυμα της φορμαλδεΰδης, που προστίθεται, παρουσία βάσης εμφανίζοντας τις ζώνες του DNA με καφέ χρώμα σε κίτρινο gel.

Για τη χρώση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα 1:

1mL οξικού οξέος και ddH₂O ως τα 400mL

Διάλυμα 2:

0,2g νιτρικού αργύρου διαλύεται με ανάδευση σε 200mL ddH₂O

Διάλυμα 3:

Προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 200mL σε κωνική φιάλη που περιέχει 3gr NaOH, ~0,01gr NaBH₄ και 1mL φορμαλδεΰδης.

Βήματα:

1. Πλύση της πηκτής με 200mL του διαλύματος 1 για 3 λεπτά
2. Μετά το πέρας των 2 λεπτών, το διάλυμα 1 απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το πρώτο βήμα
3. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος 2, νιτρικού αργύρου για περίπου 8-10 λεπτά
4. Αφού απορριφτεί το διάλυμα νιτρικού αργύρου, οι πηκτές ξεπλένονται δύο φορές με απιονισμένο νερό (1 λεπτό η κάθε πλύση).
5. Προσθήκη του διαλύματος 3, το οποίο αναδεύεται μέχρι οι ζώνες να γίνουν ορατές στην πηκτή
6. Τέλος, πραγματοποιείται μία τελευταία πλύση με απιονισμένο νερό για περίπου 1 λεπτό, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αργύρου που έχει παραμείνει στο gel.

Με το πέρας της διαδικασίας, γίνεται σύγκριση των ζωνών των διαφορετικών ατόμων ώστε να προσδιοριστούν τα κοινά και τα διαφορετικά τους πρότυπα.

2.2.7. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων επιλέχθηκαν 1-2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο ώστε να γίνει αλληλούχισή τους. Η απομόνωση των προϊόντων PCR έγινε από πηκτή αγαρόζης σύμφωνα με τις οδηγίες του Kit.

Τα αποτελέσματα λήφθηκαν με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου βρέθηκε η αλληλουχία, κι έπειτα χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής (πχ. BioEdit).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Ύστερα από την απομόνωση του DNA από τα δείγματα, αυτή επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, καθώς και με φωτομέτρηση ύστερα από την κατάλληλη αραίωση.



Εικόνα 3. Ενδεικτική εικόνα απομόνωσης DNA και ηλεκτροφόρησής του σε τζελ αγαρόζης 1% w/v.

3.2 PCR

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα τμήμα του εξονίου του γονιδίου SRY και μια περιοχή ιντρονίου μεταξύ των εξονίων 8 και 9 του γονιδίου DBY8 (DEAD box Y-linked), οι οποίοι δεν εμφανίζουν κανένα ανασυνδυασμό (Gubbay *et al.* 1990, Sinclair *et al.* 1990, Hellborg και Ellegren, 2004).

Αρχικά, δεν υπήρχε γνώση σχετικά με τα θηλυκά και τα αρσενικά άτομα, επομένως με την αντίδραση της PCR ενισχύθηκαν τα επιθυμητά τμήματα και ταυτόχρονα διαχωρίστηκαν τα αρσενικά από τα θηλυκά άτομα.

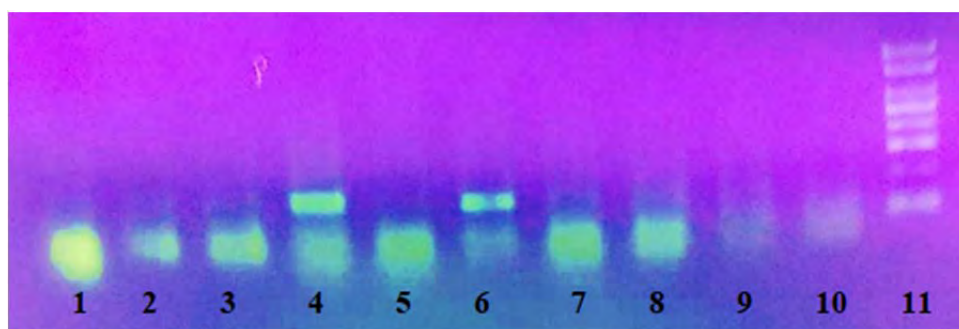
Εξετάστηκαν συνολικά 229 δείγματα, από τα οποία βρέθηκε ότι τα 94 αντιστοιχούσαν σε αρσενικούς λαγούς (Πίνακας 7). Τα δείγματα προέρχονταν από περιοχές νησιών: Κύπρος, Νέα Ζηλανδία, Αγγλία, Σάμος, Χίος, Μυτιλήνη.

Ύστερα από την ενίσχυση των αλληλουχιών στόχων, τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v (Εικ.3), μαζί με τον αρνητικό μάρτυρα για να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης. Με την ύπαρξη του ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), γίνεται μια

πρώτη εκτίμηση του μεγέθους τους ενισχυμένου τμήματος. Τα τμήματα που ενισχύθηκαν είχαν τα εξής μεγέθη: SRY-239bp και DBY-179bp.

Πίνακας 7. Ο αριθμός των αρσενικών ατόμων και οι αντίστοιχες περιοχές προέλευσης των δειγμάτων

Περιοχή δειγμάτων	Αριθμός αρσενικών ατόμων
Κύπρος	18
Σάμος	17
Αγγλία	28
Νέα Ζηλανδία	26
Μυτιλήνη	3
Χίος	2



Εικόνα 4. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Οι θέσεις στις οποίες εμφανίζονται ζώνες αντιστοιχούν σε αρσενικά άτομα, ενώ στις θέσεις 10 και 11 εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας και ο ladder αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες θέσεις που δε χαρακτηρίζονται από ύπαρξη ζωνών, αντιστοιχούν σε θηλυκά άτομα. Οι έντονες ζώνες που εμφανίζονται χαμηλά, αντιστοιχούν στους εκκινητές.

Στη συνέχεια τα ενισχυμένα τμήματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για να ομαδοποιηθούν τα διαφορετικά πρότυπα των αλληλουχιών.

3.3 SSCP

Με βάση τα πρότυπα που παρατηρήθηκαν ύστερα από την ηλεκτροφόρηση των ζωνών σε πηκτή ακρυλαμίδης (Εικ. 5), ξεχωριστά για τα τμήματα του DBY8 και του SRY, ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα

που εμφάνιζαν όμοιο πρότυπο και έπειτα, ένα δείγμα από κάθε ομάδα αλληλουχήθηκε. Ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα από όλα τα νησιά, προκειμένου να διακριθούν οι πολυμορφισμοί.

Η πρώτη εκτίμηση έδειξε την ύπαρξη 9 ομάδων με διαφορά ως προς τα πρότυπα των ζωνών για το τμήμα του γονιδίου SRY και 13 ομάδων για το DBY8 (Πίνακας 6).

Πίνακας 8: Η ομαδοποίηση των προτύπων με βάση τα αποτελέσματα της SSCP.

Συντομογραφίες: SAM: Σάμος, CYP: Κύπρος, UK: Αγγλία, N.Z: Νέα Ζηλανδία, CHI: Χίος, Rod: Ρόδος

Αριθμός ομάδας (SRY)	Άτομα	Αριθμός ομάδας (DBY)	Άτομα
1	SAM 45, CYP 39, CYP 38, SAM 41, CYP 33	1	UK SL15, CYP 36, UK SL7, N.Z 105
2	UK SL17, CYP 20	2	UK SL13
3	UK S4	3	N.Z 67, N.Z 12
4	CYP 40	4	CYP 18
5	CYP 7	5	CHI 16, CYP 1
6	CYP 6	6	CYP 35, Rod 16
7	CYP 4	7	UK SL13, UK SL2
8	CYP 1	8	N.Z 23
9	CYP 8	9	N.Z 20
		10	N.Z 64
		11	SAM 6
		12	UK SL14
		13	UK SL11

3.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Απλότυποι του γονιδίου SRY: όλα τα άτομα είχαν τον ίδιο απλότυπο ο οποίος ήταν ο ίδιος με αυτόν που είχε βρεθεί στη μελέτη των Mamuris *et al.* 2010, παρόλο που στην τεχνική της SSCP οι απλότυποι ομαδοποιήθηκαν σε 9 ομάδες.

>EU939383.1 *Lepus europaeus* haplotype EX-A sex determining factor on Y (SRY) gene, partial cds

```
CGGCCAGGAACGGGTCAAGCGACCCATGAACGCGTTCATGGTGTGGTCCC  
AACATCAGAGACGCCAGGTGGCTCTGCAGAATCCCAAATGCGAAACTCA  
GACATCAGCAAGCAGCTGGGACACCAGTGGAATAATGCTTTCAGAAGCTG  
AAAAATGGCCATTCTTCCAGGAGGCGCAAAGACTGCAGGCGGTGCACAA  
AGAGAAATACCCGGACTACAAGTACAGACCTCGCCGGAAGG
```

Απλότυποι του γονιδίου DBY8: Οι απλότυποι από τις περιοχές της Αγγλίας, της Μυτιλήνης, της Ρόδου και της Νέας Ζηλανδίας εντάχθηκαν στον ευρωπαϊκό τύπο με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης των Mamuris *et al.* 2010. Ενώ οι απλότυποι από τις περιοχές της Χίου και της Σάμου εμφάνισαν Ανατολικό απλότυπο σε σύγκριση με τα ίδια δεδομένα (Πίνακας 9). Ένας σχετικά διαφοροποιημένος απλότυπος που εντάχθηκε στην ευρωπαϊκή ομάδα βρέθηκε μεταξύ των ατόμων της Αγγλίας (Εικ 7).

>S4

```
CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTA  
GTGTAGTCACTAGCAATTTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTAT  
AAATTTTTTGCTTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTAT  
GGTGGTGCTGA
```

>S5

```
CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTA  
GTGTAGTACTAGCAATTTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTAT  
AAATTTTTTGCTTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTAT  
GGTGGTGCTGA
```

>S6

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTA
GTGTAGTTACTAGCAATTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTAT
AAATTTTTTGCCTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTAT
GGTGGTGCTGA

>S7

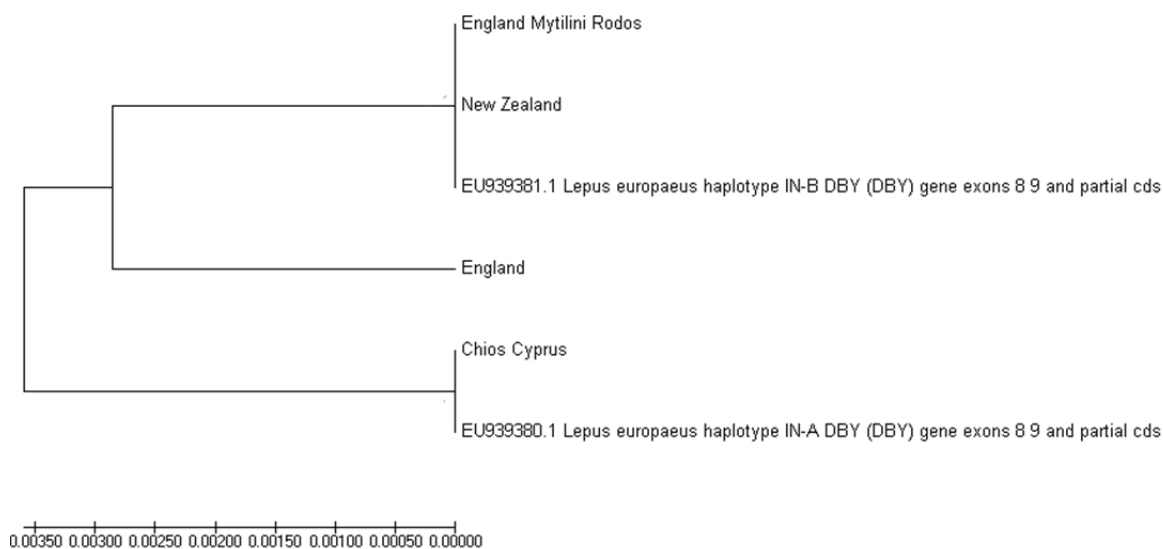
CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTA
GTGTAGTTATTAGCAATTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTAT
AAATTTTTTGCCTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTAT
GGTGGTGCTGA

>EU939380.1 *Lepus europaeus* haplotype IN-A DBY (DBY) gene, exons 8, 9 and partial cds

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTA
GTGTAGTTATTAGCAATTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTAT
AAATTTTTTGCCTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTAT
GGTGGTGCTGA

>EU939381.1 *Lepus europaeus* haplotype IN-B DBY (DBY) gene, exons 8, 9 and partial cds

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTA
GTGTAGTTACTAGCAATTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTAT
AAATTTTTTGCCTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTAT
GGTGGTGCTGA



Εικόνα 7. Φυλογενετικό δέντρο με βάση τους απλοτύπους του DBY8

Πίνακας 9. Αποτελέσματα αλληλούχισης με βάση το Y-DNA του γονιδίου DBY8

Περιοχή	Τύπος Y-DNA (DBY8)
Αγγλία	Ευρωπαϊκός
Χίος	Ανατολικός
Μυτιλήνη	Ευρωπαϊκός
Σάμος	Ευρωπαϊκός
Κύπρος	Ανατολικός
Νέα Ζηλανδία	Ευρωπαϊκός
Ρόδος	Ευρωπαϊκός

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ mtDNA

Οι Kasapidis *et al.* 2004, μελέτησαν τη φυλογεωγραφική κατανομή του ευρωπαϊκού λαού και τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν δύο διακριτούς τύπους mtDNA (ανατολικός και ευρωπαϊκός) καθώς και την ύπαρξη μιας υβριδικής ζώνης. Ο ανατολικός τύπος περιλαμβάνει απλότυπους από τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου, τη Κύπρο, το βόρειο Ισραήλ, τη Θράκη και την ανατολική Μακεδονία, στο δυτικό τύπο περιλαμβάνονται οι απλότυποι από τη Κρήτη τη Λευκάδα, τη Νάξο, τα Κύθηρα και την ηπειρωτική Ελλάδα καθώς και οι απλότυποι της Αυστρίας, της Ουγγαρίας, της Γερμανίας, της Σερβίας, της Ιταλίας, της Ρουμανίας και της Βουλγαρίας. Η ζώνη επικάλυψης των δύο τύπων εντοπίζεται στη περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας.



Εικόνα 8. Κατανομή των απλοτύπων του είδους *L.europaicus*. Παρουσίαση των δύο κλάδων Α (κόκκινο χρώμα) και Β (πράσινο χρώμα), με βάση μιτοχονδριακούς δείκτες. Με μπλε χρώμα σημειώνεται η υβριδική ζώνη (Kasapidis *et al.* 2004, Stamatis *et al.* 2009).

Στη μελέτη των Stamatis *et al.* 2009 μελετήθηκαν τρία τμήματα του γονιδιώματος (cytb/CR, COI 12S/16S rRna). Η ανάλυση συμφώνησε με την προγενέστερη ομαδοποίηση των 2 κλάδων mtDNA, και έγινε και μια λεπτομερέστερη κατηγοριοποίηση των ομάδων.

4.2 ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ Y-DNA

Στην μελέτη των Mamuris *et al.* 2010 μελετήθηκαν τόσο το *Cytb* γονίδιο του mtDNA όσο και δείκτες χρωμοσώματος Y, σε ένα σχετικά μεγάλο αριθμό δειγμάτων του *L. europaicus* από την Ευρώπη και την Ανατολή (Τουρκία και Ισραήλ). Η απουσία γενετικής μεταβλητότητας τόσο ενδοειδικά όσο και διαειδικά καθιστά αυτούς τους δείκτες ακατάλληλους για οποιαδήποτε περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση. Αυτά τα ευρήματα είναι σύμφωνα με τη γενική παρατήρηση ενός χαμηλού επιπέδου μεταβλητότητας αλληλουχίας ενδοειδικά στο χρωμόσωμα Y θηλαστικών (Shen *et al.* 2000).

Η πληθυσμιακή ανάλυση αποκάλυψε τρεις διαφορετικές αλληλουχίες για το εξόνιο SRY, με την μια από αυτές να είναι η πιο συχνή στα

περισσότερα δείγματα , και δύο αλληλουχίες για το ιντρόνιο DBY (IN-A, INB).

Τα δεδομένα του Y-DNA υπογραμμίζουν την ύπαρξη δύο σημαντικών φυλογενετικών κλάδων στο *L. europaeus* μεταξύ της Ανατολής και της Ευρώπης. Η νουκλεοτιδική απόκλιση μεταξύ των "Ανατολικών" και "Ευρωπαϊκών" απλοτύπων SRΥ ήταν πολύ μικρή, με μόνο μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση. Ωστόσο, η μεγάλη συντηρητική φύση αυτού του τμήματος και το γεγονός ότι η ίδια νουκλεοτιδική υποκατάσταση ήταν η μόνη που διαχώριζε το γένος *Lepus* στο επίπεδο του είδους, μάλλον υποδηλώνει έναν σημαντικό βαθμό γενετικής απόκλισης.

Σε συμφωνία με τα προηγούμενα δεδομένα από διαφορετικές περιοχές του mtDNA (Stamatis *et al.* 2009) η φυλογενετική ανάλυση του Cyt β γονιδίου σε αυτή τη μελέτη επιβεβαιώνει την ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών απλοομάδων με μια καλά καθορισμένη κατανομή σε όλη την Ευρώπη και την Ανατολή. Επιπλέον, σύμφωνα με τις γενετικές αποστάσεις, η μελέτη αποδεικνύει έναν βαθύ διαχωρισμό των Μεσοανατολίτικων (Ανατολή, Ισραήλ) και των ευρωπαϊκών γενεαλογιών του *L. europaeus* σε επίπεδο mtDNA (Stamatis *et al.* 2008). Αντίθετα, οι μικροδορυφόροι δεν υποδηλώνουν μια τόσο έντονη διαφοροποίηση (Ben Slimen *et al.* 2008).

Το παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν πως η αποκλειστική μελέτη των φυλογεωγραφικών προτύπων των ειδών με βάση μοριακούς δείκτες του Υ χρωμοσώματος δεν είναι αρκετή λόγω των χαμηλών επιπέδων πολυμορφισμού τους. Εντούτοις, και η χρήση μιτοχονδριακών δεικτών, παρά τα πλεονεκτήματά τους ως μοριακοί δείκτες, εμφανίζει το μειονέκτημα πως παρουσιάζει πληροφορίες μόνο για τις θηλυκές γενεαλογίες. Επομένως ένας συνδυασμός μελέτης και των δύο δεικτών καθώς επίσης και η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο περιπτώσεων αλλά και με τα αποτελέσματα της χρήσης πυρηνικών δεικτών, είναι η κατάλληλη προσέγγιση για την μελέτη των σύνθετων εξελικτικών γεγονότων και την εύρεση του φυλογεωγραφικού ιστορικού.

Επιπροσθέτως, είναι βασική η έρευνα σχετικά με τους παράγοντες που συνέβαλαν και οδήγησαν στη δημιουργία των φυλογεωγραφικών προτύπων που είναι διακριτά σήμερα. Εκτός από την επίδραση των

παγετωνικών περιόδων, φαίνεται να έχει αξιοσημείωτο αντίκτυπο και η ανθρώπινη παρέμβαση.

4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΕΒΑΛΑΝ ΣΤΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ

Τα δεδομένα από την μελέτη των μιτοχονδριακών δεικτών έδειξαν την ύπαρξη δύο σημαντικών φυλογενετικών κλάδων στο *L. europaeus*. Ο εκτιμώμενος χρόνος απόκλισης (105.000-490.000 χρόνια BP) τοποθετεί τον διαχωρισμό περίπου 2-5 παγετωνικές περιόδους πριν.

Αυτοί οι δύο κλάδοι, αν και γεωγραφικά διαφορετικοί, σχηματίζουν μια ζώνη αλληλεπικάλυψης στην περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας. Η περιοχή αυτή είναι μια γνωστή υβριδική ζώνη της Ευρώπης (Hewitt, 1999) για τα είδη που είχαν περιοριστεί στα νότια Βαλκάνια και στη Μικρά Ασία κατά τη διάρκεια των παγετώνων της Πλειστόκαινου. Για τον ευρωπαϊκό λαγό φαίνεται ότι ο σχηματισμός αυτής της ζώνης αλληλεπικαλύψεων είναι το αποτέλεσμα δευτερεύουσας επαφής των αποκλινουσών ομάδων γονιδίων μεταξύ ενός πληθυσμού προσφύγων στα νότια Βαλκάνια και ενός δυτικού ανατολικού πληθυσμού. Η ζώνη αυτή πιθανότατα δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της τελευταίας μεταπαγετωνικής περιόδου (περίπου 15.000-9.500 έτη πριν), όταν η Ευρώπη και η Ανατολή συνδέονταν για τελευταία φορά με γέφυρα (Aksu *et al.* 1999) και το κλίμα ήταν αρκετά ζεστό ώστε να επιτρέψει στους λαγούς να διασκορπιστούν από τα παγετωνικά καταφύγια. Η παρουσία ανατολικών (Ανατολικού-Μεσανατολικού τύπου) απλοτύπων στα νοτιοανατολικά των Βαλκανίων αποδεικνύει αρχαία γονιδιακή ροή από την Ανατολή προς την Ευρώπη που πέρασε την γειτονική χερσαία γέφυρα του Βοσπόρου την εποχή της Πλειστόκαινου, η οποία εξαφανίστηκε μόλις πριν από 8000 χρόνια με την άνοδο της στάθμης της θάλασσας (Gokas *et al.* 1997). Η ερμηνεία αυτή συμφωνεί με την υπόθεση ότι οι λαγοί κατάφεραν να μεταναστεύσουν από την Ανατολή σε τμήματα των νοτιοανατολικών Βαλκανίων και αποίκισαν ακόμη και κάποια ελληνικά νησιά στα ανοικτά της Ανατολής κατά την παλιά εποχή των παγετώνων ή / και στη πρόιμη Ολόκαινο όταν αυτά τα νησιά ήταν ακόμα συνδεδεμένα με την Ανατολή (Kasapidis *et al.* 2005).

Γενικά, η Ανατολή έχει θεωρηθεί βιογεωγραφικό σταυροδρόμι για πολλά είδη θηλαστικών, με συνεχή γονιδιακή ροή από τις Ευρω-Σιβηρικές, Ιρανο-Τουρνιακές και Σαχαρό-Σινδικές περιοχές στην Ανατολή κατά τη διάρκεια της Πλειστόκαινου και του Ολόκαινου (Cheylan, 1991, Sert et al., 2005) .

Σχετικά με την υβριδική ζώνη, διαφορετικές μελέτες (Kasapidis et al., 2005) υποδεικνύουν ύπαρξη πολυάριθμων απλοτύπων όλων των απλομάδων στη Βουλγαρία και τη βορειοανατολική Ελλάδα. Μέσα σε αυτή τη ζώνη καταγράφηκε μια πρόσμιξη και των δύο τύπων Y-DNA, με διαφορετικούς συνδυασμούς μεταξύ μιτοχονδριακών και Y-DNA γραμμών (άτομα με Ανατολικούς ή Ευρωπαίους απλότυπους και για τους δύο δείκτες ή με το ανατολικό mtDNA και το Ευρωπαϊκό Y-DNA ή το αντίστροφο).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, σε αντίθεση με το mtDNA, το ανατολικό Y-DNA επεκτάθηκε στην κεντρική Ελλάδα, όπου εντοπίστηκε σε μερικά άτομα. Είναι πολύ πιθανό ότι η τάση προς τη φιλοπατρία των θυλικών λαγών να καθιστά δυσκολότερη την διείσδυση του mtDNA σε σύγκριση με το Y-DNA, με αποτέλεσμα διαφορετικά μοτίβα κατανομής. Είναι επίσης πιθανό ότι το ανατολικό Y-DNA στην κεντρική Ελλάδα αποτελεί αποτέλεσμα των προηγούμενων απελευθερώσεων ατόμων που εισήχθησαν από τη Βουλγαρία (Mamuris et al. 2010).

Όσον αφορά την Ιταλία, σύμφωνα με την ανάλυση των δεδομένων της μελέτης των Stamatis et al. 2009 και αυτών των Pierpaoli et al. 1999, οι απλότυποι που ανήκουν στην ομάδα EUh-A (Ευρωπαϊκού τύπου-A) κυριαρχούν στην Ιταλία. Ένα πολύ εύλογο φυλογενετικό σενάριο είναι ότι αυτοί οι απλότυποι θα μπορούσαν να έχουν φτάσει στην ιταλική χερσόνησο λόγω της διασποράς των καφέ λαγών μετά το LGM (Pierpaoli et al., 1999). Ένα εναλλακτικό σενάριο, βασίστηκε στην πληροφορία της υπερβολικής θήρευσης και των μαζικών απελευθερώσεων καφέ λαγών στην Ιταλία που ξεκίνησε στις αρχές του 1900 και συνεχίστηκε σε μεγάλη κλίμακα μέχρι τουλάχιστον τη δεκαετία του 1990 (Pierpaoli et al., 1999).

Για τους λαγούς των βρετανικών νήσων, που θεωρούνται ξεχωριστά υποείδη (*L. e. Occidentalis*), αποδείχτηκε ότι είναι φυλογενετικά στενά συνδεδεμένα με τους λαγούς της βόρειας ηπειρωτικής Ευρώπης. Η

υπόθεση για την ύπαρξη τους εκεί, περιλαμβάνει τη φυσική μετανάστευση μέσω της χερσαίας γέφυρας που υπήρχε κατά τη διάρκεια της πρώιμης Ολοκαίνου μεταξύ των βρετανικών νήσων και της ηπειρωτικής Ευρώπης, ή την εισαγωγή τους από τους αρχαίους Ρωμαίους ή ακόμα νωρίτερα από νεολιθικούς ή μεσολιθικούς άποικους (Suchentrunk *et al.*, 2006).

Γενικότερα, σχετικά με το είδος *L.euroareus*, οι ανθρώπινες παρεμβάσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τις μαζικές απελευθερώσεις αρσενικών λαγών από κυνηγητικούς συλλόγους, τις εκτροφές λαγών και τις επιτηδευμένες διασταρώσεις, μπορούν να επηρεάσουν το γενετικό υπόβαθρο του είδους και να αλλοιώσουν στην πορεία της φυλογένεσης.

Ο ευρωπαϊκός λαγός αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά θηρεύσιμα είδη στην Ελλάδα αλλά και σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες (Pielowski, 1976). Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί κατακόρυφη μείωση των πληθυσμών του ευρωπαϊκού λαγού εξαιτίας διαφόρων γεωργικών δραστηριοτήτων, που μεταβάλλουν τις περιοχές διαβίωσης και της έντονης πίεσης που ασκείται στους πληθυσμούς από τη θήρευση και από διάφορες ασθένειες. Βάσει ιστορικών δεδομένων, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μεταφορές πληθυσμών ευρωπαϊκού λαγού, οι οποίες, ενδεχομένως επηρέασαν το φυλογεωγραφικό πρότυπο του μιτοχονδριακού DNA του ευρωπαϊκού λαγού, στις περιοχές που έχουν μελετηθεί (Kasapidis *et al.* 2005, Suchentrunk *et al.* 2006). Το γενετικό υπόβαθρο του είδους λοιπόν, επηρεάστηκε λόγω εισαγωγής αλλόχθονων ατόμων του είδους στα πλαίσια προγραμμάτων εμπλουτισμού σε περιοχές που ο πληθυσμός των λαγών είχε μειωθεί. (Flux 1983, Pierpaoli *et al.* 1999).

4.4 ΝΗΣΙΩΤΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

Στην πρόσφατη μελέτη των Giannoulis *et al.* (in press) πραγματοποιήθηκε φυλογεωγραφική ανάλυση των πληθυσμών του Ευρωπαϊκού λαγού στα νησιά η οποία επέτρεψε να μελετηθεί η επίδραση του φαινομένου του ιδρυτή σε αυτούς τους πληθυσμούς όσον αφορά τον γενετικό πολυμορφισμό σε σύγκριση με τους πληθυσμούς της ηπειρωτικής χώρας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι συγκεκριμένοι νησιωτικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν χαμηλότερο επίπεδο γενετικού πολυμορφισμού, αλλά η γεωγραφική προέλευση δεν είναι ο μοναδικός καθοριστικός παράγοντας, καθώς και η γενεαλογία προέλευσης φαίνεται να συμβάλει στα επίπεδα του γενετικού πολυμορφισμού των νησιωτικών πληθυσμών, δεδομένου ότι οι ειδικοί πληθυσμοί νησιών που ανήκουν σε μία γενεαλογία παρουσίαζαν μεγαλύτερο βαθμό διαφοροποίησης σε σύγκριση με συγκεκριμένους ηπειρωτικούς πληθυσμούς της άλλης γενεαλογίας. Στην μελέτη αυτή δόθηκε μια συμπληρωματική εξήγηση που βασίστηκε και σε προηγούμενες μελέτες καθώς και στην θεωρία που αναπτύχθηκε από τους Petit και Excoffier (2009), και αφορά είδη των οποίων μετακινούνται κυρίως τα αρσενικά άτομα ενώ τα θηλυκά εμφανίζουν φιλοπατρία. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η εισροή γονιδιώματος χαρακτηρίζεται κυρίως από την εισροή του mtDNA, ακολουθεί σε συχνότητα η εισροή του χρωμοσώματος Y και τα υπόλοιπα αυτοσωμικά χρωμοσώματα εμφανίζουν την μικρότερη εισροή. Επιπλέον, με βάση αυτή τη θεωρία και σε συνδυασμό με δεδομένα από άλλες μελέτες (Stamatis *et al*, 2009 Kasapidis *et al*, 2004, Djan *et al*, 2017) προκύπτει το συμπέρασμα ότι το Quaternary έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των φυλογεωγραφικών προτύπων του είδους, απομονώνοντας τους πληθυσμούς σε ξεχωριστά καταφύγια, οδηγώντας στη γονιδιωματική διαφοροποίηση και στις γονιδιωματικές συγκρούσεις που παρατηρούνται σήμερα.

Σχετικά με την μελέτη της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Y, οι οποίοι κληρονομούνται μονογονεϊκά, με σκοπό να συγκριθεί το πρότυπο κατανομής της γονιδιακής ροής με αυτό του μιτοχονδριακού DNA αλλά και με άλλους δείκτες. Το Y χρωμόσωμα των θηλαστικών έχει αυστηρά πατρική κληρονομηση και μικρότερο ρυθμό μεταλλάξεων σε σχέση με το mtDNA (Schaffner, 2004). Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα τμήμα του εξωνίου του γονιδίου SRY και μια περιοχή του ιντρονίου, του γονιδίου DBY, οι οποίοι δεν εμφανίζουν κανένα ανασυνδιασμό. (Gubbay *et al.*, 1990, Sinclair *et al.*, 1990, Hellborg και Ellegren, 2004).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν σε γενικές γραμμές, με κάποιες αποκλίσεις, με τις γενεαλογίες που έχουν προταθεί από προηγούμενες μελέτες με βάση το Y-DNA. Συγκεκριμένα,

μελετήθηκαν δείγματα από νησιωτικούς πληθυσμούς (Αγγλία, Νέα Ζηλανδία, Κύπρος, Σάμος, Χίος, Μυτιλήνη) και τα αποτελέσματα της αλληλούχισης οδήγησε στην κατηγοριοποίηση των δειγμάτων που μελετήθηκαν σύμφωνα με τους απλοτύπους που είχαν προταθεί από τους Mamuris *et al.* 2010. Έτσι, τα δείγματα της αγγλίας και της Νέας Ζηλανδίας, της Μυτιλήνης και της Σάμου εμφάνισαν ευρωπαϊκό απλότυπο, ενώ τα δείγματα της Κύπρου και της Χίου εμφάνισαν το ανατολικό προφίλ. Οι παρεκκλίσεις σχετικά με τα δείγματα της Μυτιλήνης και της Σάμου εξηγούνται με βάση τις επιτηδευμένες ανθρώπινες μετακινήσεις των πληθυσμών ευρωπαϊκών λαγών σ' αυτά τα νησιά, δεδομένου ότι δεν υπήρξε ποτέ χερσαία γέφυρα που να ευνοούσε την μετακίνηση και ότι τα είδη δεν έχουν την ικανότητα να κολυμπήσουν. Επίσης όπως έχει αναφερθεί, έχουν γίνει μαζικές εισαγωγές πληθυσμών ευρωπαϊκού λαγού στη Νέα Ζηλανδία (Lincoln, 1974, Caillol & Meunier, 1989, Bonino & Montenegro, 1997).

4.5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Με τη χρήση γονιδιωματικών προσεγγίσεων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μια πληρέστερη μελέτη της προσαρμοστικής παραλλαγής στους υβριδικούς πληθυσμούς καθώς και στους πληθυσμούς με διαφορές μεταξύ μιτοχονδριακού και πυρηνικού υποβάθρου (π.χ. Μυτιλήνη). Η γονιδιωματική προσέγγιση θα δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη σύνθεση των πληθυσμών σχετικά με την τρέχουσα κατάσταση τους και θα μπορούσε να δώσει ορισμένα συμπεράσματα για τον πληθυσμό και την ιστορία του είδους. Έτσι, θα διαμορφωθεί η δυναμική που θα χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές προσεγγίσεις για τη διατήρηση και διαχείριση των τοπικών πληθυσμών, καθώς οι εργασίες ανανέωσης είναι μια κοινή πρακτική που χρησιμοποιείται παγκοσμίως για το είδος, ειδικά για κηνυγετικούς σκοπούς. Επίσης, η γονιδιωματική προσέγγιση θα μπορούσε να αποκαλύψει τα επίπεδα γενετικής ανάμειξης των γενεαλογιών σε πυρηνικό επίπεδο, έτσι ώστε να μπορέσουν να ανιχνευτούν ασυμβατότητες μεταξύ των συνεργαζόμενων γονιδίων των δύο τύπων γονιδιωμάτων με ανίχνευση ασυνήθιστων αλληλομορφικών συνδυασμών (Giannoulis *et al.* 2018, in press).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aaji C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972; 269:192–200.

Arun J. Nataraj, Isabelle Olivos-Glander, Noriko Kusakawa, W. Edward Highsmith, Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. 1999; (20): 1177-1185

Avise JC. Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A & Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18: 489 – 522

Avise, J. C. (1986) Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B312*: 325-42.

Awadalla, P., Eyre-Walker, A., Maynard Smith, J. (1999) Linkage Disequilibrium and Recombination in Hominid Mitochondrial DNA. *Science.* 286 (5449): 2524–2525.

Baker AJ, Jenkins PF. Founder effect and cultural evolution of songs in an isolated population of chaffinches, *Fringilla coelebs*, in the Chatham islands. *Animal Behaviour.* 1987; 35(6):1793-1803

Bansfield, A. 1974. *Mammals of Canada*. Toronto: University of Toronto Press.

Barton NH, Hewitt GM. Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature.* 1989; 341:497-503

Ben Slimen, H., Suchentrunk, F., Stamatis, C., Mamuris, Z., Sert, H., Alves, P.C., Kryger, U., Shahin, A.B., Ben Ammar Elgaaied, A., (2008) Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): a test of Petter's hypothesis of conspecificity. *Biochem. Syst. Ecol.* 36: 22–39.

Bilgin R. Back to the suture: The Distribution of Intraspecific Genetic Diversity in and Around Anatolia. *Int J Mol Sci.*2011; 12:4080-4103

Bininda-Emonds, O. R. P. (2000) Factors influencing phylogenetic inference: A case study using the mammalian carnivores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(1): 113-126

Bonino, N., Montenegro, A. (1997) Reproduction of the European hare in Pantagonia, Argentina. *Acta Theriologica*, 42(1): 47-54.

Bray, Y.; Devillard, S.; Marboutin, E.; Mauvy, B.; Péroux, R. (2007). "Natal dispersal of European hare in France" (PDF). *Journal of Zoology*. 273 (4): 426–434.

Broekhuizen, S., Maaskamp, F. (1980) Behaviour of does and leverets of the European hare (*Lepus europaeus*) whilst nursing. *J. Zool. Lond.* 191: 487-501.

Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J MolEvol* 18: 225-239.

Burton RS, Ellison CK, Harrison JS. The Sorry State of F2 Hybrids: Consequences of Rapid Mitochondrial DNA Evolution in Allopatric Populations. *The American Naturalist.*2006; 168:14-24

Caillol, M., Meunier, M., Mondain-Monval, M., Simon, P. (1988) Seasonal variations in testis size, testosterone and LH basal levels, and pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Can. J. Zool.*, 67: 1626-1630.

Colinvaux, P. A. An arid Amazon? *Trends in Ecology and Evolution* 12, 318–319 (1997).

Cruickshank R (2002) Molecular markers for the phylogenetic of mites and ticks. *Sys App Acarol* 7: 3-14.

Currat, M. and Excoffier, L. (2004) Modern humans did not admix with Neanderthals during their range expansion into Europe. *PLoS Biol.* 2, e421

Curat, M. et al. (2008) The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 62, 1908–1920

Daniel I. Bolnick and Patrik Nosil. NATURAL SELECTION IN POPULATIONS SUBJECT TO A MIGRATION LOAD. *Evolution* 61(9):2229-2243. 2007

Dubey S, Zaitsev M, Cosson JF, Abdukadier A, Vogel P. Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Mol Phylogen Evol.*2006; 38(3):635-647

Emerson BC. Evolution of oceanic islands: Molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Mol Ecol.*2002;11(6):951-66

Fanourakhs N, Pavlikaki H and Navarro C.P, 2004. Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. *Euphytica Plant breeding.* 136: 143- 147

Fernandez-Garcia JL, Carranza J, Martinez JG, Randi E. Mitochondrial D-loop phylogeny signals two native Iberian red deer (*Cervus elaphus*) Lineages genetically different to Western and Eastern European red deer and infers human-mediated translocations. *Biodivers Conserv.*2014; 23:537-554

Flux, J.E.C. (1983) Introduction to taxonomic problems in hares. *Acta Zoologica Fennica*, 174: 7–10.

Frankham, Richard; Briscoe, David A.; Ballou, Jonathan D. (2002-03-14). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

Futuyma, D. J. *Science* 219, 1059–1060 (1983).

Garrigan, D., Hammer, M.F., (2006) Reconstructing human origins in the genomic era. *Nat. Rev. Genet.* 7 (9): 669–80.

Geoffrey, R., Hosey, B., (1982) The Bosphorus land-bridge and mammal distributions in Asia Minor and the Balkans. *Saugetierkd. Mitt.*30: 53–62.

Godfrey Hewitt. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages , *Nature.* (405), 907–913

Goerge EF, Pechman CR, Woese CR (1977) Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to prokaryotic systematics. *Int J SystBacteriol* 27: 44-57.

Graves, J.A.M. (2006) Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell*, 124: 901–914.

Gubbay, J., Collington, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., (1990) A gene mapping to the sex- determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346: 245–250.

Hall, E., K. Kelson. 1959. *Mammals of North America*. New York: The Ronald Press Company

Hamilton, W., J. Whitaker. 1943. *Mammals of the Eastern United States*. 2nd ed. Ithica, NY: Cornell University Press.

Hayashi, K., & Yandell, DW (1993). How sensitive is PCR-SSCP; *Human Mutation*, 2, 338-346.

Hellborg, L., Ellegren, H., (2004) Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 158–163.

Hewitt GM. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc Lond B*.2004; 359:183-195

Hewitt GM. Hybriz Zones – Natural Laboratories for Evolutionary Studies.*TREE*.1988;3(7):158-167

Hewitt GM. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*.2000;405:907-913

Hillis D.M., Wiens J.J. (2000). Molecular versus morphological systematics: Conflicts, artifacts, and misconceptions. In Wiens, JJ (ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., pp. 1–19.

Holly, T. (2001). "Mad World of the European Hare". In MacDonald, D. *The New Encyclopedia of Mammals*. Oxford: Oxford University Press. pp. 710–711.

Hu J., van Eysden J. & Quiros C.F, 1995. Generation of DNA- based markers in specific genome regions by two- primer RAPD reactions. Cold Spring Harbor, Vol 4, p: 346-351

J. Felsenstein Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading Syst. Zool., 27 (1978), pp. 401-410

Kakavas V. Konstantinos, Plageras Panagiotis, Vlachos T. Antonios, Papaioannou Agelos, Noulas V. Argiris. PCR–SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases. 2008 ; (38): 155–163

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 Phylogenetic Evolution*, 34: 55-66.

Kirkpatrick FH. Overview of agarose gel properties. *Electrophoresis of large DNA molecules: theory and applications*. 1991. pp. 9–22.

Kurta, Allen (1995). *Mammals of the Great Lakes Region*. University of Michigan Press. p. 104

Lincoln, G. (1974) Reproduction and March madness in the Brown hare, *Lepus europaeus*. *J. Zool. Lond.* 174: 1-14.

Lincoln, G. (1974). "Reproduction and March madness in the brown hare, *Lepus europaeus*". *Journal of Zoology*. 174 (1): 1–14.

Mamuris Z., Moutou K.A., Stamatis C., Sarafidou T., Suchentrunk F. (2010). Y DNA and Mitochondrial lineages in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Mammalian Biology* 75: 233-242.

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

Mamuris, Z., Sfougaris, A.I., 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: 323-38.

Naughton, D. (2012). *The Natural History of Canadian Mammals*. University of Toronto Press. pp. 235–238.

Orth A, Auffray AJ, Bonhomme F. Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse *Mus macedonicus* reveal multiple glacial refuges south of Caucasus. *Heredity*.2002; 89:353-357

Patwardhan A, Ray S, Roy A (2014) Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *J Phylogen Evolution Biol* 2:131. doi: 10.4172/2329-9002-2-131

Payseur BA. Using differential introgression in hybrid zones to identify genomic regions involved in speciation. *Molecular Ecology Resources*.2010; 10(5):806-820

Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, Yong Hoon Kim. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. 2012; (62): 3923.

Peterson, R. 1966. *The Mammals of Eastern Canada*. Oxford University Press.

Petit R, Excoffier L. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*.2009; 24(7):386-393

Pielowski, Z. (1976) The role of foxes in the reduction of the European hare population. In *Ecology and Management of European Hare Populations* (eds Z. Pielowski & Z. Pucek), pp. 135–148. Polish Hunting Association, Warsaw, Poland.

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.

Poli, A., Nigro, M., Gallazi, D., Sironi, G., Lavazza, A. (1991) Acute hepatitis in the european brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(4): 621-629

Putze, M., Nurnberg, S., Fickel, J. (2007) Y-chromosomal markers for the European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). *European Journal of Wildlife Research*, 53: 257–264

Rémy J. Petit, Laurent Excoffier (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution – ScienceDirect*. (24):7, 386-393

Rohling, R. J. et al. Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature* 394, 162–165 (1998).

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. 3rd 2001.

Sert, H., Suchentrunk, F., Erdogan, A. (2005) Genetic diversity in brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from Anatolia and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammalian Biology* 70:171–186.

Sfenthourakis S, Triantis AK. The Aegean archipelago: a natural laboratory of evolution, ecology and civilisations. *J of Biol Res-Thessaloniki*.2017;24(4):1-13

Simon, C., Buckley, T.R., Frati, F., Stewart, J.B., Beckenbach, A.T. (2006) Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 545–579.

Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346: 240-244

Smith S, Turbill C, Suchentrunk F. Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular ecology*.2010; 19(1):36-43

Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou AK, Giacometti M, Haerer G, Djan M, Vapa L, Vukovic M, Tvrtkovic N, Sert H, Alves PC, Mamuris Z. Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia?. *J Biogeogr*.2009; 36:515-528

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(4): 548-551.

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., Mamuris, Z., Sfougaris, A. I. and Stamatis, C. (2003) Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *Biochem. Genet.* 41: 127–140.

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*.1998; 7(4):453-464

Ulf Dieckmann & Michael Doebeli. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400, 354–357 (1999)

Vaha, J-P. and Primmer, C.R. (2006) Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Mol. Ecol.* 15, 63–72

van Andel TH, Shackleton JC. Late Paleolithic and Mesolithic Coastlines of Greece and the Aegean. *Journal of Field Archaeology*.1982;9:445-454

Wayne KT, Lehman N. Mitochondrial DNA variability of the Gray Wolf: Genetic consequences of Population Decline and Habitat Fragmentation. *Conservation Biology*.1992; 6(4):559-569

Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271.

Wolf JBW, Ellegren H. Making sense of genomic islands of differentiation in light of speciation. *Nature Reviews Genetics*.2017; 18:87-100

Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Fenton B, Tuovinen T (2000) Species and strain identification of the predatory mite *Euseiusfinlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. *ExpApplAcarol* 24: 863-880.

Zurawski G, Clegg MT (1987) Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: Implications for structure– function and phylogenetic studies. *Annu Rev Plant Physiol* 38: 391–418.