

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή διατριβή

Συγκριτική ανάλυση της πληθυσμιακής δομής του είδους  
*Lepus europaicus* στην βορειοανατολική Ελλάδα

ΧΑΤΖΗΒΑΓΙΑ ΕΛΕΝΗ



ΛΑΡΙΣΑ, 2017

**Συγκριτική ανάλυση της πληθυσμιακής δομής του είδους  
*Lepus europaeus* στην βορειοανατολική Ελλάδα**

---

**Comparative analysis of population structure of the species  
*Lepus europaeus* in northeastern Greece**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:	<b>ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>  Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ	Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν δείγματα ευρωπαϊκού λαγού (*L. europaeus*) και αναλύθηκαν όσων αφορά στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδίου Cytb, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση μέρους του συμπλέγματος III της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από τα δείγματα και ενισχύθηκαν με PCR. Στη συνέχεια με τεχνική RFLP και τη χρώση τη χρώση πηκτών ακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο, προέκυψε η ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση προηγούμενες μελέτες. Τα δείγματα προέρχονταν από πληθυσμούς λαγών στην περιοχή της Θράκης, η οποία είναι μέρος της υβριδικής ζώνης. Πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση των δειγμάτων με βάση τις ήδη υπάρχουσες ομαδοποιήσεις και προέκυψε ένα νέο πρότυπο, το οποίο οφείλονταν σε μετάλλαξη στη θέση κοπής.

## ABSTRACT

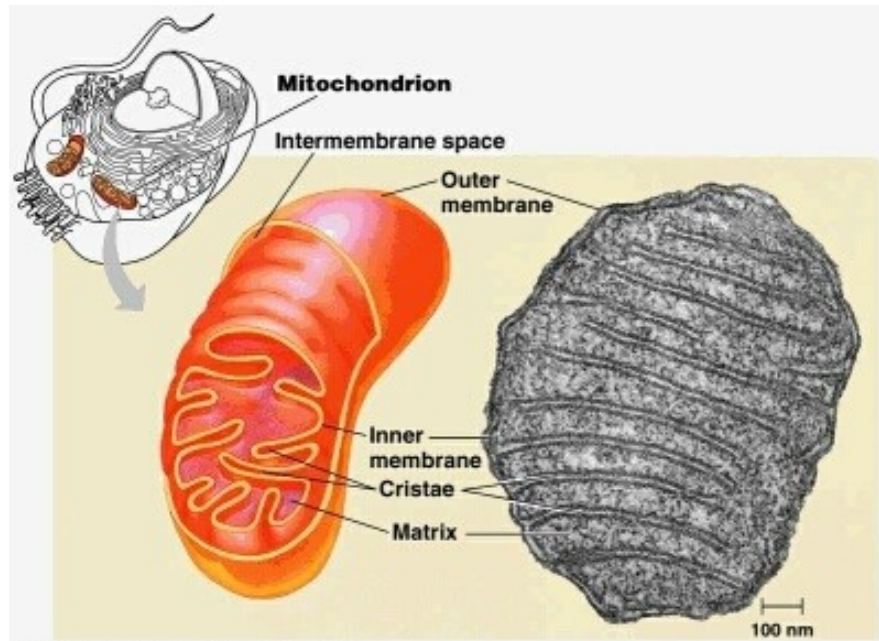
In this study, samples of European hare (*L. europaeus*) were examined and analyzed for the nucleotide sequence of the Cytb mitochondrial gene, which is responsible for the synthesis of part of oxidative phosphorylation complex III. DNA isolation was performed at samples and PCR technique amplified. Then, RFLP technique and staining of acrylamide gel with silver nitrate resulted in the grouping of samples based on previous studies. The samples were from hare populations of Thrace region, which is part of the hybrid zone. Samples were sorted based on existing clades and a new standard resulted, due to a mutation at the cutting position.

## Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
Μιτοχόνδριο.....	6
Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	8
Μηχανισμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.....	9
Μιτοχονδριακό DNA.....	12
Ροή πληροφοριών- Μεταγραφή και Μετάφραση.....	13
Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA.....	14
Μιτοχονδριακα γονιδια και φυλογενεση.....	15
Ευρωπαϊκός λαγός ( <i>Lepus europaeus</i> ).....	17
Αντικείμενο μελέτης.....	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
Απομόνωση DNA.....	19
Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα.....	20
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	20
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης.....	22
RFLP.....	23
Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.....	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	27
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	36

### ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

Τα μιτοχόνδρια υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και είναι ευδιάκριτα οργανίδια του κυτταροπλάσματος. Είναι τα οργανίδια στα οποία συντίθεται το μεγαλύτερο μέρος της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) ενός κυττάρου. Στα μιτοχόνδρια λαμβάνουν χώρα πολλές σημαντικές διαδικασίες για το κύτταρο, όπως ο κύκλος του Krebs και η οξειδωτική φωσφορυλίωση.



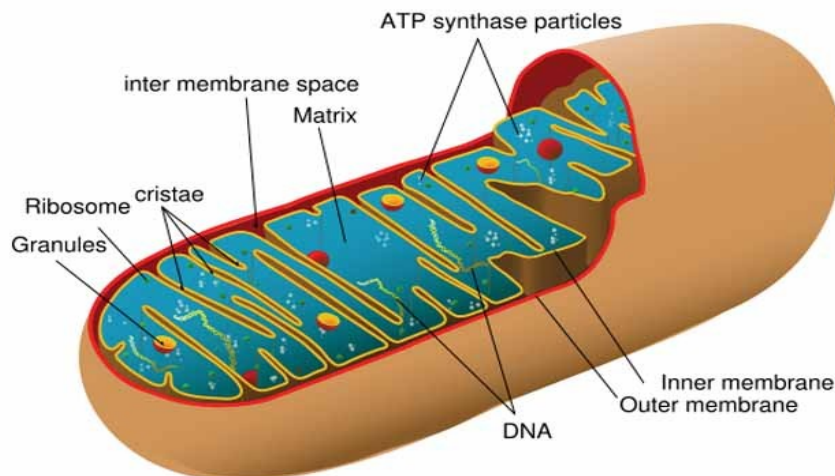
Εικόνα 1 Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια, ανακαλύφθηκαν ως συστατικά του κυττάρου το 1886 από τον Altmann. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, η διερεύνησή τους περιορίστηκε για αρκετά χρόνια. Το 1898 ο Benda εισάγει τον όρο «μιτοχόνδριο», το 1904 ο Meves περιγράφει το μιτοχόνδριο στα φυτικά κύτταρα και το 1934 οι Bensley και Hoerr απομονώνουν τα οργανίδια με υπερφυγοκέντρηση. Η λεπτομερειακή δομή, όμως, έγινε γνωστή αρκετά χρόνια αργότερα και επέτρεψε την κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών και τη συσχέτιση δομής και λειτουργίας του σημαντικότερου κυτταρικού οργανιδίου, χάρη στις πρωτοποριακές έρευνες των G. Palade, K.R. Porter, F. Sjostrand και άλλων.

Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε κύτταρα διαφορετικού είδους ποικίλει και διαφέρει ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κάθε κυττάρου. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν δικό τους DNA και RNA, πλήρες σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης και ριβοσώματα. Έχουν τη δυνατότητα λοιπόν να συνθέτουν ορισμένες από τις πρωτεΐνες τους. Το σχήμα τους δεν είναι σταθερό (συνήθως είναι επίμηκες) και οι

διαστάσεις τους είναι 0,3-1μm σε διάμετρο με 1-10μm σε μήκος (Εικόνα 1). Περιέχουν 66% νερό, 22% πρωτεΐνες, 11% λιπίδια και 1% νουκλεοτίδια και ιόντα.

Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, η μία γύρω από την άλλη, που έχουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο. (Εικόνα 2) Ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται στρώμα (matrix) και ο χώρος ανάμεσα στις δύο μεμβράνες ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος (intermembrane space). Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει μόρια πορίνης η οποία σχηματίζει υδρόφιλους διαύλους διαμέσου της διπλοστοιβάδας των λιπιδίων. Η εσωτερική μεμβράνη όμως, όπως και οι άλλες μεμβράνες του κυττάρου, είναι αδιαπέραστη από ιόντα και τα περισσότερα μικρά μόρια. Επομένως το μιτοχονδριακό στρώμα περιέχει εξειδικευμένο περιεχόμενο, μόνο ότι μπορεί να διαπεράσει μέσω κατάλληλων διαύλων που δημιουργούνται από τις μεταφορικές πρωτεΐνες της μεμβράνης. Η εσωτερική υποχονδριακή μεμβράνη είναι ο τόπος που επιτελείται η μεταφορά των ηλεκτρονίων και η άντληση πρωτονίων και περιέχει τη συνθάση του ATP. Είναι ιδιαίτερα πτυχωμένη μεμβράνη και ο ρυθμός των πτυχώσεων αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.



**Εικόνα 2 Δομή μιτοχονδρίου**

Τα μιτοχόνδρια είναι οι γεννήτριες παραγωγής χημικής ενέργειας για τις ανάγκες του κυττάρου. Αξιοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται από την

οξειδωση μορίων της τροφής, όπως τα σάκχαρα, προκειμένου να παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), το βασικό χημικό καύσιμο που συντηρεί τις περισσότερες δραστηριότητες του κυττάρου. Επειδή κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης δραστηριότητας το μιτοχόνδριο καταναλώνει οξυγόνο και απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα, η όλη διεργασία αποκαλείται κυτταρική αναπνοή. Στα μιτοχόνδρια η ενέργεια από τον μεταβολισμό των σακχάρων αξιοποιείται αποτελεσματικά. Ανά μόριο γλυκόζης που οξειδώνεται παράγονται περίπου 30 μόρια ATP, ενώ κατά την γλυκόλυση ανά μόριο γλυκόζης παράγονται 2 ATP.

### **ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΥΛΙΩΣΗ**

Οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διεργασία στην οποία παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub> δια μέσου μίας σειράς φορέων ηλεκτρονίων. Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και αποτελεί την κυριότερη πηγή ATP σε αερόβιους οργανισμούς. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος είναι περίπου 30 μόρια ATP δεδομένης της ενεργειακής απώλειας για τη μεταφορά των μορίων ATP από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα (Alberts et al. 2006). Συγκεκριμένα τα 26 από τα 30 μόρια ATP που παράγοντα κατά την οξείδωση της γλυκόζης σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O, προκύπτουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

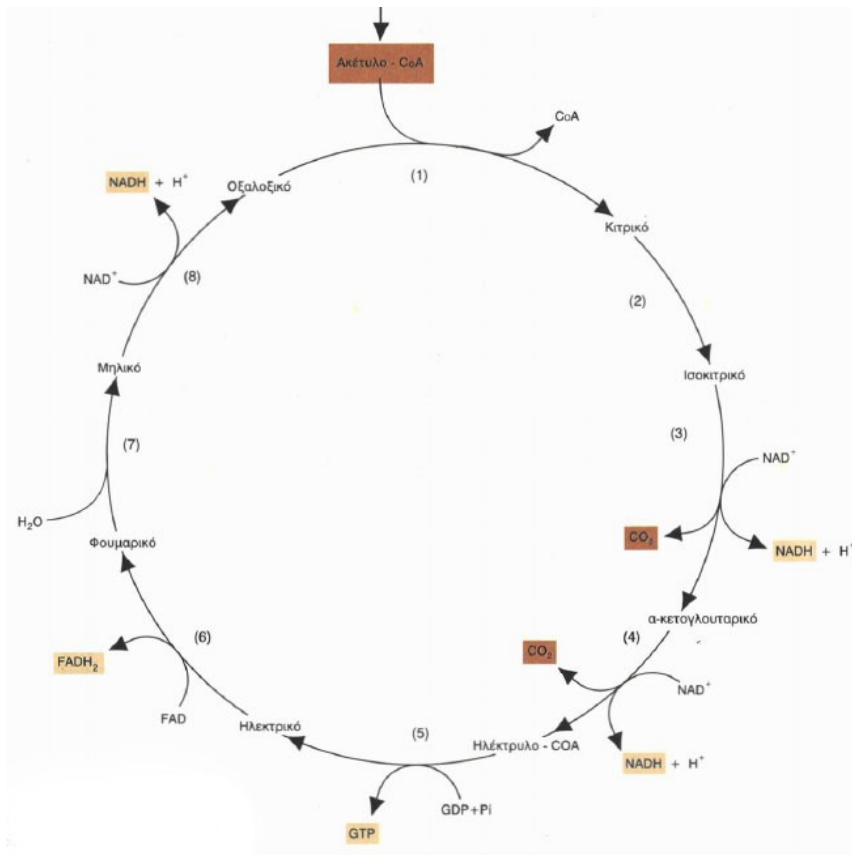
Τη δεκαετία του 1950 πολλοί ερευνητές πίστευαν ότι η οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγει ATP περίπου όπως η γλυκόλυση. Κατά τη γλυκόλυση, η φωσφορυλίωση του ATP γίνεται άμεσα από ένα ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας. Την ίδια εποχή ήταν διαδεδομένη υπόθεση ότι η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων παρήγαγε ένα ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας, το οποίο θα πρόσδενε κατευθείαν τη φωσφορική ομάδα στο ATP, όμως ένα τέτοιο ενδιάμεσο δεν ανακαλύφθηκε. Το 1961 ο Peter Mitchell διατύπωσε για πρώτη φορά ότι αυτό το «ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας» ήταν η ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων. Σύμφωνα με το μοντέλο του, που ονομάστηκε χημειοσμωτική υπόθεση, η ενέργεια βαθμίδωσης H<sup>+</sup> που σχηματίζονται κατά τη δίοδο των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα αξιοποιείται για να προωθήσει τη σύνθεση ATP. Αυτή η υπόθεση σημαίνει ότι η ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων είναι απαραίτητη για τη σύνθεση ATP και έτσι η δημιουργία μίας τεχνητής βαθμίδωσης θα έπρεπε να διεγείρει την παραγωγή ATP. Αλλά παράμενε το ερώτημα πώς η βαθμίδωση ηλεκτρονίων προωθεί τη σύνθεση του ATP. Το 1974 ο Efraim Racker και ο Walther Stoeckenius απέδειξαν ότι ο συνδυασμός της συνθάσης του ATP με μια βαθμίδωση πρωτονίων οδηγεί σε παραγωγή ATP. Οι δύο επιστήμονες διαπίστωσαν ότι μπορούσαν ν' ανασυνθέσουν ένα πλήρες τεχνητό σύστημα παραγωγής ενέργειας συνδυάζοντας μια ATPάση από μιτοχόνδρια της καρδιάς του βοδιού με την ιώδη μεμβράνη του *Halobacterium*



*halobium*. Η κυτταρική μεμβράνη αυτού του βακτηρίου είναι γεμάτη βακτηριοδοψίνη, μια πρωτεΐνη που αντλεί πρωτόνια προς το εξωτερικό του κυττάρου μετά από έκθεση στο ηλιακό φως. Τοποθετώντας τη βακτηριοδοψίνη σε τεχνητά λιποκυτίδια, οι Racker και StoECKENIUS έδειξαν ότι μετά από έκθεση στο φως η πρωτεΐνη αντλούσε πρωτόνια στο εσωτερικό των κυστιδίων. Στη συνέχεια, στα ίδια κυτίδια ενσωματώθηκε μια ΑΤΡάση μιτοχονδριακής προέλευσης. Μετά από έκθεση στο φως, το πειραματικό σύστημα κατέλυε τη σύνθεση ΑΤΡ. Η αφαίρεση της βακτηριοδοψίνης όπως και η προσθήκη παραγόντων αποσύζευξης καταργούσε τη σύνθεση ΑΤΡ. Έτσι, παρόλο που η υπόθεση του Mitchell συνάντησε αρχικά αντίσταση, οι πειραματικές ενδείξεις που την στήριζαν δεν μπορούσαν να αγνοηθούν. Το 1978, ο Mitchell έλαβε το βραβείο Νόμπελ Χημείας.

### **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ**

Κατά τη γλυκολυτική πορεία η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Κάτω από αερόβιες συνθήκες το επόμενο βήμα στην πορεία της πλήρους διάσπασης της γλυκόζης είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-συνένζυμο Α (ακετυλο-CoA). Αυτή η ενεργοποιημένη ακετυλο-ομάδα οξειδώνεται πλήρως σε CO<sub>2</sub> μέσω μίας σειράς αντιδράσεων, που είναι γνωστή με το όνομα κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs (Εικόνα 3). Εκτός από τα τελικά προϊόντα της διάσπασης των υδατανθράκων (πυροσταφυλικό) και τα προϊόντα του μεταβολισμού των λιπών και των αμινοξέων οξειδώνονται, στον κύκλο του κιτρικού οξέος, σε CO<sub>2</sub>. Έτσι, ο κιτρικός κύκλος είναι ο κοινός τελικός δρόμος για την αποικοδόμηση όλων των θρεπτικών ουσιών.



**Εικόνα 3 Κύκλος του κιτρικού οξέος**

Τα τελικά προϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού είναι, όπως ξέρουμε,  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$ . Το  $\text{H}_2\text{O}$  παράγεται στην αναπνευστική αλυσίδα από φορτωμένα με υδρογόνο συνένζυμα  $\text{NADH}$  και  $\text{FADH}_2$ , τα οποία επανοξειδώνονται παρέχοντας μέρος της ενέργειας που περιέχουν για τη σύνθεση του  $\text{ATP}$ .

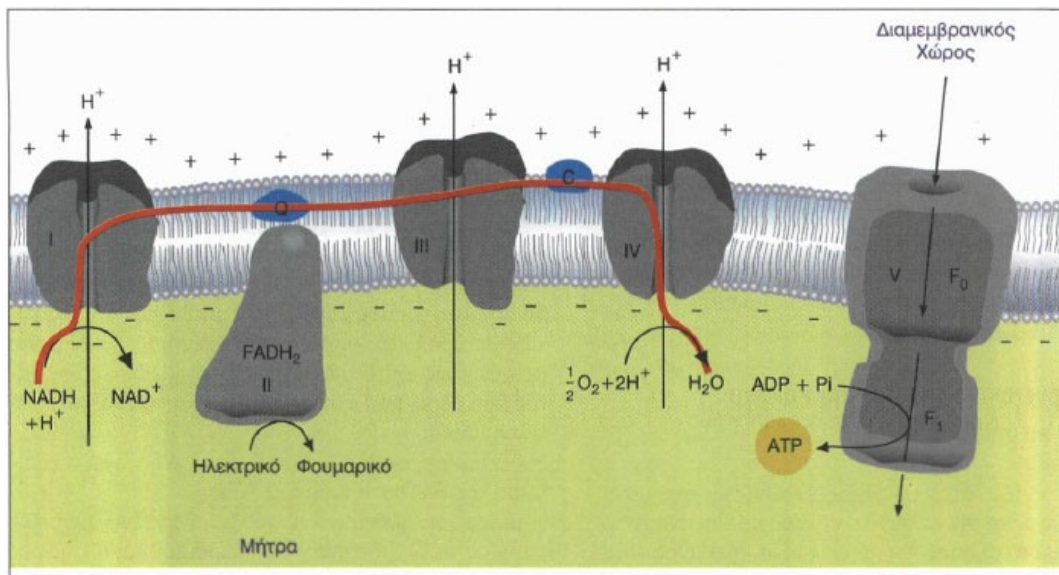
Η σημασία του κύκλου του κιτρικού οξέος δεν εξαντλείται με την παραγωγή  $\text{CO}_2$  και τη δημιουργία ανηγμένων συνενζύμων, τα οποία τροφοδοτούν την αναπνευστική αλυσίδα για την παραγωγή ενέργειας. Οι μεταβολίτες του κιτρικού κύκλου αποτελούν συγχρόνως μία μεγάλη δεξαμενή ενδιάμεσων προϊόντων, τα οποία χρησιμεύουν για τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού, όπως αμινοξέα, αίμη της αιμοσφαιρίνης κ.ά. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος πραγματοποιούνται μέσα στα μιτοχόνδρια, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις της γλυκόλυσης, οι οποίες επιτελούνται στο κυτταρόπλασμα.

Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το  $\text{NADH}$  ή το  $\text{FADH}_2$  στο  $\text{O}_2$  μέσω μίας αλυσίδας τεσσάρων μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλοκών, τα οποία βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Συμβαίνει μέσω ενός αριθμού αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων, που

διεκπεραιώνονται από ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωστών ως αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

- Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I)
- Αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q (σύμπλοκο II)
- Οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III)
- Οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV)

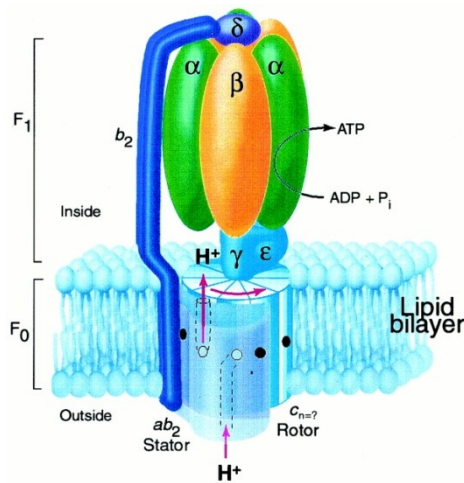
Οι ομάδες που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στα σύμπλοκα αυτά είναι φλαβίνες, σύμπλοκα σιδήρου - θείου, κινόνες, μόρια αίμη και ιόντα χαλκού.



Εικόνα 4 Σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Η ουβικινόνη (Q) είναι μια υδρόφοβη κινόνη που διαχέεται γρήγορα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το κυτόχρωμα c, είναι μία μικρή διαλυτή πρωτεΐνη, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο III στο σύμπλοκο IV, το τελικό συστατικό στην αλυσίδα, και αυτό που καταλύει την αναγωγή του  $O_2$ . Το σύμπλοκο II σε αντίθεση με τα άλλα σύμπλοκα δεν αντλεί πρωτόνια.

Για την οξείδωση του NADH χρησιμοποιείται ο δρόμος των συμπλοκών I → III → IV →  $O_2$ , ενώ για την οξείδωση του  $FADH_2$  ο δρόμος II → III → IV →  $O_2$  (Εικόνα 4). Η φωσφορυλίωση του ATP γίνεται με τη μιτοχονδριακή συνθετάση του ATP (σύμπλοκο V). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από την καταλυτική μονάδα σύνθεσης του ATP (F1), η οποία βρίσκεται προς την πλευρά της μήτρας του μιτοχονδρίου, και από το αγωγό των πρωτονίων (Fo) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 Συνθετάση του ATP

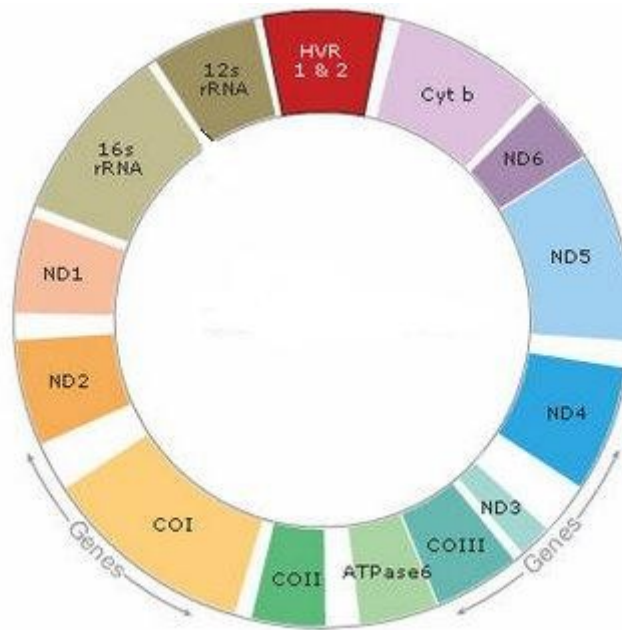
### ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA (mtDNA)

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια τα οποία συνυπάρχουν σε συμβιωτική σχέση με το κύτταρο. Αυτά τα οργανίδια περιέχουν το δικό τους μικρό κυκλικό γονιδίωμα, το οποίο κωδικεύει μία ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα ποικίλλουν ευρέως σε μέγεθος κατά μήκος της φυλογενετικής κλίμακας. Ποικίλουν σε μέγεθος από 6.000 ζεύγη βάσεων (μιτοχόνδρια του πρωτοζώου *Plasmodium falciparum*) μέχρι 300.000bp για τα μιτοχόνδρια μερικών φυτικών κυττάρων. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA αποτελείται από 16.569 bp, περιλαμβάνει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πολυπεπτίδια (υπομονάδες του συστήματος παραγωγής ενέργειας: επτά υπομονάδες NADH αφυδρογονάσης, τρεις υπομονάδες κυτοχρωμικής οξειδάσης, δύο υπομονάδες ATP-συνθετάσης και κυτόχρωμα b), δύο γονίδια rRNA και 22 γονίδια tRNA ως μέρος του μιτοχονδριακού συστήματος μετάφρασης (Εικόνα 6), τα οποία συνεργάζονται με 1500 γονίδια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα (nDNA). Και τα 37 γονίδια που βρίσκονται σε ένα σύνηθες μιτοχονδριακό DNA έχουν ομόλογα γονίδια στο mtDNA των φυτών, των μυκήτων και των πρωτίστων. Υπάρχει επίσης και μια μεγάλη μη κωδική περιοχή, η οποία είναι γνωστό ότι περιέχει στοιχεία ελέγχου για την αντιγραφή και τη μεταγραφή. (Krzywinski et al,2006).

Πολλά μιτοχονδριακά γενώματα είναι κυκλικά, δίκλινα, υπερελικωμένα μόρια DNA. Γραμμικά μιτοχονδριακά γονιδιώματα εντοπίζονται σε μερικά πρωτόζωα και σε μερικούς μύκητες (π.χ.Cubozoa, Scyphozoa και Hydrozoa). Σε πολλές περιπτώσεις, το περιεχόμενο του mtDNA σε GC διαφέρει αισθητά από το πυρηνικό και έτσι το μιτοχονδριακό DNA μπορεί να διαχωριστεί από το πυρηνικό με

φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας χλωριούχου καισίου. Το mtDNA δε συνδέεται με ιστόνες ή παρόμοιες πρωτεΐνες (Russell, 2006).

Τα προϊόντα των μιτοχονδριακών γονιδίων, μαζί με τα RNA και τις πρωτεΐνες που εισάγονται από το κυτταρόπλασμα, παρέχουν στο μιτοχόνδριο με το δικό του σύστημα αντιγραφής του DNA, της μεταγραφής και της μετάφρασης των πρωτεϊνών. Η μελέτη αυτών των γενωμάτων εξυπηρετεί ως μοντέλο για την γενωμική εξέλιξη. Η ύπαρξη πρωτεϊνοσύνθεσης στα μιτοχόνδρια αποκαλύφθηκε από τον Simpson και τους συνεργάτες του το 1955. Επιπλέον, η σύγκριση της οργάνωσης των μιτοχονδριακών γονιδίων έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα πολύτιμη για την εξαγωγή αρχαίων εξελικτικών σχέσεων, αφού φαίνεται ότι η διάταξη των γονιδίων σε απόμακρες ταξινομικά ομάδες είναι μοναδική και έτσι είναι σχεδόν αδύνατο να συμβεί αυτό το γεγονός με τον ίδιο τρόπο σε ανεξάρτητες εξελικτικά γενεαλογίες (Boore, 1999).



**Εικόνα 6 Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)**

## **ΡΟΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ- ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ**

Η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή διαφέρει από την κυτταροπλασματική και ο γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων διαφέρει από τον συνηθισμένο γενετικό κώδικα των πυρηνικών γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η

τριπλέτα UGA που είναι κωδικόνιο λήξης στο κυτταρόπλασμα, χρησιμεύει για κωδικοποίηση τρυπτοφάνης στα μιτοχόνδρια, οι τριπλέτες AGA και AGG, που στο κυτταρόπλασμα κωδικοποιούν την αργινίνη, στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών αποτελούν κωδικόνια λήξης, η τριπλέτα AUA που κωδικοποιεί για ισολευκίνη στο κυτταρόπλασμα, χρησιμοποιείται για την έναρξη της μετάφρασης και κωδικοποιεί για μεθειονίνη στα μιτοχόνδρια των ζωικών κυττάρων. Τα 22 μιτοχονδριακά tRNAs αναγνωρίζουν 4 διαφορετικούς κωδικόνια, που έχουν κοινά τα 2 πρώτα νουκλεοτίδια. Τέλος, η έναρξη της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά οργανίδια περιλαμβάνει το φορμυλ-μεθειονυλ-tRNA. (Εικόνα 7) (Μαργαρίτης,2008).

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } <b>UGA Trp</b> UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } <b>AUA Met</b> AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } <b>AGA Stop</b> <b>AGG Stop</b>	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Εικόνα 7 Μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας

## ΡΥΘΜΟΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

Τα γονιδιώματα των οργανιδίων αντιγράφονται και κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο απ' ό τι τα γονίδια του πυρήνα και ως εκ τούτου η δυναμική των αντικαταστάσεων τους είναι πολύ διαφορετική. Το μικρό μέγεθος του mtDNA και ο εξαιρετικά υψηλός ρυθμός αντικαταστάσεων των βάσεων του έχουν εγείρει μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την εξέλιξη του. Ο μέσος ρυθμός συνώνυμων αντικαταστάσεων στα μιτοχονδριακά γονίδια των θηλαστικών είναι περίπου  $5,7 \times 10^{-8}$  ανά θέση ανά έτος, είναι δηλαδή περίπου δεκαπλάσιος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων μεταλλάξεων των γονιδίων του πυρήνα. Ο ρυθμός μη συνώνυμων αντικαταστάσεων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γονιδίων του μιτοχονδρίου αλλά

σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικά υψηλότερος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων αντικαταστάσεων που παρατηρείται στα πυρηνικά γονίδια. Αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την χαμηλότερη αξιοπιστία του μηχανισμού αντιγραφής DNA και επομένως με υψηλότερο ρυθμό εισαγωγής σφαλμάτων κατά την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του mtDNA. Σε αντίθεση με τις πολυμεράσες DNA του πυρήνα, οι DNA πολυμεράσες του μιτοχονδρίου δεν έχουν ικανότητα διορθωτικού ελέγχου. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλαξιόνων, όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες προκύπτουν από μεταβολικές διεργασίες που διεξάγονται στα μιτοχόνδρια, μπορεί επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο στους υψηλότερους ρυθμούς αντικαταστάσεων. Επιπλέον, μπορεί η πίεση της φυσικής επιλογής που φυσιολογικά εξαλείφει πολλές μεταλλαγές στα γονίδια του πυρήνα να είναι λιγότερο έντονη στα μιτοχόνδρια, επειδή τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν πολλές δεκάδες μιτοχόνδρια καθένα από τα οποία περιέχει μέχρι και δώδεκα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Τέλος, οι μεταλλαγές στις πρωτεΐνες, στα tRNA και στα rRNA που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα φαίνεται να μην επηρεάζουν τόσο αρνητικά την προσαρμοστικότητα του ατόμου όσο οι αντίστοιχες μεταλλαγές στα προϊόντα των πυρηνικών γονιδίων.

Παρότι είναι γνωστό ότι οι μιτοχονδριακές αλληλουχίες των ζώων εξελίσσονται ταχύτατα, η οργάνωση των γονιδίων φαίνεται να είναι अपαράλλακτη για μεγάλες χρονικές περιόδους της εξελικτικής ιστορίας. Με μερικές εξαιρέσεις, η οργάνωση των γονιδίων είναι σχετικά σταθερή μέσα στις κύριες ομάδες, αλλά διαφέρει μεταξύ αυτών, και η σύγκριση αυτής της οργάνωσης έχει μεγάλες δυνατότητες για την επίλυση προβλημάτων που αφορούν στους βαθύτερους κλάδους της φυλογένειας των μεταζώων. Ο μεγάλος αριθμός των πιθανών γονιδιακών διατάξεων καθιστά αδύνατο σχεδόν το να αποκτούν διαφορετικά taxa το ίδιο μοντέλο οργάνωσης. Η σύγκριση της οργάνωσης των μιτοχονδριακών γονιδίων παρείχε πειστικές φυλογένειες σε αρκετές περιπτώσεις όπου τα υπόλοιπα δεδομένα ήταν αμφίβολα, όπως έγινε με τις περιπτώσεις των μεγάλων ομάδων των εχινόδερμων και των αρθροπόδων.

## **ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ**

Η μελέτη των αλληλουχιών του μιτοχονδριακού DNA έχει καταστεί μια μέθοδος που επιλέγεται συχνά για την μελέτη ταξινομικών, πληθυσμιακών και εξελικτικών μελετών στα ζώα. Πολλές ιδιότητες της δομής και της εξέλιξης του mtDNA το έχουν κάνει πολύτιμο εξελικτικό εργαλείο. Μερικές από αυτές είναι η ευκολία της απομόνωσής του, ο υψηλός αριθμός των αντιγράφων του, η έλλειψη ανασυνδυασμού, η συντήρηση της αλληλουχίας και της δομής στα μετάζωα, και οι διαφορετικοί ρυθμοί εξέλιξης σε διαφορετικά τμήματα του μορίου (Jeong et al, 2009).

Οι μιτοχονδριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της φυλογεωγραφίας των ειδών που πρόεκυψε μετά το λιώσιμο των πάγων, που ακλούθησε την τελευταία παγετωνική περίοδο. Κατά την παγετωνική περίοδο, τα είδη από το βορρά μετακινήθηκαν σε καταφύγια στο νότο που εντοπίζονταν στην Ιβηρική χερσόνησο, την Ιταλία, την Ελλάδα, τα Βαλκάνια και την Ανατολή. Οι πληθυσμοί διαφοροποιήθηκαν γενετικά σε αναπαραγωγική και γεωγραφική απομόνωση και μετά το λιώσιμο των πάγων και τη μετακίνηση τους βορειότερα, δημιούργησαν νέα πρότυπα φυλογεωγραφικής ποικιλότητας και υβριδικές ζώνες όπου συναντώνται τα διαφοροποιημένα γονιδιώματα. Στο παράδειγμα της Ευρώπης, ο βόρειος πληθυσμός μετανάστευσε στο Νότο, όπου σχηματίστηκαν ορισμένες και ξεχωριστές καταφύγια για το είδος (Hewitt, 1989).

Πιστεύεται ότι οι πληθυσμοί που διατηρήθηκαν σε αυτές τις ξεχωριστές περιοχές ήταν απομονωμένοι, με αποτέλεσμα τη γενετική διαφοροποίηση τους λόγω τοπικής προσαρμογής. Η επακόλουθη μετα-παγετωνική επέκταση των πληθυσμών οδήγησε στον σχηματισμό των υβριδικών ζωνών, όπου συναντήθηκαν διαφοροποιημένα γονιδιώματα, αλλά οι διαφορές τους ήταν υπεύθυνες για την υβριδική ανικανότητα που παρατηρείται (Hewitt, 2000).

Η γενετική διαφοροποίηση των γονιδιωμάτων μπορεί να είναι αποτέλεσμα επιλογής ή γενετικής παρέκκλισης. Παρά την υβριδοποίηση, οι ενδοειδικές γενεαλογίες που σχηματίστηκαν δεν αναμιγνύονται γεωγραφικά, πράγμα που θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της κλασικής υβριδικής ανικανότητας: Τα υβρίδια F1 είναι συνήθως γόνιμα και καλά προσαρμοσμένα, αλλά τα υβρίδια F2 τείνουν να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα αρμοστικότητας και προσαρμογής (Bilgin, 2011).

Πιστεύεται ότι οι υβριδικές ζώνες διατηρούνται με τη δράση δύο διαφορετικών διεργασιών: τυχαία μετακίνηση και επιλογή έναντι των υβριδίων. Η μειωμένη αρμοστικότητα των υβριδίων προκαλείται συνήθως από πολλά γονίδια με μικρή επίδραση, που χαρτογραφούνται σε όλο το γονιδίωμα και όχι από τη μεγάλη συμβολή μερικών γονιδίων. Έτσι, τα αλληλόμορφα που «διασχίζουν» τη ζώνη επιλέγονται αρνητικά: βρίσκονται σε λανθασμένο περιβάλλον ή συνδυάζονται με λανθασμένα αλληλόμορφα (Barton & Hewitt, 1989)..

Από τη φύση τους λοιπόν, οι υβριδικές ζώνες θεωρούνται ως "φυσικά εργαστήρια" για τη μελέτη ενεργών εξελικτικών δυνάμεων σε πληθυσμούς που κατοικούν σε αυτές τις περιοχές. Οι υβριδικοί πληθυσμοί σχηματίζονται σε περιοχές όπου συναντώνται δύο διαφορετικά γονιδιώματα και υβριδοποιούνται.

Αυτοί οι παράπλευροι πληθυσμοί και οι υβριδικές ζώνες μπορεί να αντανakλούν τα διαφορετικά στάδια που αντιστοιχούν στα επίπεδα κλιμάκωσης της διαφοροποίησης: από τους αποκλίνοντες πληθυσμούς μέχρι τα διαφορετικά είδη (Hewitt, 1989). Τέτοιες υβριδικές ζώνες έχουν χαρακτηριστεί καλά για μια ποικιλία



ειδών, όπως η ακρίδα, η σκαντζόχοιρος, η αρκούδα, η πτερυγιά, ο ποντικός και ο ευρωπαϊκός λαγός (Bilgin, 2011).

Ενά πολύ καλό παράδειγμα για τη μελέτη των μηχανισμών που περιγράφηκαν παραπάνω είναι ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*). Συγκεκριμένα οι πληθυσμοί του ευρωπαϊκού λαγού κατά τις παγετώνικές περιόδους είχαν περιοριστεί στα καταφύγια του Νότου και εξαπλώθηκαν με το λιώσιμο των πάγων βορειότερα. Η διαδικασία αποικισμού, με τον τρόπο που συνέβη, περιγράφεται αρκετά καλά με τη φράση: "Southern richness to northern purity", που αντικατοπτρίζει τη μικρότερη γενετική ποικιλία στη Βόρεια Ευρώπη όσον αφορά είδη, υποείδη και αλληλομορφική ποικιλία (Hewitt, 2000). Με βάση φυλογενετικά δεδομένα του mtDNA και σε συνδυασμό με την ανάλυση του γονιδίου Cytb, προκύπτει η ύπαρξη τριών διαφορετικών απλοομάδων για το λαγό με πολύ καλά προσδιορισμένη κατανομή στην Ευρώπη και την Ανατολία. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε την κεντρική ευρωπαϊκή απλοομάδα (Γαλλία, Γερμανία, Ελβετία, Δανία, κλπ), τη νότια ευρωπαϊκή (Ελλάδα, Βουλγαρία) και την ανατολική (Τουρκία, Κύπρος, Ισραήλ), (Stamatis et al.2009).

Ανάμεσα στα μιτοχονδριακά γονίδια, εκείνα που επιλέγονται συνήθως για φυλογενετικές μελέτες είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές υπομονάδες. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για τις υπομονάδες I,II και III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI, COII, COIII αντίστοιχα), για το αποένζυμο του κυτοχρώματος b (Cytb), για τις υπομονάδες 1-6 της αφυδρογονάσης NADH καθώς και για την 4L (ND1-6 και 4L) και τέλος για τις υπομονάδες 6 και 8 της ATP συνθάσης (A6 και A8) (Boore,1999).

## **ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΣ ΛΑΓΟΣ (*Lepus Europaeus*)**

### Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus Europaeus*

**Βασίλειο:** Ζώα

**Φύλο:** Χορδωτά

**Υπό- φύλο:** Σπονδυλωτά

**Κλάση:** Θηλαστικά

**Τάξη:** Λαγόμορφα

**Οικογένεια:** Leporidae

**Γένος:** Lepus

**Είδος:** europaeus

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*) είναι είδος ευρέως διαδεδομένο στην Ευρώπη και τη δυτική Ασία. Είναι ένα θηλαστικό προσαρμοσμένο σε περιοχές με εύκρατο κλίμα. Σχετίζεται και είναι παρόμοιος μορφολογικά με το ευρωπαϊκό κουνέλι, το οποίο ανήκει στην ίδια οικογένεια με το λαγό, αλλά σε διαφορετικό γένος. Ο ευρωπαϊκός λαγός έχει συνολικό μήκος που κυμαίνεται από 60 έως 75cm και ζυγίζει από 3 έως 5 κιλά (Hall and Kelson, 1959, Peterson 1966). Το χρώμα του είναι καστανόγκριζο έως γκριζο καφέ, εκτός από την περιοχή της κοιλιάς που είναι γκρι- άσπρη. Το κεφάλι έχει καφέ αποχρώσεις με πιο ανοιχτόχρωμους κύκλους γύρω από τα μάτια. Έχει μακριά αυτιά, τα πίσω πόδια του είναι πιο μακριά από τα μπροστινά, ενώ τα πέλματά του καλύπτονται από παχύ τρίχωμα για να εμποδίζουν την ολίσθηση. Η ουρά, με μήκος συνήθως 7-11cm, είναι μαύρη στο επάνω μέρος της και άσπρη στο κάτω. Η διάρκεια ζωής του φτάνει τα 7-8 χρόνια ( Peterson, 1966, Bansfield, 1974). Το χειμώνα το τρίχωμα του ευρωπαϊκού λαγού γίνεται ελαφρώς πιο γκριζο. 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).

Ο ευρωπαϊκός λαγός θεωρείται νυκτόβιο ζώο. Γενικά προτιμά τη μοναχική ζωή αν και έχουν σημειωθεί εμφανίσεις του σε μικρές ομάδες, κατά την περίοδο του ζευγαρώματος. Αυτή η περίοδος διαρκεί αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, το οποίο κρατά από τον Ιανουάριο μέχρι και τον Αύγουστο. Γενικά τρέφεται με κάθε είδους φυτά, χόρτα, σιτηρά, λαχανικά, φύλλα θάμνων και μικρά κλαδιά. Στους φυσικούς θηρευτές του, συμπεριλαμβάνονται τα αρπακτικά πτηνά, τα σαρκοφάγα και τα αιλουροειδή.

#### **ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το μιτοχονδριακό γονίδιο *Cytb*, σε πληθυσμούς *Lepus europaeus* από την Θράκη, για την εκτίμηση της πληθυσμιακής δομής της υβριδικής ζώνης και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν τη συγκεκριμένη περιοχή. Χρησιμοποιήθηκε RFLP ανάλυση σε ενισχυμένο PCR προϊόν μιτοχονδριακού DNA.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Για τη μελέτη των απλοτύπων του μιτοχονδριακού DNA, που χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική ανάλυση, είναι απαραίτητο σαν πρώτο βήμα να απομονωθεί από τα κύτταρα το γενετικό υλικό, το οποίο περιλαμβάνει το γενωμικό και το μιτοχονδριακό DNA. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο TNES-Urea Buffer (Asahida et al., 1996), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

	Για 200ml	Τελικές Συγκεντρώσεις
Tris	2 ml of 1M pH 7.5	10 mM
NaCl	5 ml of 5 M	125 mM
EDTA-2Na	2 ml of 0.5 M pH 7.5	10 mM
SDS	10 ml of 10%	0.5%
Urea	48.05 g	4 M

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 50-100 mg ιστού και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 600μl TNES-Urea buffer (6 M urea; 1% SDS), το οποίο χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα.
2. Προσθέτουμε 2μl από 20mg/ml πρωτεϊνάσης K για την πέψη των πρωτεϊνών.
3. Επιάζουμε τα δείγματα στους 37°C για όλο το βράδυ.
4. Μετά την επώαση προσθέτουμε 3μl RNAάση και διατηρούμε τα δείγματα στους 37°C για 30min.

5. Προσθέτουμε 0,6ml φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 rpm για 10 min
7. Η άνω υδατική φάση μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωλήνα που ακολουθείται από τη δεύτερη εκχύλιση με την προσθήκη 0.6ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
8. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 rpm για 10 min
9. Μετά τη φυγοκέντρηση, η άνω φάση μεταφέρεται εκ νέου σε καινούργιο σωλήνα erpendorf.
10. Ακολουθεί κατακρήμνιση DNA, προσθέτοντας 3M NaOAc, pH 5.3 και 99% αιθανόλη.
11. Αφού ανακινηθεί ελαφρά, αποθηκεύεται στους -20 °C για 1h.
12. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 10min.
13. Έκπλυση με διάλυμα 70% αιθανόλης.
14. Αναδιάλυση του DNA σε 100μl ddH<sub>2</sub>O και επώαση στους 65 ° C για 1h.

#### **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ DNA ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ**

Μετά το πέρας της απομόνωσης του DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά είτε με φωτομέτρηση είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH<sub>2</sub>O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία ενδείκνυται να είναι πάνω από 150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε κατάλληλα για χρήση δείγματα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης θα περιγραφεί παρακάτω.

#### **ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)**

Για την ενίσχυση του τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές (Simon et al,1994) :

**Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών**

Εκκινητής	Αλληλουχία
CYTB1.Fw	5' - CCATCCACCATCTCAGCATGATGAAA - 3'
CYTB1.Rv	5' – ACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTC -3'

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων περιγράφεται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2 : Συστατικά αντίδρασης PCR**

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	Ποσότητα
Εκμαγείο DNA	100ng		2μL
dNTPs	10mM	0,2mM	1μL
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2mM	2μl
Buffer	10x	1x	5u
Εκκινητής Fw	50pmol/μL	1pmol/υL	1μl
Εκκινητής Rv	50pmol/μL	1pmol/υl	1μL
Taq DNA Polymerase	5 U/μl	1U	0,2μL
ddH <sub>2</sub> O			Μέχρι τα 50 μL
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>50 μl</b>	<b>50 μl</b>	<b>50μL</b>

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου Cytb είναι

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec  
Υβριδοποίηση: 52° C για 1min  
Επιμήκυνση: 72° C για 1 min

} 35 κύκλοι

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

### ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

- TAE 50x (500ml)

Tris Base 121gr

Acetic Acid 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 500ml

- Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1ml 1% w/v

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 35ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 10mg/ml). Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Η πηκτική τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 5μl PCR προϊόντος προστίθενται 3μl loading buffer.

Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων PCR που χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω πειράματα για την ανάλυση των πολυμορφισμών.

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες περίπου.

## **RFLP**

Είναι μια τεχνική που εκμεταλλεύεται τις παραλλαγές σε ομόλογες ακολουθίες DNA. Αναφέρεται σε διαφορά μεταξύ δειγμάτων ομόλογων μορίων DNA από διαφορετικές θέσεις περιοχών ενζύμων περιορισμού και σε σχετική εργαστηριακή τεχνική με την οποία μπορούν να απεικονιστούν αυτά τα τμήματα.

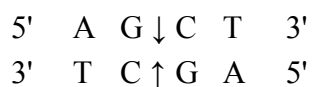
Στην ανάλυση RFLP, το δείγμα DNA διασπάται σε τεμάχια με περιοριστικά ένζυμα και τα προκύπτοντα θραύσματα περιορισμού διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους με ηλεκτροφόρηση πηκτής. Η βασική τεχνική για την ανίχνευση των RFLPs περιλαμβάνει τη θραύση ενός δείγματος DNA από ένα ένζυμο περιορισμού, το οποίο μπορεί να αναγνωρίσει και να κόψει το DNA οπουδήποτε συμβαίνει μια συγκεκριμένη βραχεία αλληλουχία, με μια διαδικασία γνωστή ως πέψη περιορισμού. Τα προκύπτοντα θραύσματα DNA διαχωρίζονται έπειτα από το μήκος τους διαμέσου μίας διαδικασίας γνωστής ως ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.

Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα HinfI και AluI.

Θέσεις κοπής HinfI:



Θέσεις κοπής AluI:



### **Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης**

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

Ακρυλαμίδα 75gr

Bis-acrylamide 2gr

ddH<sub>2</sub>O έως τα 200ml

TBE 10x (2lt)

Tris Base 121 gr

Boric acid 81,5gr

EDTA 0,5M 80ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 2lt

APS 20% w/v

TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 8%.



Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 8% αναγράφονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 1 : Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%**

Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	10,6ml
TBE 10x	5ml
TEMED	50μl
Urea	8g
APS 20%	350μl
H <sub>2</sub> O	Έως τα 50ml
Συνολικός όγκος	50ml

#### **ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΝ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ (SILVER STAINING)**

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook et al, 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

##### Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 8ml

Acetic Acid 0,5ml

ddH<sub>2</sub>O ως τα 400ml

##### Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO<sub>3</sub> 1gr/lit

### Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH<sub>4</sub> 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH<sub>2</sub>O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO<sub>3</sub> και οι πηκτές αναδεύονται για 20min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

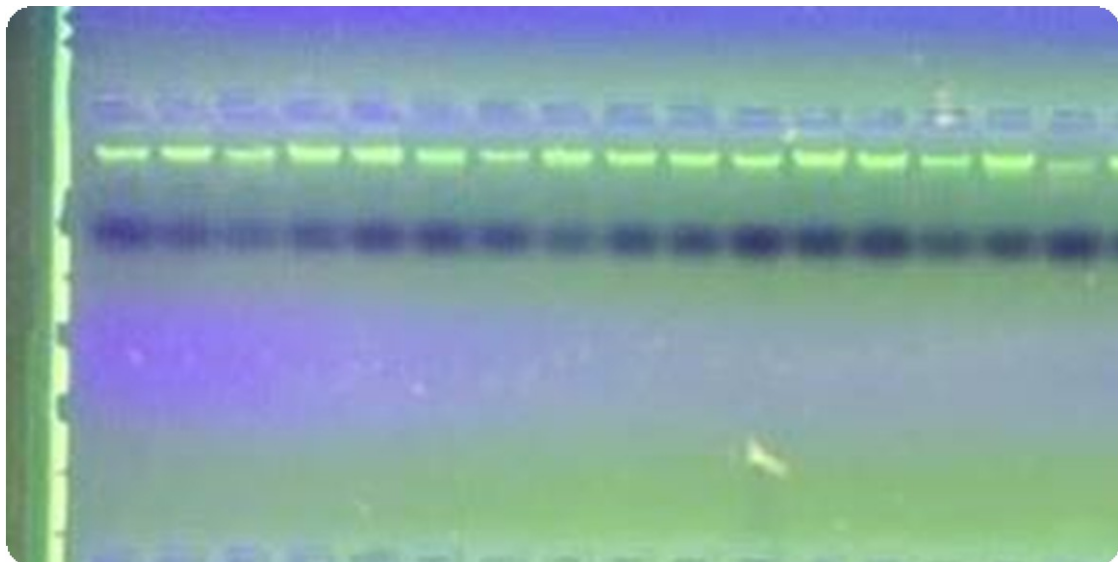
Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέγονται 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 300 ng/ul και τιμές  $A^{260}/A^{280}$  κοντά στο 1,8. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες : η μια ζώνη βρίσκεται ψηλότερα και είναι το πυρηνικό DNA, το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγάδι της πηκτής, και η δεύτερη ζώνη, εμφανίζεται χαμηλότερα και είναι το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο είναι περίπου 16 kbp.

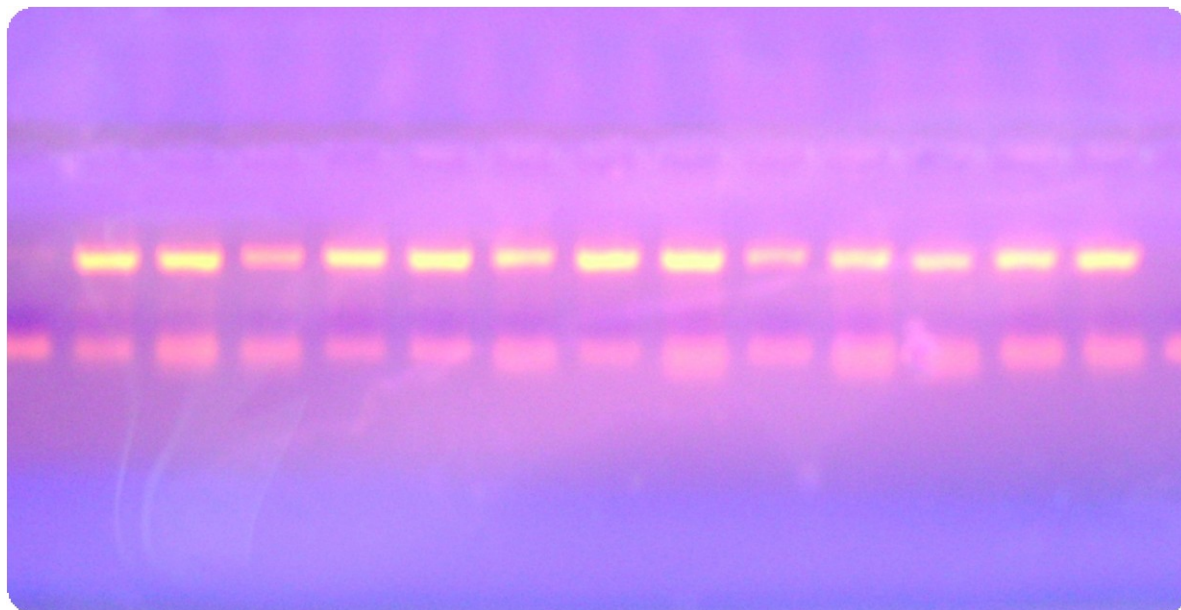


Εικόνα 8 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

### PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινήτων, ενισχύθηκε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου Cytb. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder), για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε. Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, το τμήμα που ενισχύθηκε είχε

μήκος περίπου 500 ζευγών βάσεων, και φαινόταν να έχει το ίδιο μέγεθος για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.



**Εικόνα 9 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR**

#### **RFLP**

Τα προϊόντα της πέψης, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 8%, σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνώσεων με χρώση με νιτρικό άργυρο αποκάλυψε 4 διαφορετικά πρότυπα. Ο πίνακας 3 περιέχει αναλυτικά τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το ηλεκτροφορητικό πρότυπο που εμφάνισαν.

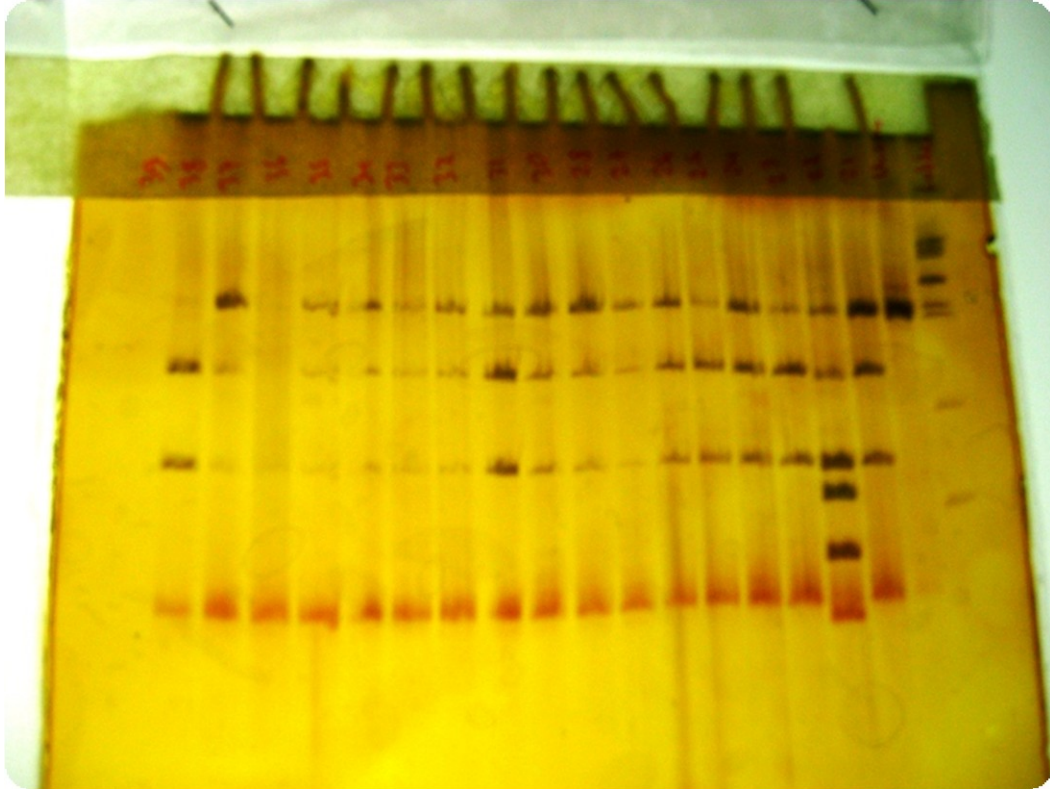
Η κατάταξη έγινε με βάση το Stamatis et al. 2007. Το σύνολο των 77 δειγμάτων χωρίστηκαν σε E, A, G και NEW. Με E συμβολίζεται το σύνολο των δειγμάτων που ανήκουν στην Κεντρική Ευρωπαϊκή απλοομάδα, με A συμβολίζεται τα δείγματα που ανήκουν στην ανατολική απλοομάδα, με G συμβολίζονται τα δείγματα που ανήκουν στην Νοτιοανατολική Ευρωπαϊκή απλοομάδα Τέλος, ως NEW χαρακτηρίσαμε ένα νέο πρότυπο ζωνώσεων που εμφανίστηκε λόγω μετάλλαξης στη θέση περιορισμού του ανατολικού προτύπου.

**Πίνακας 4: Τα δείγματα και οι απλοομάδες που ανήκουν**

No	Sample	Pattern	No	Sample	Pattern
1	30	E	40	117	E

2	31	E	41	118	A
3	32	E	42	119	A
4	33	E	43	120	A
5	34	G	44	121	A
6	35	E	45	122	G
7	80	A	46	123	A
8	81	NEW	47	124	E
9	82	G	48	125	E
10	83	A	49	126	A
11	84	E	50	127	E
12	85	A	51	128	A
13	86	NEW	52	129	E
14	87	E	53	130	E
15	88	A	54	2	A
16	89	G	55	3	A
17	90	A	56	4	E
18	91	E	57	5	E
19	92	E	58	6	A
20	93	A	59	7	E
21	94	A	60	8	E
22	95	A	61	9	E
23	96	A	62	10	A
24	97	A	63	11	E
25	98	E	64	12	E
26	100	A	65	13	A
27	101	A	66	14	A
28	102	NEW	67	15	E
29	103	A	68	16	A
30	104	A	69	17	A
31	105	A	70	18	E
32	106	A	71	19	E
33	107	E	72	20	E
34	108	A	73	21	G
35	109	A	74	22	E
36	110	G	75	23	E

37	113	A	76	24	E
38	114	A	77	25	E
39	116	A			



**Εικόνα 10 Αποτελέσματα RFLP**

Οι επιμέρους συχνότητες αντιστοιχούν σε:

A = 46,75 %

E = 41,45%

G = 7,79%

N = 3,89%

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν δείγματα ευρωπαϊκού λαγού (*L. europaeus*) και αναλύθηκαν όσων αφορά την αλληλουχία του *cytb*, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση μέρους του συμπλέγματος III της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το κυτόχρωμα b είναι ένα από τα 11 συστατικά μιας ομάδας πρωτεϊνών που ονομάζεται σύμπλεγμα III. Στα μιτοχόνδρια, το σύμπλεγμα III εκτελεί ένα βήμα μιας διαδικασίας γνωστής ως οξειδωτική φωσφορυλίωση, στην οποία οξυγόνο και απλά σάκχαρα χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), της κύριας πηγής ενέργειας του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα σύμπλοκα πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένου του συμπλόκου III, οδηγούν την παραγωγή ATP μέσω μιας σταδιακής μεταφοράς αρνητικά φορτισμένων σωματιδίων που ονομάζονται ηλεκτρόνια. Το κυτόχρωμα b εμπλέκεται στη μεταφορά αυτών των σωματιδίων μέσω του συμπλέγματος III.

Τα δείγματα προέρχονταν από πληθυσμούς λαγών στην περιοχή της Θράκης, όπου υπάρχει υβριδική ζώνη. Στον πίνακα φαίνονται ενδεικτικά κάποια δείγματα και η περιοχές συλλογής τους.

Πίνακας 5: Ενδεικτικά δείγματα

No	Περιοχή	Απλοομάδα	No	Περιοχή	Απλοομάδα
10	Αβάντας	A	22	Μαυρόπειτρα	E
11	Αβάντας	E	93	Μαυρόπειτρα	A
17	Αβάντας	A	100	Μαυρόπειτρα	A
19	Αβάντας	E	107	Μαυρόπειτρα	E
20	Αβάντας	E	5	Πλάκα	E
21	Αβάντας	G	6	Πλάκα	A
122	Αβάντας	G	7	Πλάκα	E
87	Κίρκη	E	91	Πλάκα	E
90	Κίρκη	A	113	Πλάκα	A
94	Κίρκη	A	35	Χαλκιδική	E
109	Κίρκη	A	34	Χαλκιδική	G

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η σημαντικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης καθιστά ιδιαίτερα έντονη τη φυσική επιλογή πάνω στα γονίδια που σχετίζονται με αυτή. Επομένως, οι βαριά επιβλαβείς μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια θα αφαιρεθούν γρήγορα λόγω φυσικής επιλογής. Όμως, οι μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν μόνο ελαφρώς επιβλαβείς μεταβολές στην απόδοση της παραγωγής ενέργειας, μπορεί να επιμείνουν. Τέτοιες ήπιες μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Smith et al. 2010).

Σε προηγούμενη μελέτη που έχει γίνει, με χρήση Dloop προκύπτει διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο διαφορετικές φυλογενετικές τάξεις (clade A και B). Λαγοί από την ηπειρωτική Ελλάδα και τα ελληνικά νησιά της Λευκάδας, της Νάξου, των Κυθήρων και της Κρήτης, όπως επίσης από την Βουλγαρία, την Ιταλία και την κεντρική Ευρώπη (Γερμανία, Αυστρία, Ουγγαρία, Σερβία, Ρουμανία), ομαδοποιήθηκαν στην τάξη B. Παράλληλα, λαγοί από τη Βουλγαρία, τις περιοχές της ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης, τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου( Λέσβος, Χίος, Σάμος, Ρόδος), όπως και από τις περιοχές της Κύπρου και του βόρειου Ισραήλ, ομαδοποιήθηκαν στην τάξη A. (Kasapidis et al., 2004)

Αυτές οι τάξεις αν και γεωγραφικά διακριτές παρουσιάζουν μια ζώνη επικάλυψης στην περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας, η οποία πιθανώς εκτείνεται στην Τουρκική Θράκη δυτικά του Βοσπόρου και ίσως στην Μικρά Ασία, αλλά στερούμαστε δειγμάτων για την απόδειξη αυτού. Αυτή η περιοχή είναι γνωστή ως υβριδική ζώνη (Hewitt, 1999) για είδη τα οποία περιορίστηκαν στα νότια βαλκάνια και στην Μικρά Ασία κατά τους Πλειστοκαινικούς παγετώνες.

Σε μία ακόμη μελέτη που έχουν γίνει στο κυτόχρωμα b (cyt b), προκύπτει η ύπαρξη τριών διαφορετικών απλοομάδων με πολύ καλά προσδιορισμένη κατανομή στην Ευρώπη και την Ανατολία. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε την κεντρική ευρωπαϊκή απλοομάδα (Γαλλία, Γερμανία, Ελβετία, Δανία, κλπ) η οποία χωρίζεται σε δύο υποομάδες Euh-A και Euh-B, τη νότια ευρωπαϊκή Seeh (Ελλάδα, Βουλγαρία) και την ανατολική AMh (Τουρκία, Κύπρος, Ισραήλ) (Stamatis et al.2011).

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, στην περιοχή επικάλυψης των δύο διαφορετικών φυλογενετικών προτύπων, διευκρινίστηκε η ζώνη επαφής ορίζοντας το περιορισμένο μοτίβο διανομής των δύο ομάδων, Μέσω του εντοπισμού ατόμων της υβριδικής ζώνης και της ταυτοποίησης των γενετικών ορίων που υπάρχουν στην συγκεκριμένη περιοχή της συνύπαρξής τους. Τα αποτελέσματα τόσο στο πυρηνικό, όσο και στο μιτοχονδριακό DNA υποδεικνύουν υψηλή γενετική διαφοροποίηση, μεταξύ των δύο ομάδων. Η ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA έγινε με Dloop και του πυρηνικού με μικροδορυφόρους. Εδραιώνεται η ύπαρξη μίας υβριδικής ζώνης μεταξύ των δύο σημαντικά διαφορετικών δεξαμενών γονιδίων οι οποίες συνυπάρχουν στην βορειοανατολική Ελλάδα. (Antonίου et al., 2013)

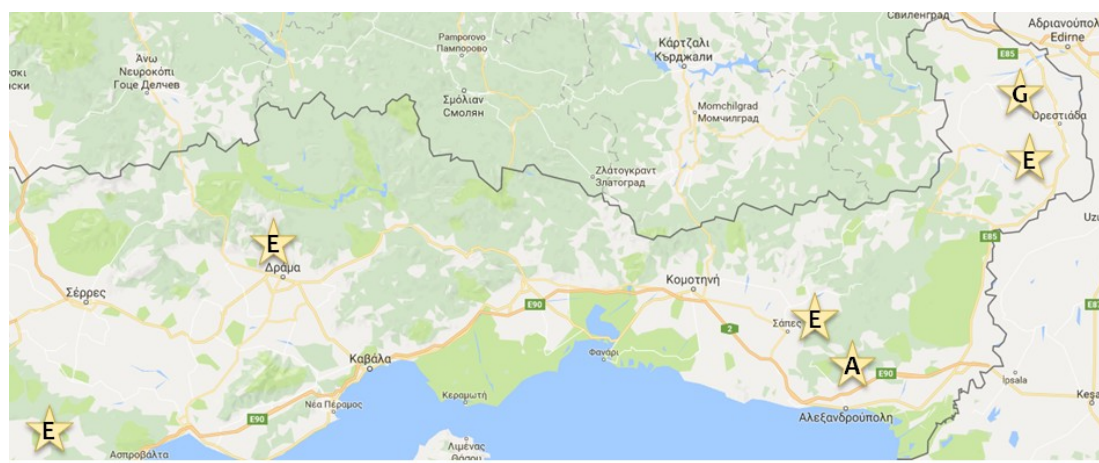
Τα δείγματα μας προέρχονται από την υβριδική ζώνη και ταυτοποιήθηκαν ότι προέρχονται σε μια απο τις ακόλουθες ομάδες : την κεντρική ευρωπαϊκή απλοομάδα (Γαλλία, Γερμανία, Ελβετία, Δανία, κλπ) , τη νότια ευρωπαϊκή Seeh (Ελλάδα, Βουλγαρία) και την ανατολική AMh (Τουρκία, Κύπρος, Ισραήλ).

Η μελέτη της υβριδικής ζώνης είναι πολύ σημαντική διότι μας επιτρέπει να ποσοτικοποιήσουμε τις υπεύθυνες γενετικές διαφοροποιήσεις για την ειδογένεση, να μετρήσουμε τη διάχυση των γονιδίων μεταξύ διαφορετικών τάξεων, να



εξερευνήσουμε τη φύση των ορίων στην ανταλλαγή γονιδίων και τις υπεύθυνες γενετικές διαφορές αυτών των ορίων, να καταλάβουμε την εξάπλωση των αλλαγών προσαρμογής (Barton and Hewitt, 1989, Harrison 1993).

Η μειωμένη ροή του γονιδίου μεταξύ των κυττάρων στη ζώνη επαφής μπορεί να έχει οδηγήσει σε ένα ενδιαφέρον γεγονός, που είναι η απουσία γεωγραφικού μίγματος των τάξεων οπουδήποτε αλλού εκτός της υβριδικής ζώνης (Πίνακας 5). Δεν έχει βρεθεί κανένα άτομο που να φέρει τον ευρωπαϊκό απλότυπο στην Ανατολία και αντίστροφα. Παρατηρούμε λοιπόν ότι δεν υπάρχει γεωγραφική απομόνωση στην υβριδική ζώνη.



**Εικόνα 11 Κατανομή ενδεικτικά επιλεγμένων δειγμάτων**

Μετά το λιώσιμο των πάγων, οι πληθυσμοί αναπτύχθηκαν και αποίκισαν το μεγαλύτερο μέρος της ευρωπαϊκής ηπείρου χωρίς να επηρεαστούν από γεωγραφικά όρια που θα μπορούσαν να αποτρέψουν τη διασπορά. Έτσι, πληθυσμοί με διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα ήρθαν σε επαφή. Στις ζώνες επαφής, όπου τα όρια συναντιούνται, η ισορροπία η οποία είναι υπεύθυνη για τις κυτταρικές ενέργειες, διαταράσσεται, επειδή τα διαφορετικά mtDNA δείχνουν μία έλλειψη συνεργασίας με το νέο πυρηνικό υπόβαθρο που επηρεάζει κυρίως την αποτελεσματικότητα του OXPHOS. Τα υβρίδια είναι λιγότερο ανταγωνιστικά, λόγω της μειωμένης παραγωγής ενέργειας. Αυτό το γενετικό όριο οδηγεί σε μία αναπαραγωγική απομόνωση των διαφοροποιημένων πληθυσμών, το οποίο θεωρείται το πρώτο βήμα για μία εν εξελίξει ειδογένεση μεταξύ των διαφορετικών γενεαλογιών του *L.europraeus* (Amoutzias et al.2016)

Μελλοντικά αναμένεται η περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών με επιπρόσθετες τεχνικές ανάλυσης του πυρηνικού DNA και χρήση γονιδιωματικής. Το mtDNA, όπως γνωρίζουμε, έχει μητρική κληρονομία και έτσι δεν μπορούμε να πάρουμε πολλές πληροφορίες για τη μετακίνηση των αρσενικών ατόμων.

Προσθετικά η φιλοπατρία των θηλυκών δημιουργεί ένα ακόμη εμπόδιο (Anril et al.2011, Bray et al.2007). Οι πυρηνικοί δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της κατάστασης του υβριδικού πληθυσμού σε βάθος και για να αναδείξουν τους γενότυπους που εμφανίζουν την καλύτερη αρμοστικότητα στο συγκεκριμένο περιβάλλον.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Amoutzias GD, Giannoulis T, Moutou KA, Psarra A-MG, Stamatis C, Tsipourlianos A, Mamouris Z. 2016. SNP identification through transcriptome analysis of the European Brown Hare (*Lepus europaeus*): cellular energetic and mother's curse. *PLoS One*. 11:e0159939
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2006) Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας
- Avril A, Leonard Y, Letty J, Peroux R, Guitton JS, Pontier D. 2011. Natal dispersal of European hare in a high-density population. *Mamm Biol*. 76:148–156
- Barton NH, Hewitt GM, Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Syst* (1985) 16:113–148
- Barton N.H., Hewitt G. 1989. Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*. Vol.341;497-503
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*
- Bilgin R. 2011. Back to the Suture: The Distribution of Intraspecific Genetic Diversity in and Around Anatolia. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 4080-4103
- Boore, L. *Animal Mitochondrial Genomes*. *Nucleic Acids Research* (1999) vol27:1767
- Bray Y, Devillard S, Marboutin E, Mauvy B, Peroux R. 2007. Natal dispersal of European hare in France. *J Zool*. 273:426–434.
- Giannoulis T., Stamatis C., Tsipourlianos A., Mamouris Z., Mitogenomic analysis in European brown hare (*Lepus europaeus*) processes genetic and functional differentiation between the distinct lineages (2017)
- Hebert, P., Ratnasingham, S., deWaard, J. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc R.Soc. Lond. B* (2003) 270:96
- Hewitt GM, Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J linn Soc* (1999) 68(1-2):87-112
- Hewitt G. 1988. Hybrid Zones - Natural Laboratories for Evolutionary Studies. *Trends Ecol Evol*. Jul;3(7):158-67
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. Vol.405; 907-913
- Hewitt G. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 359, 183–195
- Jeong, H., Kim, J., Im, H., Jeong, H., Hong, M., Lee, J., Han, Y., Kim, I. Mitochondrial DNA sequence variation of the swallowtail butterfly, *Pappilus xuthus* and the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Biochem Genet* (2009) 47:165

- Kasapidis P, Suchentrunk F., Magoulas A., Kotoulas G. 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* (2004)
- Krzywinski, J., Grushko, O., Besansky, N. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus* : an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. *Molecular phylogenetics and evolution* (2006) 39:417
- Lunt, D., Zhang, D., Szymura, J, Hewitt, G. The insect cytochrome oxidase I gene : evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* (1996). 5:153
- Mamuris Z., Moutou K.A., Stamatis C., Sarafidou T., Suchentrunk F. (2010). Y DNA and Mitochondrial lineage in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Mammalian Biology* 75: 233- 242
- Mamuris Z., Sfouggaris A.I., 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., Sfouggaris A.I., Stamatis C., Suchentrunk F. (2002). Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variations in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Biochemical Genetics* 40: 323- 338
- Russell, J. *iGenetics A Mendelian Approach* (2006)
- Saiki, RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N (Dec 20, 1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science*. **230** (4732): 1350–1354
- Stamatis C., Suchentrunk F., Moutou K.A., Giacometti M., Haerer G., Djan M., Vapa L., Vucovic M., Tvrtkovic. N., Sert H., Alves P., Mamuris Z. (2009). Phylogeography of the Brown Hare, *Lepus europaeus*, in Europe: legacy of southeastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography* 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. *FFI, Oryx*, 41(4), 548–551
- Αλαχιώτης Σ., Εισαγωγή στην Εξέλιξη (2007)