

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΑΡΒΑΡΗ ΜΑΡΙΑ

“ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ  
ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Lepus*”

Επιβλέπων Καθηγητής Μαμούρης Ζήσης

ΛΑΡΙΣΑ 2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΑΡΒΑΡΗ ΜΑΡΙΑ

"ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ  
ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Lepus*"

Επιβλέπων Καθηγητής Μαμούρης Ζήσης

ΛΑΡΙΣΑ 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4130/1

Ημερ. Εισ.: 29-11-2004

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΔΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075094

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ  
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ Π.Θ.

Κ. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ Π.Θ.

Κ. ΜΟΥΤΟΥ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ ΤΟΥ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ Π.Θ.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Μάρτιο έως τον Ιούνιο του 2004.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ζ. Μαμούρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα. Η συνεργασία μας υπήρξε άψογη και η καθοδήγηση του ήταν πολύτιμη στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κ. Σταμάτη για τη συμβολή του στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της εργασίας, για την κατανόηση του και την ηθική συμπαράστασή του σε όλο το χρονικό διάστημα διεξαγωγής των πειραμάτων.

Πολλές ευχαριστίες εκφράζονται στην Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Κ. Μούτου για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της. Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κα. Α. Ζίφα για τη βοήθεια της και την ευγένεια με την οποία με αντιμετώπισε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα. Ε. Ψόχιου για την ιδιαίτερη συμπαράσταση της, το ενδιαφέρον της και τη φιλική ατμόσφαιρα στο περιβάλλον του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τη φοιτήτρια κα. Α. Βούλγαρη με την οποία είχαμε μια στενή και εποικοδομητική συνεργασία.

Τέλος αλλά όχι τελευταία ευχαριστώ θερμά

Τον κ. Γ. Καραγιώργο για το ειλικρινές ενδιαφέρον του, την κατανόηση του και την ηθική συμπαράσταση του ιδιαίτερα στη συγγραφή της εργασίας.

Την οικογένεια μου που πάντα με αγάπη στήριξε την προσπάθειά μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
<b>I. ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ</b> .....	7
<b>II. ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ</b> .....	8
1. Ισοένζυμα.....	8
2. RAPD.....	9
3. RFLP.....	10
4. VNTRs και SSRs.....	11
<b>III. ΓΕΝΟΣ <i>Lepus</i></b> .....	13
1. <i>Lepus europaeus</i> .....	15
2. <i>Lepus timidus</i> .....	18
3. <i>Lepus americanus</i> .....	19
4. <i>Lepus corsicanus</i> .....	19
5. <i>Lepus capensis</i> .....	20
6. <i>Lepus granatensis</i> .....	20
<b>IV. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA</b> .....	21
<b>V. ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ <i>b</i></b> .....	23
<b>VI. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ</b> <b>ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Lepus</i></b> .....	24
<b>VII. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	28
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	29
<b>I. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ</b> .....	29

II. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA.....	31
III. ΕΝΙΣΧΥΣΗ DNA ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ PCR.....	33
IV. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	35
V. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ.....	36
VI. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (SEQUENCING).....	37
VII.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	39
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>44</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>49</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>56</b>

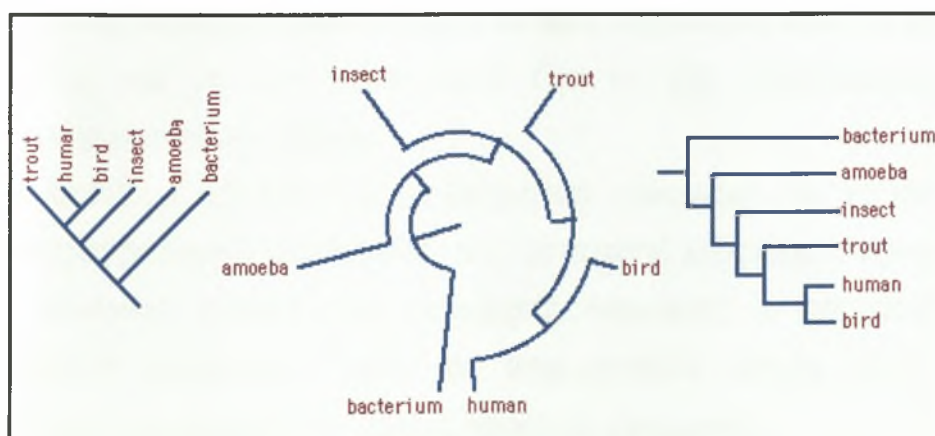
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Ι. ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ

Οι βιολόγοι υπολογίζουν ότι υπάρχουν περίπου 5-100 εκατομμύρια είδη οργανισμών που ζουν στον πλανήτη γη. Τα στοιχεία από μορφολογικά, βιοχημικά αλλά και δεδομένα αλληλουχιών γονιδίων προτείνουν ότι όλοι οι οργανισμοί είναι γενετικά συγγενικοί και οι γενεαλογικές σχέσεις των ζώντων οργανισμών αναπαριστούνται από ένα τεράστιο εξελικτικό δένδρο, το δένδρο της ζωής. Το δένδρο της ζωής αναπαριστά τις φυλογενέσεις των οργανισμών π.χ. την ιστορία των γραμμών των οργανισμών όπως αυτή αλλάζει με το πέρασμα του χρόνου.

Επομένως η φυλογένεση αναφέρεται στις εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στα είδη. Η διαδικασία της εξέλιξης τουλάχιστον δυο νέων ειδών από ένα προϋπάρχον είδος καλείται ειδογένεση. Οι φυλογενέσεις τυπικά αναπαριστούνται σε δένδρα. Το σχήμα αυτών των δένδρων ποικίλλει αλλά μπορούν να ερμηνευτούν ως εξής: οι γραμμές με ονόματα που σχετίζονται με αυτές αναφέρονται σε είδη που είναι στενά συγγενικά το ένα με το άλλο σε σύγκριση με άλλες ομάδες πάνω στο δένδρο. Οι γραμμές που οδηγούνται στην ίδια γραμμή αντιπροσωπεύουν είδη με έναν κοινό πρόγονο. Στην παρακάτω εικόνα υπάρχουν τρία διαφορετικά φυλογενετικά δένδρα που αντιπροσωπεύουν το ίδιο πρότυπο των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στα είδη.

**Εικόνα 1** Τρία φυλογενετικά δένδρα που αντιπροσωπεύουν το ίδιο πρότυπο φυλογενετικών σχέσεων





Τα φυλογενετικά δένδρα χωρίζονται σε έριζα και άρριζα. Ένα έριζο φυλογενετικό δένδρο είναι ένα δένδρο με ένα μοναδικό κόμβο που ανταποκρίνεται στον πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο όλων των ειδών που παριστάνονται στα φύλλα του δένδρου. Ένα άρριζο φυλογενετικό δένδρο δεν αναπαριστά την κατεύθυνση της εξελικτικής αλλαγής και δεν προσδιορίζει τις προγονικές και απογονικές μονάδες (Woese 1998).

## **II. ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

### **1. Ισοένζυμα**

Ισοένζυμα θεωρούνται τα ένζυμα που καταλύουν την ίδια αντίδραση αλλά διαφέρουν στη δομή τους και συνήθως σε μερικές ιδιότητες τους π.χ. ιστοειδίκευση, ευαισθησία σε αναστολείς, συγγένεια με το υπόστρωμα. Τα ισοένζυμα είναι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και μπορεί να είναι σε διαφορετικές περιοχές του χρωμοσώματος ή να προέρχονται από διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια της ίδιας περιοχής. Η Διεθνής Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών συνιστά ο όρος *ισοένζυμο* να περιορίζεται στις μορφές των ενζύμων που παρουσιάζουν διαφορετικές δομές, καταλύουν την ίδια αντίδραση και προέρχονται από διαφορετικά γονίδια (Γεωργάτσος Ι. Γ. 2001).

Ισοένζυμα που προκύπτουν ως αποτέλεσμα αλληλόμορφης ποικιλομορφίας (αλληλοένζυμα) οφείλονται σε κληρονομημένη συνυπεροχή, που σημαίνει ότι τα προϊόντα και των δυο αλληλομόρφων γονιδίων εκφράζονται. Από την άλλη μεριά, ισοένζυμα που έχουν προκύψει από γονίδια που βρίσκονται σε πολλαπλές περιοχές έχουν διαδοθεί σε είδη πληθυσμών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, και με τον τρόπο αυτό όλα τα είδη παρουσιάζουν τα ίδια συμπληρωματικά ισοένζυμα.

Τα ισοένζυμα δεν έχουν μόνο θεωρητικό ενδιαφέρον για να κατανοηθούν διάφορες βιολογικές διαδικασίες π.χ. μετατροπή ενός φυσιολογικού γονιδίου σε καρκινικό, ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η σπουδαιότητα των διαφόρων μεταβολικών οδών σε διαφορετικούς ιστούς, αλλά επίσης η ανάλυση τους παρουσιάζει πολλές πρακτικές εφαρμογές:

1. Αξιοποιούνται στη μελέτη πληθυσμιακής γενετικής (ταυτοποίηση νέων φαινοτύπων και γενετικού πολυμορφισμού)
2. Αξιοποιούνται σε εξελικτικές μελέτες (εύρεση αλληλόμορφων ακολουθιών)

## **2. Η τεχνική RAPD**

Η μέθοδος RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA, βασίζεται στα εξής: Ποσότητες γενωμικού DNA, της τάξεως των νανογραμμαρίων, υποβάλλονται στην τεχνική PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητικά μόρια, μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τυχαίων αλληλουχιών. Το πρωτόκολλο της ενίσχυσης διαφέρει από τις τυπικές συνθήκες PCR, στο ότι χρησιμοποιείται ένα απλό, αυθαίρετο νουκλεοτίδιο ως εκκινητικό μόριο και ότι δεν χρειάζεται καμία προγενέστερη γνώση του γενώματος, που υπόκειται στην ανάλυση.

Όταν το εκκινητικό μόριο είναι μικρό, τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα το γένωμα να περιέχει αρκετές θέσεις εκκίνησης τη μία κοντά στην άλλη, οι οποίες έχουν αντιστραμμένο προσανατολισμό. Η τεχνική RAPD κάνει ουσιώδη ανίχνευση του γενώματος για τις μικρές, αυτές, αντιστραμμένες επαναλήψεις και ενισχύει τα παρεμβαλλόμενα τμήματα DNA μεταβλητού μήκους.

Το «προφίλ» των προϊόντων ενίσχυσης εξαρτάται από το συνδυασμό DNA «μήτρας» - εκκινητικού μορίου και κάτω από αυστηρά, ελεγχόμενες συνθήκες, αναπαράγεται για κάθε δεδομένο συνδυασμό.

Τα προϊόντα ενίσχυσης αναλύονται σε πηκτές αγοράζης και οι πολυμορφισμοί προσφέρονται σαν κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες, οι οποίοι κληρονομούνται υπό τους νόμους του Μέντελ.

Υπάρχουν αρκετά μειονεκτήματα τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος RAPD:

- 1) Το μέγεθος του εκκινητικού μορίου
- 2) Η ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης
- 3) Η πιθανότητα της ταυτόχρονης μετατόπισης κάποιων ζωνών DNA
- 4) Μη αναπαραγόμενα προϊόντα ενίσχυσης

### **3. Η τεχνική RFLP**

Η τεχνική RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) βασίζεται στην ενίσχυση ποικιλόμορφων περιοχών του γονιδίου στόχου και στη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού, που έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν και να κόβουν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Κάθε ένζυμο περιορισμού εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο πέψης σε ένα τμήμα DNA και έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αριθμού τμημάτων DNA συγκεκριμένου μεγέθους.

Η μετάλλαξη σε μια θέση οδηγεί σε απώλεια ή δημιουργία μιας θέσης κοπής. Στη μέθοδο RFLP γίνεται σύγκριση μεταξύ των περιοριστικών προτύπων των ατόμων που λαμβάνονται από διάφορα ένζυμα περιορισμού.

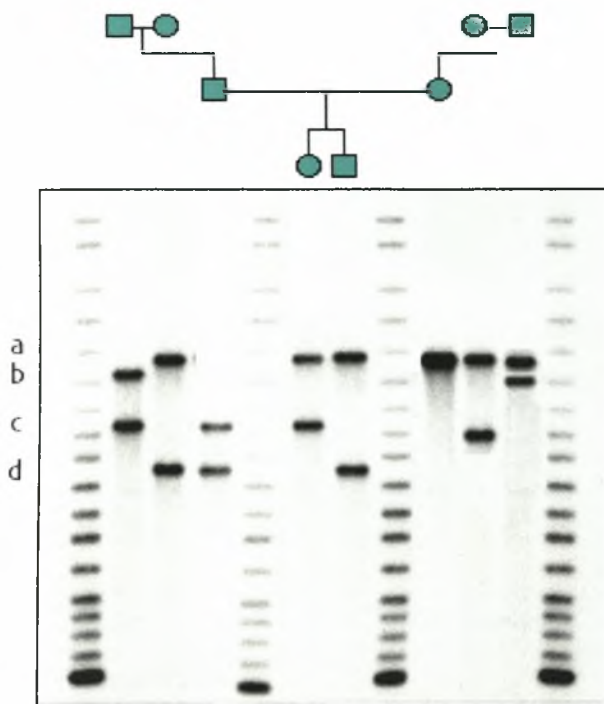
Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Η ευκολία λήψης των δειγμάτων
2. Οι ελάχιστες απαιτήσεις σε ποσοστό ιστού
3. Η χρησιμοποίηση ιστών που δεν έχουν διατηρηθεί σε καλή κατάσταση

Η τεχνική ανάλυσης RFLP έχει βασικά πλεονεκτήματα σε περίπτωση ανάμικτων δειγμάτων.

Αν και ο τύπος RFLP αντιπροσωπεύει μια τεχνική που οδηγεί σε αναπαραγόμενα και αποτελεσματικά συμπεράσματα, τα μοντέλα RFLP παρέχουν πληροφορίες μόνο για τη θέση των τμημάτων κοπής, οι οποίες μπορεί να ποικίλουν εξ' αιτίας μεταλλάξεων ανάμεσα σε είδη.

Είδη με μικρή εξελικτική απόσταση ίσως να μην διαφοροποιούνται με την τεχνική RFLP, αν και έχουν διαφορετικές βάσεις των αλληλουχιών. Επιπλέον στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η προϋπάρχουσα γνώση για τη μελετούμενη αλληλουχία αλλά και η αυξημένη προσοχή για την αποφυγή της μόλυνσης του εξεταζόμενου DNA από ξένο (Μαμούρης 2001).



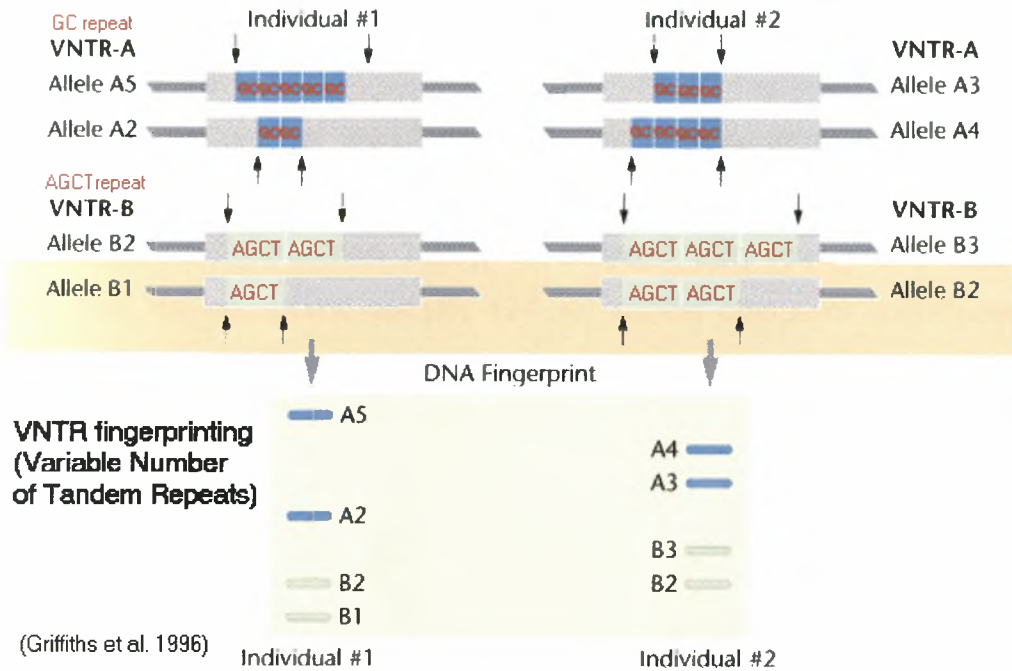
Εικόνα 2 Τα αποτελέσματα της μεθόδου RFLP σε gel αγαρόζης για μια οικογένεια. Οι μεταλλάξεις στα μέλη της οικογένειας δημιουργούν διαφορετικές θέσεις κοπής για το ίδιο περιοριστικό ένζυμο.

#### **4. VNTRs και SSRs**

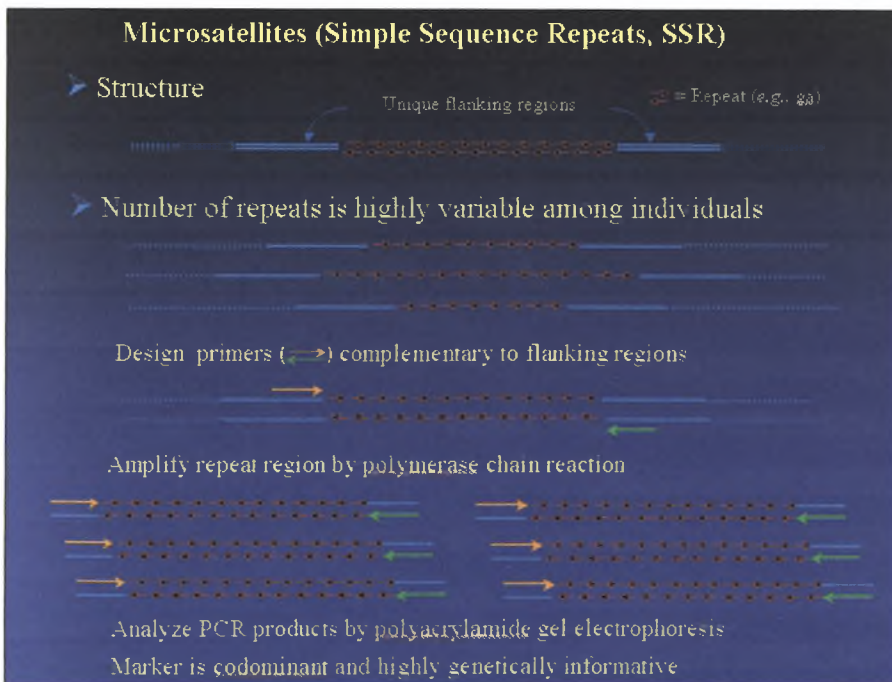
Οι VNTRs (Variable number of Tandem Repeats) δημιουργούνται από την παρουσία μικρών αλληλουχιών, οι οποίες επαναλαμβάνονται πολλές φορές εν σειρά και είναι τοποθετημένες η μια μετά την άλλη, έτσι ώστε το τέλος της μιας να ακολουθεί η αρχή της επόμενης. Το χαρακτηριστικό που κάνει αυτούς τους πολυμορφισμούς χρήσιμους είναι ότι μπορεί να προκύψει ένας μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων, επειδή το συνολικό μέγεθος της επανάληψης μπορεί να διαφέρει από χρωμόσωμα σε χρωμόσωμα.

Οι μικροδορυφόροι SSRs (Simple Sequence Repeats) αποτελούν κλάσμα του επαναλαμβανόμενου DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπου το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας κυμαίνεται από 1-5 ζεύγη βάσεων. Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες θεωρείται ότι δεν υπόκεινται σε εξελικτικές πιέσεις. Οι μεταλλακτικοί ρυθμοί στο μικροδορυφορικό DNA είναι της τάξης του  $10^{-5} - 10^{-2}$  δηλαδή 2 - 4 τάξεις μεγέθους μεγαλύτεροι από ότι στα ισόενζυμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού, δηλαδή πολλά αλληλόμορφα και υψηλή ετεροζυγωτία. Οι SSRs

χρησιμοποιούνται ευρέως για μελέτες ανάλυσης πατρότητας, σύνδεσης, χαρτογράφησης και πληθυσμιακής δομής σε πλήθος οργανισμών (Gelehrter et al., 2003).



Εικόνα 3 Το αποτύπωμα του DNA είναι ξεχωριστό για τα άτομα #1 και #2.



Εικόνα 4 Απεικόνιση μικροδορυφορικού DNA

### **III. ΓΕΝΟΣ *Lepus***

Τα λαγόμορφα αποτελούν δύο αναγνωρισμένες οικογένειες: τα Ochotonidae και τα Leporidae. Τα Ochotonidae (picas) αποτελούνται από το γένος Ochotona με 25 είδη, ενώ τα Leporidae (λαγοί και κουνέλια) περιλαμβάνουν 11 αναγνωρισμένα γένη (περίπου 45 είδη), 8 εκ των οποίων είναι μονοτυπικά (Hoffman 1993).

Το γένος *Lepus*, το οποίο έχει μία παγκόσμια κατανομή πληθυσμού αποτελείται από 24 έως 30 είδη από κουνέλια και λαγούς (Flux and Angermann 1990, Hoffman 1993). Τα διάφορα είδη του γένους *Lepus* δεν είναι ένας συγκεκριμένος αριθμός (24-30) επειδή ορισμένοι επιστήμονες τα αναγνωρίζουν ως είδη ενώ άλλοι όχι. Στο γένος *Lepus* ανήκουν τα παρακάτω είδη:

*Lepus alleni*

*Lepus americanus*

*Lepus arcticus*

*Lepus brachyurus*

*Lepus californicus*

*Lepus callotis*

*Lepus capensis*

*Lepus castrovieioi*

*Lepus comus*

*Lepus coreanus*

*Lepus corsicanus*

*Lepus europaeus*

*Lepus faqani*

*Lepus flaviularis*

*Lepus araratensis*

*Lepus hainanus*

*Lepus insularis*

*Lepus mandshuricus*

*Lepus niaricollis*

*Lepus oiostolus*

*Lepus othus*

*Lepus pequensis*

*Lepus saxatilis*

*Lepus sinensis*

*Lepus starcki*

*Lepus timidus*

*Lepus tolai*

*Lepus townsendii*

Lepus victoriae  
Lepus varkandensis  
Lepus pequensissiamensis  
Lepus pequensisvassali

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε τα είδη του *Lepus* που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1** Αριθμός ειδών *Lepus* και η γεωγραφική κατανομή τους

Αριθμός ειδών	Είδος	Έτος ταυτοποίησης, κοινή ονομασία	Κατανομή
1	<i>Lepus americanus</i>	Erxleben 1777, snowshoe hare	Κεντρική Αμερική, Βόρεια Αμερική: Αλάσκα, Καναδάς, ηπειρωτική USA
2	<i>Lepus brachyurus</i>	Temminck 1845, Γιαπωνέζικος λαγός	Νότια Ασία
3	<i>Lepus californicus</i>	Gray 1837, Black-tailed jackrabbit	Κεντρική Αμερική, Βόρεια Αμερική. Καταγωγή: ηπειρωτική USA, γηγενή και εισαγόμενα στο Μεξικό
4	<i>Lepus capensis</i>	Linnaeus 1758, Ευρωπαϊκός λαγός	Αφρική, Ευρώπη και βόρεια Ασία (εκτός Κίνας), νότια Ασία
5	<i>Lepus comus</i>	Allen 1927, Yunnan hare	Νότια Ασία
6	<i>Lepus corsicanus</i>	De Winton 1898	Ευρώπη και βόρεια Ασία (εκτός Κίνας)
7	<i>Lepus europaeus</i>	Pallas 1778, Καφέ ευρωπαϊκός λαγός	Ευρώπη και βόρεια Ασία (εκτός Κίνας), Βόρεια Αμερική, νότια Ασία.

			Καταγωγή: Καναδάς. Εισαγωγή στη ηπειρωτική Αμερική
8	<i>Lepus granatensis</i>	Rosenhauer 1856, Granada hare	Ευρώπη και βόρεια Ασία (εκτός Κίνας)
9	<i>Lepus hainanus</i>	Swinhoe 1870, Hainan hare	Νότια Ασία
10	<i>Lepus mandshuricus</i>	Radde 1861, Manchurian hare	Ευρώπη και βόρεια Ασία (εκτός Κίνας) νότια Ασία
11	<i>Lepus oiostolus</i>	Hodgson 1840, Χνουδωτός λαγός	Νότια Ασία
12	<i>Lepus sinensis</i>	Gray 1832, Κινέζικος λαγός	Νότια Ασία
13	<i>Lepus timidus</i>	Linnaeus 1758, Πολικός, βουνίσιος λαγός,	Ευρώπη και βόρεια Ασία (εκτός Κίνας) νότια Ασία. Καταγωγή: ηπειρωτική Αμερική
14	<i>Lepus tolai</i>	Pallas 1778, Tolai hare	Ευρώπη και βόρεια Ασία (εκτός Κίνας) νότια Ασία
15	<i>Lepus townsendii</i>	Bachman 1839, White tailed jackrabbit	Βόρεια Αμερική

### 1. *Lepus europaeus*

Φυσική περιγραφή:

Το συνολικό μήκος του καφέ ευρωπαϊκού λαγού είναι 600-750 mm με μέσο όρο τα 680 mm. Η ουρά του έχει μήκος από 72-110 mm. Ζυγίζει περίπου 3-5 Kg. Το μήκος και το πλάτος του κρανίου του είναι 96-104 mm και 44-51 mm αντίστοιχα (Peterson 1966, Hall και Kelson 1959). Ο ευρωπαϊκός λαγός έχει μακριά αυτιά με μαύρες άκρες, τα οποία είναι γκριζωπά στο εσωτερικό. Η γούνα του είναι κιτρινωπή-καφέ έως γκριζωπή-καφέ ανάλογα με το



περιβάλλον στο οποίο ζει και το κάτω μέρος του σώματος έχει χρώμα γκριζο-άσπρο. Τον χειμώνα η γούνα του ευρωπαϊκού λαγού γίνεται λίγο πιο γκριζα. Το πρόσωπο του *L. europaeus* είναι καφέ όμως η ουρά του είναι μαύρη από πάνω και άσπρη από κάτω (Peterson 1966, Bansfield 1974, Dragg 1974). Μέχρι σήμερα δεν έχει σημειωθεί σεξουαλικός διμορφισμός στο είδος *L. europaeus*.



Εικόνα 5 *Lepus europaeus*

#### Πίνακας 2 Συστηματική κατάταξη

<b>Βασίλειο</b>	<b>Animalia</b>
Φύλο	Chordata
Υπόφυλο	Vertebrata
Κλάση	Mammalia
Τάξη	Lagomorpha
Οικογένεια	Leporidae
Γένος	<i>Lepus</i>
Είδος	<i>Lepus europaeus</i>

#### Τόπος διαμονής:

Ο *L. europaeus* ζει κυρίως σε αγρούς και βοσκότοπους που συνορεύουν με σαβάνες και φράχτες από θάμνους (Peterson 1966, Bansfield 1974).

#### Αναπαραγωγή:

Η αναπαραγωγική περίοδος για τον ευρωπαϊκό λαγό είναι μεταξύ της μέσης του χειμώνα (Ιανουάριος / Φεβρουάριος) και της μέσης του καλοκαιριού. Η εγκυμοσύνη διαρκεί 30 έως 42 ημέρες (Bansfield 1974, Peterson 1966). Συνήθως γεννιούνται 2-4 μικρά λαγουδάκια το χρόνο. Η περίοδος θηλασμού λέγεται ότι είναι ένας μήνας (Bansfield 1974). Οι νεαροί λαγοί φτάνουν στην σεξουαλική τους ωριμότητα 8 με 12 μήνες μετά τη γέννηση τους. Οι νεογέννητοι λαγοί έχουν πρόωρη ανάπτυξη, με μακριά και μεταξένια γούνα (Peterson 1966).

#### Συμπεριφορά:

Ο *L. europaeus* δεν είναι αγελαίο ζώο, είναι κυρίως μοναχικός εκτός από την αναπαραγωγική περίοδο. Ο ευρωπαϊκός λαγός δρα κατά το δειλινό είναι δηλαδή νυκτόβιο ζώο το οποίο ψάχνει την τροφή του από τις 7 το βράδυ έως τις 7 το πρωί. Επιπλέον παραμένει ενεργός καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Ο *L. europaeus* έχει άριστα ανεπτυγμένη της αίσθησης της όρασης, της όσφρησης και της ακοής. Μετά την ανίχνευση ενός αρπακτικού ζώου θα τρέξει να κρυφτεί ή να αλλάξει κατεύθυνση γρήγορα εάν είναι απαραίτητο. Μέσα στα χαρακτηριστικά του συμπεριλαμβάνεται η ταχύτητα του. Έχει καταγραφεί ότι μπορεί να τρέξει έως 35 mph (mile per hour) ή περίπου 60 kph (kilometer per hour) (1 mile= 1856 m) σε ευθεία γραμμή. Ο ευρωπαϊκός λαγός είναι δεινός κολυμβητής και δεν διστάζει να διασχίσει ένα ποτάμι εάν αυτό είναι απαραίτητο (Bansfield 1974). Ο *L. europaeus* έχει χαρακτηριστεί ως ήσυχο 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).

#### Διατροφικές συνήθειες:

Ο *L. europaeus* είναι φυτοφάγο ζώο και τρέφεται κυρίως με γρασίδι, πόες και καρπούς αγρών κατά την διάρκεια του καλοκαιριού. Τον χειμώνα τρέφεται με

κλαδιά δένδρων, φύτρες, φλοιούς θάμνων, μικρά δένδρα και με φλοιούς νεαρών δένδρων φρούτων. Επιπλέον συνήθως αναμασά τη τροφή του και τα μαλακά περιττώματά του (κοπροφαγία) (Bansfield 1974, Peterson 1966).

## 2. *Lepus timidus*

Ο *L. timidus* κατανέμεται γεωγραφικά στην Αμερική αλλά και στην Ευρώπη και στην Ασία. Ζει σε περιβάλλον όπως η τούνδρα και η тайга αλλά και σε δασικές εκτάσεις του βορρά. Στην Ευρώπη υπάρχουν επίσης πληθυσμοί στη νότια Σκανδιναβία, στη Σκωτία και στην Ιρλανδία. Οι Άλπεις κατοικούνται επίσης από το βουνίσιο λαγό και στην Ασία το εύρος κατανομής του εκτείνεται στις στέπες της κεντρικής Ασίας. Ο πληθυσμός του *L. timidus* ανά τον κόσμο φαίνεται να είναι σταθερός αλλά οι πληθυσμοί των Άλπεων είναι σε κίνδυνο εξαφάνισης.

Ο *L. timidus* έχει μήκος 70 cm και βάρος 3 Kg, και κατά κύριο λόγο άσπρη ή γκρι γούνα και καφέ χρώμα ματιών (Angerbjorn & Flux 1995). Ο βουνίσιος λαγός είναι καλά προσαρμοσμένος σε σκληρές συνθήκες με περιορισμένες πηγές τροφής. Άρα αυτό το είδος είναι ανάμεσα στα πρώτα μεγάλα θηλαστικά που χρησιμοποίησαν τις φτωχές συνθήκες της νέας μεταπαγετωνικής γης. Κατά τη περίοδο των παγετώνων παντού στην κεντρική Ευρώπη (μαζί με την νότια Αγγλία) είναι πιθανόν να υπήρχε ένας συνεχής πληθυσμός βουνίσιων λαγών (Hanstrom 1972, Stuart 1974). Θεωρείται ότι είναι αρκετά κοινωνικό ζώο και υπάρχουν συγκεντρώσεις αρκετών εκατοντάδων λαγών (Angerbjorn & Flux 1995).



Εικόνα 6 *Lepus timidus*

### 3. *Lepus americanus*

Ο *L. americanus* είναι κατανέμεται γεωγραφικά στον Καναδά και στη βόρεια περιοχή των Η.Π.Α (Banfield 1974, Hodges 2000a, b). Βρίσκεται συνήθως σε περιβάλλον όπως η τούνδρα η тайга αλλά και σε δάση. Το μήκος του ποικίλλει από 413-518 mm όπου τα 39-59 mm είναι ουρά. Το βάρος του κυμαίνεται από 1.43-1.55 Kg. Η γούνα του είναι ανοικτό γκρι το καλοκαίρι ενώ το χειμώνα γίνεται σχεδόν ολόκληρη άσπρη. Η αναπαραγωγική περίοδος για τον *L. americanus* είναι από τα μέσα Μαρτίου έως τον Αύγουστο.

Τα αποτελέσματα της μελέτης των Burton et al. (2002) δείχνουν πως παρόλο την δραματική διακύμανση στην πυκνότητα, ο *L. americanus* έχει ένα αποτελεσματικό μέγεθος πληθυσμού. Επιπλέον το υψηλό επίπεδο της αναφερόμενης γενετικής ροής επιβεβαιώνει ότι η διάδοση του *L. americanus* είναι επιτυχής και ίση ανάμεσα στα δύο φύλα.



Εικόνα 7 *Lepus americanus*

### 4. *Lepus corsicanus*

Ο *L. corsicanus* αρχικά διαδεδομένος στην κεντρική και νότια Ιταλία, στη Σικελία και στην Κορσική στις αρχές του 16<sup>ου</sup> αιώνα (Vinge 1992, Palacios 1996), περιγράφηκε το 1898 από τον W.E. de Winton. Ο *L. corsicanus* χαρακτηρίζεται από μικρότερες διαστάσεις και πιο κιτρινωπή γούνα σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη *Lepus*.

Η κλίμακα διανομής για το είδος του ιταλικού λαγού *Lepus corsicanus* έχει συρρικνωθεί πολύ τις τελευταίες δεκαετίες λόγω του υπερβολικού κυνηγιού

και τον ανεφοδιασμό με τους ντόπιους καφέ λαγούς (*Lepus europaeus*) στην κεντρική και νότια Ιταλία και στην Σικελία.

### 5. *Lepus capensis*

Ο *Lepus capensis* κατάγεται από τη νότια Ασία και νότια Αφρική. Εισήχθηκε όμως σε Ευρώπη, βόρεια Ασία και Αφρική. Ο *L. capensis* ζυγίζει περίπου 4-5 Kg και έχει μήκος κατά μέσο όρο 557 mm. Κατοικεί συνήθως σε εύκρατο κλίμα ή σε ερήμους μέσα σε έλη, βάλτους αλλά και αγροκαλλιέργειες.

Ο *L. c. mediterraneus*, ο οποίος αρχικά εντοπίστηκε στη Σαρδηνία τον 16<sup>ο</sup> αιώνα (Vigne 1992) ίσως ανήκει σε βόρειο-Αφρικανικούς ή Μεσο-ανατολικούς πληθυσμούς του *L. capensis*.



Εικόνα 8 *Lepus capensis*

### 6. *Lepus granatensis*

Το μήκος του *L. granatensis* κυμαίνεται γύρω στα 55 cm και το βάρος του στα 2.5 Kg. Θεωρείται ότι η μεγαλύτερη κατανομή του είναι στην ιβηρική χερσόνησο.

#### **IV. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA**

Το μιτοχονδριακό DNA των ζώων είναι ένα κυκλικό μόριο, μεγέθους 15-20 kb συνήθως, και αποτελείται από 37 γονίδια. Το μέγεθος του mtDNA ποικίλει από 16.300-17200 bp στο είδος *L. europaeus* και αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στην ύπαρξη mtDNA ετεροπλάσμιών.

Τα γονίδια του mtDNA κωδικοποιούν για 22 tRNA, 2 rRNA και 13 mRNA, τα οποία μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH, μια υπομονάδα του κυτοχρώματος *b*, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* (COI, II, III) και δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 6 και 8). Σε φυσικούς πληθυσμούς των περισσότερων θηλαστικών έχει παρατηρηθεί ποικιλομορφία στο κυτόχρωμα *b* (Halanych 1999, Riddle 1993).

Επίσης, το μιτοχονδριακό DNA περιλαμβάνει και μια μη κωδικοποιούσα περιοχή, την περιοχή ελέγχου ή βρόχο D, όπου βρίσκονται οι προαγωγείς για τη μεταγραφή των δύο αλυσίδων καθώς και η ακολουθία έναρξης αντιγραφής της μιας αλυσίδας.

Περιοχές όπως ιντρόνια, επαναλαμβανόμενο DNA και ψευδογονίδια απουσιάζουν συνήθως από το μιτοχονδριακό DNA των ανωτέρων ευκαρυωτικών οργανισμών.

Η διάταξη των γονιδίων στο mtDNA των ζώων παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα, ιδιαίτερα για τα ψάρια, τα θηλαστικά και τα αμφίβια. Ως πιθανή εξήγηση προτείνεται η συμπαγής δομή του μιτοχονδριακού DNA με την απουσία ιντρονίων και μεσογονιδιακών διαστημάτων. Στη διατήρηση της γονιδιακής διάταξης συμβάλλει και η απουσία ανασυνδυασμού μεταξύ των μορίων του και η σχεδόν αποκλειστικά μητρική κληρονομία του.

Κάθε άτομο περιλαμβάνει στα κύτταρα του χιλιάδες αντίγραφα του ίδιου όμως μορίου μιτοχονδριακού DNA (ομοπλάσμια).

Έχει διαπιστωθεί ότι μια καινούργια μετάλλαξη μπορεί να δημιουργήσει νέο τύπο μιτοχονδριακού DNA (ετεροπλάσμια). Τέτοιες περιπτώσεις

ετεροπλασμίας έχουν παρατηρηθεί για παράδειγμα στους λαγούς του είδους *Lepus europaeus*.

Ο ρυθμός μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA έχει εκτιμηθεί ότι είναι υψηλότερος συγκριτικά με το πυρηνικό DNA και είναι χρήσιμος δείκτης όταν μελετάται η γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα και μέσα σε στενά συγγενικά είδη (Brown et al. 1979).

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που απαντούν στο μόριο του mtDNA αφορούν απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Πιο σπάνια συμβαίνουν προσθήκες ή ελλείμματα και συνήθως περιορίζονται στην περιοχή του βρόχου D. Το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλάξεων συμβαίνει στην τρίτη θέση του κωδικονίου, οπότε δεν προκύπτουν αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία, για αυτό και οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA θεωρούνται ουδέτερες.

Το μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιείται ως εργαλείο για την εύρεση φυλογενετικών σχέσεων. Είναι ένας χρήσιμος γενετικός δείκτης όταν μελετάμε την ιστορία των πληθυσμών, τη γενετική διαφοροποίηση και τη φυλογένεση (Avice 1994).

Τα χαρακτηριστικά που καθιστούν το μιτοχονδριακό DNA ιδανικό μοριακό δείκτη είναι:

- Ο μητρικός τρόπος κληρονομής και η απλοειδής φύση του, που μειώνουν αποτελεσματικά το πληθυσμιακό μέγεθος του στο  $\frac{1}{4}$  του πυρηνικού και έτσι καθίσταται πιο ευαίσθητο σε φαινόμενα γενετικής παρέκκλισης
- Η ευκολία απομόνωσης του
- Το μικρό μέγεθός του και η συντηρημένη οργάνωση του σε όλα σχεδόν τα σπονδυλωτά
- Η απουσία ανασυνδυασμού στο μόριο του
- Η ουδετερότητα των περισσότερων μεταλλάξεων
- Η συνύπαρξη στο μιτοχονδριακό DNA περιοχών με υψηλούς (βρόχος D), αλλά και αργούς (γονίδια του tRNA) ρυθμούς μεταλλάξεων

Όμως τα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA αντιπροσωπεύουν ένα μικρό ποσοστό του συνολικού γενώματος ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Έτσι τα





κυτοχρώματος *b* σε νουκλεοδικές βάσεις αρχείων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST.

## **VI.ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ**

### **Lepus**

Για την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων του γένους *Lepus* έχουν γίνει μελέτες βασισμένες τόσο στο μιτοχονδριακό DNA, τα αλλοένζυμα και τη RAPD ανάλυση σε χώρες όπως η Ελλάδα, η Ιταλία, η Σουηδία, αλλά και η Ισπανία.

Στην Ελλάδα ο *L. europaeus* είναι ευρέως διασκορπισμένος στην ηπειρωτική χώρα αλλά και στα νησιά. Ο καφέ ευρωπαϊκός λαγός έχουν κατηγοριοποιηθεί σε διάφορα υποείδη (π.χ. *Lepus europaeus carpathous*, *L. e. creticus*, *L. e. cyrensis*, *L. e. ghigii*, *L. e. meridiei*, *L. e. niethammeri*, *L. e. parnassius*, *L. e. rhodius*, *L. e. transsylvanicus*) με βάση το χρώμα της γούνας, το μέγεθος του σώματος και χαρακτηριστικά του δέρματος και των δοντιών (De Beaux 1929, Hilzheimer 1906, 1908, Miller 1912, von Wettstein 1943, overview in De Beaufort 1991).

Στη νότια και κεντρική Ελλάδα ένα μωσαϊκό από στέπες και δάση (Lang 1994) θα μπορούσε να ήταν το κατάλληλο περιβάλλον για τη δημιουργία ενός καταφυγίου για τους καφέ λαγούς κατά τη διάρκεια του Πλειστόκαινου όταν οι μεγαλύτερες περιοχές της Ευρώπης ήταν καλυμμένες με πάγο ή ήταν ακατάλληλες για τη διαβίωση του συγκεκριμένου είδους. Οι Suchentrunk et al. (2003) σε μια μελέτη βασισμένη στα αλλοένζυμα παρείχαν αρκετές ενδείξεις για την υπόθεση της εμφάνισης συγκεκριμένων αλληλομόρφων στην Ελλάδα που πιθανώς πηγάζουν από έναν απομονωμένο πληθυσμό κατά τη διάρκεια του Πλειστόκαινου στα νότια Βαλκάνια, τα οποία δεν έχουν μεγάλη επίδραση στη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των λαγών που ζουν στην Ελλάδα και στη Βουλγαρία.

Τα αποτελέσματα της μελέτης των Mamuris et al. (2001) έδειξαν υψηλή ποικιλομορφία απλοτύπων του *Lepus europaeus* καθώς από τους 56 απλότυπους που προέκυψαν μέσω mtDNA-RFLPs οι 42 ήταν μοναδικοί μέσα και ανάμεσα σε πληθυσμούς από την κεντρική Ελλάδα. Επιπλέον μέσα από την μελέτη προέκυψε ότι οι λαγοί από την κεντρική Ελλάδα φαίνεται να είναι

υψηλά πολυμορφικοί και ότι η γενετική δομή των πληθυσμών τους έχουν επηρεαστεί από απελευθερώσεις εκτρεφόμενων λαγών από άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Σε μια άλλη μελέτη των Mamuris et al. (2002) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RAPD για να συγκριθούν οι ελληνικοί άγριοι πληθυσμοί με δείγματα λαγών από την Αυστρία, την Πολωνία, τη Γερμανία τη Γαλλία και τη Βουλγαρία. Τα αποτελέσματα της μελέτης συνιστούνται στο ότι οι απελευθερώσεις μπορεί να έχουν αρχίσει να επηρεάζουν τη γενετική δομή των ελληνικών πληθυσμών.

Παρακάτω αναφέρεται η υπάρχουσα κατανομή και διασπορά των λαγών στην Ιταλία. Στην Ιταλία υπάρχουν τέσσερα είδη λαγών:

1. Ο *L. timidus* που είναι διεσπαρμένος στις Άλπεις, με σχετικά σταθερούς πληθυσμούς.
2. Το είδος *L. capensis mediterraneus* ο οποίος έφτασε στη Σαρδηνία από ανθρώπους κατά τη διάρκεια ιστορικών περιόδων, από πληθυσμούς του είδους *L. capensis* ίσως εντοπισμένους στη Βόρεια Αφρική και στη Μέση Ανατολή.
3. Το είδος *L. corsicanus* είναι ένα είδος που εντοπίζεται στην νότια-κεντρική Ιταλία και Σικελία και τα οποία για πρώτη φορά περιγράφηκε και κατηγοριοποιήθηκε ως είδος το 1898.
4. Το είδος *L. europaeus* ο οποίος αρχικά ήταν διεσπαρμένος στην Βόρεια και κεντρική Ιταλία με το αυτόχθονο είδος *L. e. meridei*, το οποίο πιθανόν να αντικαταστάθηκε από τον εισερχόμενο καφέ ευρωπαϊκό λαγό.

Οι ανθρώπινες δραστηριότητες επηρέασαν πολύ την παρουσία, την κατανομή και την πυκνότητα των λαγών στην Ιταλία. Το είδος *L. corsicanus* ήταν το μόνο είδος παρόν στην κεντρική και νότια Ιταλία, όπου το υπερβολικό κυνήγι και η μαζική εισροή του καφέ ευρωπαϊκού λαγού, πιθανόν να προκαλέσουν μία αξιοσημείωτη μείωση του μεγέθους του πληθυσμού και της κατανομής του στις διάφορες τοποθεσίες. Παρόλη την έντονη απελευθέρωση καφέ λαγών κατά την διάρκεια των τελευταίων 20 χρόνων, έρευνες έχουν δείξει ότι οι λαγοί στη Σικελία ανήκουν μόνο στο είδος *L. corsicanus*. Φαίνεται λοιπόν ότι οι περιέργες συνθήκες της Σικελίας είναι ακατάλληλες για τους καφέ

λαγούς και ότι αυτός δεν μπορεί να επιζήσει σε κλιματολογικές συνθήκες Μεσογειακού τύπου καθώς και στα καταφύγια του νησιού.

Σύμφωνα με τη μελέτη των Pierpaoli et al. (1999) οι φυλογενετικές αναλύσεις με τη χρήση νουκλεοδικών αλληλουχιών του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) και του κυτοχρώματος *b* υποδεικνύουν ότι ο *L. corsicanus* και ο *L. europaeus* δεν είναι στενά σχετιζόμενα είδη, αλλά ανήκουν σε διαφορετικές εξελικτικές διαδικασίες καταγωγής, και διασκορπίστηκαν στη Δυτική Ευρώπη σε διαφορετικές περιόδους. Ο *L. corsicanus* πιθανόν διαφοροποιήθηκε σε απομονωμένα καταφύγια στη Νότια Ιταλία κατά τη διάρκεια του τελευταίου παγετώνα. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Pierpaoli et al. (2003) συγκρίθηκαν διάφορα είδη λαγών του γένους *Lepus* από την Ιταλία και από την Ευρώπη για να εκτιμηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις του *L. corsicanus*. Τα αποτελέσματα της μελέτης προτείνουν την ύπαρξη δυο διακριτών ομάδων όπου ο *L. corsicanus* ανήκει στην εξελικτική γραμμή που περιλαμβάνει είδη που κατάγονται από ένα καταφύγιο της νότιας Ευρώπης πριν τον αποικισμό από τον *L. europaeus*.

Οι κλιματολογικές συνθήκες κατά την διάρκεια των χρόνων επηρέασαν ολόκληρη την Ευρώπη. Ιδιαίτερα η βόρεια Ευρώπη και συγκεκριμένα η Σκανδιναβία επανειλημμένα επηρεάστηκε από παγετώνες κατά το Πλειστόκαινο. Ο τελευταίος παγετώνας είχε διάρκεια περίπου 80.000 χρόνια. Οι πρώτες περιοχές γης στην σκανδιναβική χερσόνησο αποκαλύφθηκαν πριν 13.500 χρόνια. Για αρκετές χιλιάδες χρόνια, η Σκανδιναβία ήταν συνδεδεμένη με τη Δανία και με την ηπειρωτική Ευρώπη με μια μεγάλη γέφυρα (Bjork,1995) η οποία επέτρεπε τον αποικισμό της Σκανδιναβίας από το νότο. Αργότερα όσο ο πάγος έλιωνε στη βόρεια Σκανδιναβία ήταν πιθανός ο αποικισμός από τα βορειοανατολικά διαμέσου της Ρωσίας και της Φιλανδίας. Αυτές οι εναλλακτικές πορείες αποικισμού στη Σκανδιναβία είχαν ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μίας βόρειας και μία νότιας μορφής αρκετών ειδών.

Οι Thulin et al. (1997) πήραν ένα τμήμα της υψηλά ποικιλόμορφης περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA μήκους 400 ζευγών βάσεων και έκαναν sequencing σε 15 *L. timidus* και 2 *L. europaeus*. 3 από τους *L. timidus* της Σκανδιναβίας έδειξαν στενή συγγένεια με τους *L. timidus* από τη Σκοτία την

Ιρλανδία και τη Ρωσία αντίστοιχα. Οι Thulin et al. (1997) προτείνουν ότι η ποικιλότητα του mtDNA που παρατηρήθηκε ανάμεσα στους *L. timidus* της Σκανδιναβίας είναι εξαιτίας της διατήρησης παλιών mtDNA απλοτύπων που ήταν παρόντες σε ένα συνεχή πληθυσμό *L. timidus* κατά τους τελευταίους παγετώνες. Η παρατηρούμενη συγγένεια του mtDNA μεταξύ των *L. timidus* από τη Σκανδιναβία και από τη Σκοτία, Ιρλανδία και Ρωσία ίσως αντανάκλα τον μεταπαγετωνικό αποικισμό της σκανδιναβικής χερσονήσου και από το νότο και από τη βορειοανατολή.

Σε ένα από τα κράτη της σκανδιναβικής χερσονήσου, στη Σουηδία ο *L. europaeus* (Pallas 1778) εισήχθη από τη βόρεια Ευρώπη κατά το 19<sup>ο</sup> αιώνα. Η προέλευση του *Lepus europaeus* της Σουηδίας είναι από τη Δανία και τη Γερμανία αλλά και από μέρη της βόρειας και κεντρικής Ευρώπης, όπως η Αυστρία, η πρώην Τσεχοσλοβακία, η Γαλλία, η Ουγγαρία και η Πολωνία (Lönneberg 1905). Σήμερα ο καφέ ευρωπαϊκός λαγός κατοικεί στη νότια και κεντρική Σουηδία προτιμώντας περιοχές αγροκαλλιέργειας (Frylestam 1990). Οι Thulin et al. (2002) υποστηρίζουν ότι ο υβριδισμός μεταξύ του εισαγόμενου είδους *L. europaeus* κατά τις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα στη Σουηδία (Lönneberg, 1905) και του φυσικού βουνίσσιου λαγού *L. timidus* ευθύνεται για τη μεταφορά του mtDNA από τους βουνίσσιους θηλυκούς προς τους εισαγόμενους αρσενικούς. Η θεωρία αυτή είναι γνωστή ως η θεωρία της μονοκατευθυντήριας εισδοχής. Επιπλέον η μελέτη του Thulin et al. (2002) επιβεβαίωσε την υπόθεση των Grant & Grant (1997) ότι ο μονοκατευθυντήριος υβριδισμός συμβαίνει μεταξύ των θηλυκών στα μικρότερα είδη (*L. timidus*) και των αρσενικών στα μεγαλύτερα είδη (*Lepus europaeus*).

Στην Ιβηρική χερσόνησο η υπάρχουσα κατανομή και η ταξινόμηση των λαγών είναι πιο περίπλοκη. Ο Ellerman και Morrison-Scott (1951) δέχτηκαν τα είδη *L. europaeus* και *L. capensis* στην Ιβηρική χερσόνησο όπου το είδος *L. granatensis* ήταν μια μορφή του *L. capensis*. Ο Flux και Angermann (1990) αποδέχθηκαν την άποψη του Ellerman και Morrison-Scott (1951) και θεώρησαν τον Ιβηρικό λαγό ως ένα υποείδος του *L. capensis granatensis*. Ένα τρίτο είδος λαγού του *L. castroviejo* περιγράφηκε από τον Palacios (1976) στη Βορειοδυτική Ισπανία. Οι Alves et al. (2003) υποστήριξαν πως

υπάρχουν τρία είδη λαγών στην Ιβηρική χερσόνησο, το *L. granatensis*, το *L. castroviejo* και το *L. europaeus* τα οποία είναι γενετικά διακριτά το ένα με το άλλο.

Αν και έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη τριών ειδών λαγών στην Ιβηρική χερσόνησο, χρησιμοποιώντας βιομετρικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά, γεωγραφικές παραμέτρους (Palacios 1976) καθώς και πρωτεϊνική ηλεκτροφόρηση (Bonhomme et al 1986) οι φυλογενετικές σχέσεις τους δεν είναι γνωστές. Οι Ιβηρικοί λαγοί έχουν παραπατρική κατανομή, και δύο από αυτούς, το *L. castroviejo* και το *L. granatensis*, είναι περιορισμένοι στην Ιβηρική χερσόνησο. Τέτοιος ενδημισμός είναι χαρακτηριστικό της Ιβηρικής χερσονήσου από την εποχή Μειόκαινου (López – Martinez 1989).

## **VII. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Η φυλογεωγραφική δομή του καφέ ευρωπαϊκού λαγού παραμένει άγνωστη άσχετα με τα διαφορετικά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας που ανιχνεύτηκαν από μερικές μελέτες στην Ευρώπη (Hartl et al. 1993, Perez-Suarez et al. 1994, Thulin et al. 1997, Pierpaoli et al. 1999, Suchentruck et al. 2000b, Mamuris et al. 2001, Suchentruck et al. 2001). Το πρότυπο της παρούσας κατανομής δείχνει ότι ο *L. europaeus* διαχωρίστηκε κάτω από την επίδραση των κύκλων των παγετώνων κατά το τελευταίο Πλειστόκαινο. Στην παρούσα εργασία πήραμε δείγματα λαγών από την Ελλάδα, την Τουρκία, το Ισραήλ και την κεντρική και βόρεια Ευρώπη (Γαλλία, Πολωνία, Ολλανδία, Αγγλία, Αυστρία και Γερμανία). Επιπλέον επιλέχθηκαν διάφορα είδη του γένους *Lepus* από τη βάση δεδομένων του διαδικτύου GenBank για τη χρήση τους στην μελέτη της μοριακής ανάλυσης αλλά και των φυλογενετικών σχέσεων του γένους *Lepus*.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### I. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Οι ιστοί των 59 καφέ λαγών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία συλλέχθηκαν με τη βοήθεια των τοπικών κυνηγετικών συλλόγων.

Τα δείγματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3 Δείγματα 60 λαγών, τοποθεσία προέλευσης, ειδικός αριθμός που χαρακτηρίζει κάθε δείγμα**

Αριθμός δείγματος	Τοποθεσία	Ειδικός αριθμός
1	France	10
2	Austria	5.013
3	U.K.	5.20
4	U.K.	SL.8
5	Holland	3
6	Poland	07.29
7	Poland	07.27
8	N. Germany	3
9	Northern Israel	1
10	Northern Israel	2
11	Northern Israel	3
12	Northern Israel	4
13	Northern Israel	5
14	Northern Israel	6
15	Northern Israel	7
16	Northern Israel	8
17	Northern Israel	9
18	Northern Israel	10
19	Southern Israel	1
20	Southern Israel	2
21	Southern Israel	3
22	Southern Israel	4

23	Southern Israel	5
24	Southern Israel	6
25	Turkey	1
26	Turkey	2
27	Turkey	3
28	Turkey	4
29	Turkey	5
30	Turkey	6
31	Turkey	7
32	Turkey	8
33	Turkey	9
34	Turkey	10
35	Turkey	11
36	Turkey	12
37	Turkey	13
38	Turkey	14
39	Turkey	15
40	Παρθένο δάσος Δράμας	1
41	Θράκη Ν. Έβρου	5
42	Θράκη Ν. Έβρου	10
43	Θράκη Ν. Έβρου	16
44	Πύρρα Τρικάλων	42
45	Φάρσαλα Τρικάλων	3
46	Δέση Τρικάλων	1
47	Κωφοί Αλμυρού	1
48	Βελεστίνο	8
49	Ελαφότοπος Ιωαννίνων	1
50	Ιωάννινα	27
51	Ιωάννινα	10
52	Αυγό Ιωαννίνων	1
53	Βραδέτο Ιωαννίνων	10

54	Ολυμπιάδα Λάρισας	1
55	Τσαριτσάνη Λάρισας	2
56	Σπηλιά Λάρισας	31
57	Γόννοι Λάρισας	1
58	Ορεινή Σερρών	1
59	Λουτράκι	12

## **II. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA**

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού DNA σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

### Διαλύματα

- Extraction buffer (100mL)-αποθήκευση στους 4 °C
  - I. 2 mL Tris-HCL 2M pH=8,5
  - II. 2 mL EDTA 0,5M
  - III. 4 mL NaCl 5M
  - IV. 92 mL d.d H<sub>2</sub>O
- Digestion buffer (20 mL)- αποθήκευση στους 4 °C
  - I. 18 mL extraction buffer
  - II. 2 mL SDS 10%
  - III. 100 μl διαλύματος proteinase K (100mg/ml)
- Ιστός: 50-100 mg μύς, συκώτι, νεφρός, καρδιά κτλ. (Να μη χρησιμοποιείται το συκώτι εάν υπάρχει άλλος ιστός)
- Διαδικασία:
  1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα eppendorf του 1.5 mL και προσθέτουμε 1 mL extraction buffer
  2. Αναδεύουμε έντονα (vortex) και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος eppendorf) στις 10.000 στροφές για 2 min
  3. Αδειάζουμε το υπερκείμενο προσεκτικά προσθέτουμε ξανά 1 mL extraction buffer και ακολουθούμε το προηγούμενο στάδιο ξανά



4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά, προσθέτουμε 400  $\mu\text{l}$  Digestion buffer το οποίο προηγουμένως έχουμε ανακινήσει αρκετά
5. Αναδεύουμε έντονα (vortex) ώστε να αναμιχθεί ο ιστός-ίζημα με το διάλυμα
6. Τοποθετούμε τα δείγματα στο μικρό υδατόλουτρο (Medingen) με τη βοήθεια λεπτού φελιζόλ ώστε το υγρό τμήμα των δειγμάτων να είναι βυθισμένο στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 2 ώρες
7. Κάθε μισή ώρα ανακινούμε τα δείγματα ώστε να επαναιωρηθεί το ίζημα
8. Προσθέτουμε 150 $\mu\text{l}$  οξικού Na ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  3M pH=5,2)
9. Αναδεύουμε έντονα και τοποθετούμε τα δείγματα στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 15 min
10. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 10 min στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
11. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σωλήνα erpendorf
12. Προσθέτουμε 1 mL εξισορροπημένης φαινόλης
13. Ανάδευση έντονα στο vortex
14. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 20 min στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
15. Προσεκτική μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf
16. Προσθήκη 0.5 mL φαινόλης και 0.5 mL χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V). Μικρή ανάδευση στο vortex.
17. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5 min στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
18. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf
19. Προσθήκη 1mL χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης(24V:1V).
20. Μικρή ανάδευση στο vortex.
21. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5 min στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
22. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf
23. Προσθήκη 1 mL ισοπροπανόλης (2-προπανόλη)
24. Μικρή ανάδευση στο vortex και παραμονή των δειγμάτων για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου
25. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 20 min στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

26. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας ταυτόχρονα το ίζημα στο κάτω μέρος του erpendorf ώστε αυτό να μην μετακινηθεί
27. Προσθέτουμε 1 mL παγωμένης αλκοόλης (αιθανόλη) 70%
28. Ανακινούμε τα δείγματα με το χέρι
29. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5 min στους 4 °C
30. Απομακρύνουμε πολύ προσεκτικά το υπερκείμενο παρατηρώντας το ίζημα
31. Στεγνώνουμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37 °C για +/- 1 ώρα παρατηρώντας να μην υπάρχουν μικροσταγονίδια στα τοιχώματα των σωλήνων
32. Διαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100 μl d.d.H<sub>2</sub>O
33. Συντηρείται στο ψυγείο στους 4°C όταν χρησιμοποιείται ή στους -20 °C για αποθήκευση

### **III. ΕΝΙΣΧΥΣΗ DNA ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ PCR**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος με την οποία μια ελάχιστη ποσότητα δείγματος DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί *in vitro* και να δώσει πολυάριθμες πανομοιότητες αλληλουχίες. Πρόκειται για μια τεχνική γρήγορη, εύκολη και αυτοματοποιημένη. Τη μέθοδο ανέπτυξε ο βιοχημικός Kary Mullis (στον οποίο απονεμήθηκε το βραβείο Νομπέλ το 1984) και στηρίζεται στη βιολογική δράση DNA πολυμερασών που απομονώθηκαν από θερμόφιλα βακτήρια σε υψηλές θερμοκρασίες.

Οι περισσότερες DNA πολυμεράσες είναι δραστικές σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σ' αυτές όμως τις συνθήκες το DNA είναι σφιχτά περιελιγμένο και έτσι η δράση τους δεν επιδρά στα περισσότερα τμήματα του μορίου. Οι θερμόφιλες DNA πολυμεράσες δρουν ακόμα και σε 100°C, δηλαδή σε θερμοκρασίες που το DNA αποδιατάσσεται. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR ονομάζεται Taq polymerase και δανείστηκε το όνομα από το βακτήριο από το οποίο προέρχεται: *Thermus aquaticus*.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

- Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο μορίου-μήτρας
- Ενός εκκινητή (primer), δηλαδή ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (15-30kb)
- Της ειδικής Taq DNA πολυμεράσης
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Διαλύματος  $MgCl_2$
- Ρυθμιστικού διαλύματος για την Taq πολυμεράση

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους, ενώ κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε στάδια φάσεις και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

Τα στάδια διακρίνονται:

### **1<sup>ο</sup> στάδιο**

**Μετουσίωση–αποδιάταξη (denaturation):** Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (ssDNA-single stranded DNA).

### **2<sup>ο</sup> στάδιο**

**Υβριδισμός–πρόσδεση εκκινητών επί συμπληρωματικών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου (annealing):** Στη συνέχεια μειώνεται η θερμοκρασία και προστίθενται οι εκκινητές, οι οποίοι συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου.

### **3<sup>ο</sup> στάδιο**

**Επέκταση (extension)-σύνθεση πολυμερισμού (polymerization):** Στο 3<sup>ο</sup> στάδιο η παρουσία της Taq πολυμεράσης και των dNTPs συντελεί στη σύνθεση DNA με το διπλασιασμό του DNA-στόχου.

Το απομονωμένο DNA των 59 δειγμάτων, το οποίο εμπεριέχει ολόκληρη την περιοχή έλεγχου (CR-I), ενισχύθηκε με την τεχνική PCR (Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές LepCyb2L (5'-GAAACTGGCTCCAATAACCC-3') και LepD2H (5'-ATTTAAGAGGAACGTGTGGG-3') (Pierpaoli et al. 1999).

Το ζεύγος αυτό των εκκινητών πολλαπλασιάζει μια περιοχή του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος *b* μήκους 583 bp.

Οι συνθήκες της PCR στην παρούσα εργασία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4 Συνθήκες της PCR

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	
Αρχική αποδιάταξη (Denaturation)	95 °C	4 min	
Αποδιάταξη (Denaturation)	95 °C	40 sec	Αριθμός κύκλων 35
Συγκόλληση Primer (Annealing)	55 °C	50 sec	
Επέκταση (Extension)	72 °C	1.5 min	
Τελική επέκταση	72 °C	10 min	

#### **IV. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των μακρομορίων με βάση το φορτίο και το μοριακό τους βάρος. Συνίσταται στην απλή αρχή ότι μεταξύ αρνητικού και θετικού πόλου διέρχεται ρεύμα και υπάρχει μια αντίσταση η οποία είναι το πήκτωμα. Επιπλέον όσο πιο πυκνό είναι το διάλυμα της αгарόζης τόσο πιο αργή είναι η διέλευση το ρεύματος μέσα από το πήκτωμα.

Για τον έλεγχο της επιτυχία των προϊόντων PCR παρασκευάστηκε gel αгарόζης 2% σύμφωνα με τα παρακάτω συστατικά:

- 30 mL 1ΧΤΑΕ
- 0,6 gr αгарόζης
- 2,5 μl βρωμιούχο αιθίδιο

Το διάλυμα TAE που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση είναι ένα μίγμα των εξής:

1. Tris ένα χημικό διάλυμα που ρυθμίζει το pH 2. EDTA το οποίο δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με κατιόντα μαγνησίου παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση των νουκλεασών 3. οξικό οξύ.

Η τοποθέτηση 2 μl χρωστικής (που περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και Tris) στα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση έχει τον εξής σκοπό:

1. Χωρίς την προσθήκη της χρωστικής θα γινόταν διάχυση και δεν θα διακρίνονταν η μπάντα
2. Η γλυκερόλη συμβάλλει στην καθίζηση του μίγματος του DNA στα πηγαδάκια της συσκευής της ηλεκτροφόρησης

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης γινόταν ανίχνευση των ατόμων που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα με τη βοήθεια του UV. Στα θετικά άτομα ακολούθως έγινε καθαρισμός του DNA από το διάλυμα της PCR.

## **V. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ**

Ο καθαρισμός του DNA από διάλυμα της PCR έγινε με βάση το GFX PCR DNA και Gel Band Purification Kit της Amersham Biosciences. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

1. Τοποθέτηση μιας στήλης GFX σε ένα συλλεκτικό σωλήνα για κάθε απομόνωση
2. Προσθήκη 500 μl buffer στη στήλη GFX
3. Μεταφορά του DNA διαλύματος στη στήλη
4. Πιπετάρισμα πάνω από 4-6 φορές
5. Φυγοκέντρηση για 30 sec
6. Άδειασμα του κάτω τμήματος και επανατοποθέτηση της στήλης
7. Προσθήκη 500 μl wash buffer. Φυγοκέντρηση για 30 sec
8. Μεταφορά μόνο της στήλης σε νέο σωλήνα eppendorf
9. Προσθήκη 50 μl απεσταγμένου H<sub>2</sub>O
10. Αναμονή για 1 min
11. Φυγοκέντρηση για 1 min

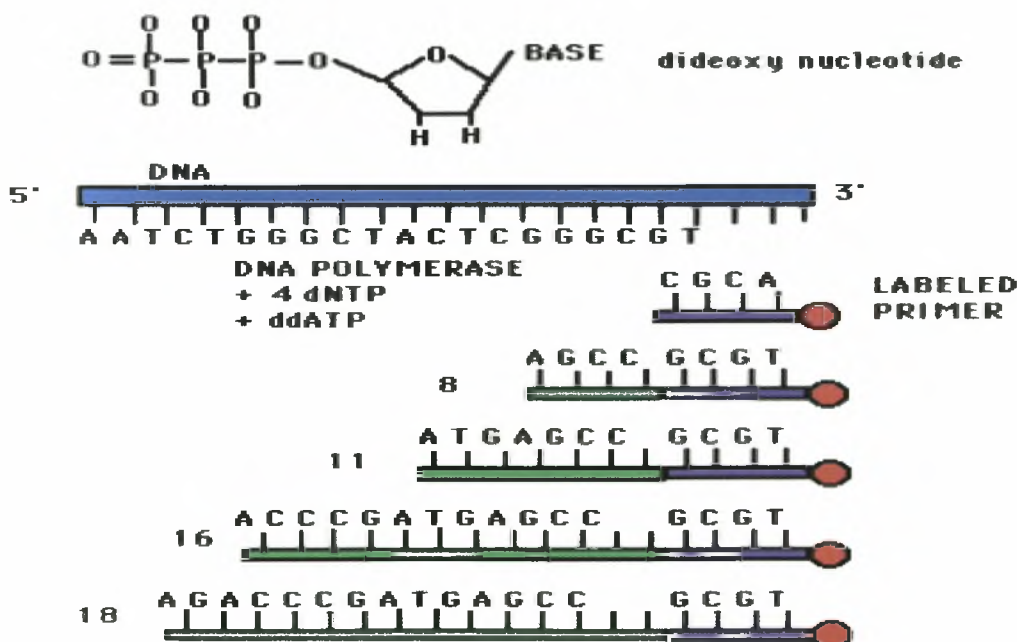
## VI. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA

### (SEQUENCING)

Εφόσον τα 59 προϊόντα PCR των λαγών καθαρίστηκαν, στάλθηκαν για προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA στην εταιρεία MWG.

Η ακριβής νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός προϊόντος PCR ή ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα. Η πιο πολυχρησιμοποιημένη τεχνική, η μέθοδος Sanger αποτελεί μια ενζυμική προσέγγιση (Sanger et al. 1977). Στη μέθοδο Sanger ακολουθούνται τα εξής βήματα: χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή ομόλογο προς το ένα άκρο της αλυσίδας του DNA, της οποίας πρόκειται να καθορισθεί η αλληλουχία, συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Μικρή ποσότητα ενός από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) συμπεριλαμβάνεται σε καθεμία από τέσσερις τέτοιες διαφορετικές αντιδράσεις. Όταν σε μια αυξανόμενη αλυσίδα ενσωματωθεί ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο, σταματά η σύνθεση αυτού του μορίου, διότι δεν υπάρχει πλέον ελεύθερο 3' υδροξύλιο.

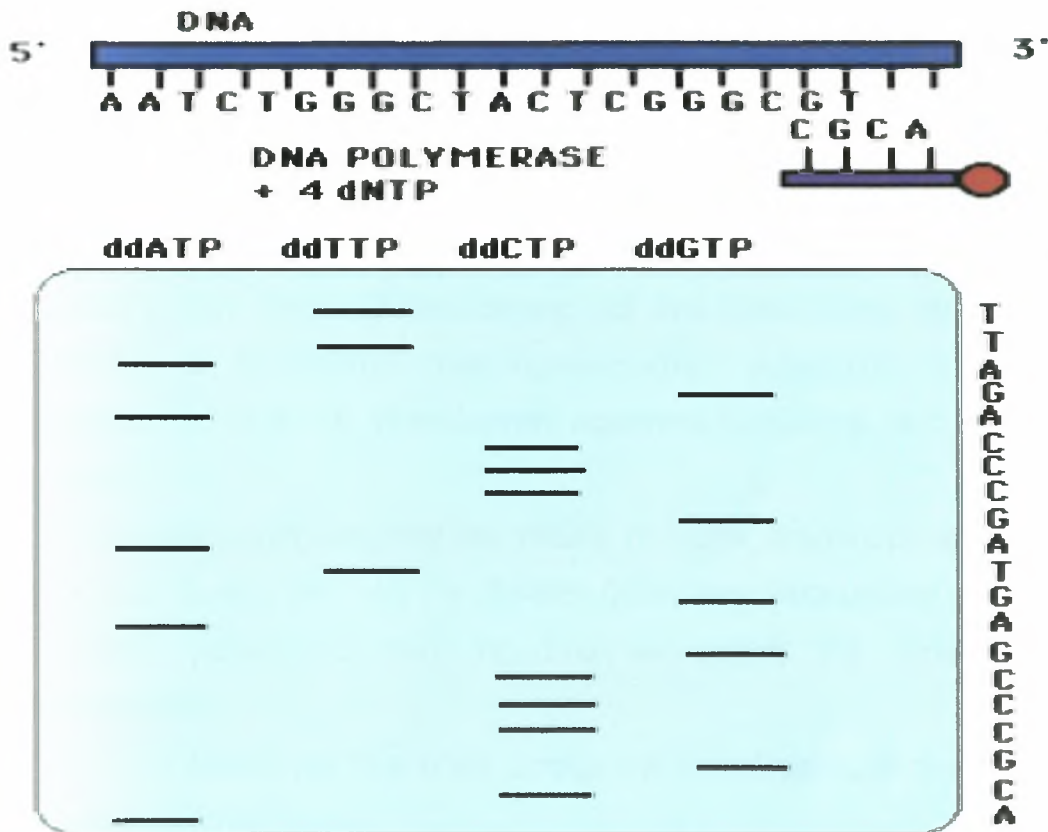
Εικόνα 10 Δομή 1 διδεοξυνουκλεοτιδίου και τα συστατικά μιας Sanger αντίδρασης



Ο διαχωρισμός των σημασμένων τμημάτων DNA που προκύπτουν σε τέσσερις διαφορετικές θέσεις ενός ηλεκτροφορητικού πηκτώματος

πολυακρυλαμιδίου και στη συνέχεια η έκθεση σε ακτινογραφικό φιλμ, ή η ανάλυση φθορισμού επιτρέπει την απευθείας ανάγνωση της αλληλουχίας.

Εικόνα 11 Sequencing Gel ακρυλαμίδης



Αυτοματοποιημένοι αναλυτές αλληλουχιών DNA μπορούν να εκτελέσουν σήμερα αυτή τη διαδικασία με μεγάλη ταχύτητα και ταυτόχρονα για ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Η μήτρα DNA υποβάλλεται σε μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων και 'φορτώνεται' στον αναλυτή της αλληλουχίας, ο οποίος διαχωρίζει και αναλύει αυτόματα τα τμήματα του DNA και αποθηκεύει την τελική αλληλουχία του DNA σε ένα αρχείο στο σκληρό δίσκο του ηλεκτρονικού υπολογιστή (Gelehrter et al. 2003). Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο αυτοματοποιημένος αναλυτής που χρησιμοποίησε η εταιρεία ήταν ο ABI capillary sequencer.

## VII. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool)

**Blastn:** Συγκρίνει μια νουκλεοτιδική ακολουθία με μια βάση ακολουθιών νουκλεοτιδίων.

✓ High-scoring Segment Pair (HSP): δύο αποσπάσματα ακολουθιών τυχαίου αλλά ίσου μήκους, με ομοπαράθεση, της οποίας ο βαθμός ξεπερνά ένα καθορισμένο κατώφλι. Έτσι ένα σύνολο από HSPs καθορίζεται από δύο ακολουθίες, έναν πίνακα βαθμολόγησης και ένα βαθμολογικό κατώφλι. Η ευαισθησία και η ταχύτητα των προγραμμάτων ρυθμίζονται μέσω των παραμέτρων  $W$ ,  $T$  και  $X$ . Η επιλεκτική ικανότητα ρυθμίζεται με τον βαθμό κατωφλίου.

✓ Maximal-scoring Segment Pair (MSP): το ζεύγος αποσπασμάτων με τον μέγιστο βαθμό απ' όλα τα δυνατά ζεύγη που προκύπτουν από δύο ακολουθίες. Καθορίζεται από τις δύο ακολουθίες και έναν πίνακα βαθμολόγησης.

1.Αναζήτηση των HSPs μεταξύ της εξεταζόμενης ακολουθίας και μιας ακολουθίας της βάσης.

2.Υπολογισμός της στατιστικής σημαντικότητας κάθε συμφωνίας που εντοπίσθηκε.

3.Αναφορά μόνο στις συμφωνίες που υπερβαίνουν ένα επιλεγμένο από τον χρήστη κατώφλι σημαντικότητας (παράμετρος  $E$ ).

Η εύρεση των HSPs αρχίζει με τον εντοπισμό σύντομων λέξεων μήκους  $W$  στην εξεταζόμενη ακολουθία οι οποίες ικανοποιούν κάποιο θετικό κατώφλι βαθμολόγησης  $T$ , φερόμενες σε ομοπαράθεση με μια λέξη ίσου μήκους μιας ακολουθίας της βάσης. Το  $T$  αναφέρεται ως «the neighbourhood word score threshold».

Οι επιτυχημένες λέξεις επεκτείνονται και προς τις δύο κατευθύνσεις, για όσο ακόμη ο αθροιστικός βαθμός της ομοπαράθεσης βελτιώνεται.

Η επέκταση σταματά, όταν:



- ο αθροιστικός βαθμός μειώνεται κατά το ποσό X από την μέγιστη επιτευχθείσα τιμή,
- ο αθροιστικός βαθμός γίνει μηδέν ή χαμηλότερος,
- ή όταν φθάσουμε στην άκρη μιας από τις ακολουθίες.

Η αναζήτηση ομοιοτήτων μεταξύ ακολουθιών ονομάζεται ομοπαράθεση ή στοίχιση (Alignment). Στην πολλαπλή ομοπαράθεση ακολουθιών ο στόχος είναι να στοιχηθούν τρεις ή περισσότερες ακολουθίες έτσι ώστε ο μέγιστος δυνατός αριθμός χαρακτήρων να βρίσκεται στην ίδια στήλη. Το μειονέκτημα με την πολλαπλή ομοπαράθεση είναι ότι η σύγκριση πολλαπλών ακολουθιών αυξάνει τους συνδυασμούς συμφωνιών, ασυμφωνιών και κενών.

Υπάρχουν τέσσερις μέθοδοι πολλαπλής ομοπαράθεσης: 1. Προοδευτική ομοπαράθεση (Progressive Alignment) 2. Επαναληπτική ομοπαράθεση (Iterative Alignment) 3. Dynamic Programming 4. Statistical Modeling.

Το ClustalW είναι πρόγραμμα προοδευτικής ομοπαράθεσης.

#### □ **CLUSTAL X (1.8)**

Το Clustal X είναι μια επιφάνεια εργασίας του προγράμματος πολλαπλής ομοπαράθεσης ακολουθιών ClustalW. Εκτελεί ομοπαράθεσεις κατά ζεύγη σε όλες τις ακολουθίες και αναλύει τα αποτελέσματα. Ένα πολύπλευρο χρωματιστό πρόγραμμα είναι ενσωματωμένο το οποίο επιτρέπει την υπογράμμιση συντηρημένων χαρακτηριστικών στην ομοπαράθεση. Ο κατάλογος επιλογών επιτρέπει την επιλογή πολλών δυνατοτήτων όπως την αντιγραφή και επικόλληση ακολουθιών για την αλλαγή της σειράς της ομοπαράθεσης.

Εισαγωγή ακολουθιών: οι ακολουθίες εισάγονται στο πρόγραμμα μέσω της επιλογής «FILE». Όλες οι ακολουθίες θα πρέπει να περιλαμβάνονται σε ένα αρχείο

Πολλαπλή ομοπαράθεση: για να πραγματοποιηθεί η πολλαπλή ομοπαράθεση αρχικά θα πρέπει να επιλεγεί το «MULTIPLE ALIGNMENT MODE». Οι πολλαπλές ομοπαράθεσεις γίνονται σε τρία στάδια:

1. Όλες οι ακολουθίες συγκρίνονται κατά ζεύγη

2. Κατασκευάζεται ένα δενδρόγραμμα (όπως ένα φυλογενετικό δένδρο) το οποίο περιγράφει την προσεγγιστική ομαδοποίηση των αλληλουχιών με βάση την ομοιότητα
3. Εκτελείται η τελική πολλαπλή ομοπαράθεση χρησιμοποιώντας το δενδρόγραμμα ως καθοδηγητή.

Τα τρία στάδια μπορούν αυτόματα να προσπελασθούν με την επιλογή «DO COMPLETE ALIGNMENT».

Φυλονετικά δένδρα: προτού προσδιοριστεί ένα δένδρο θα πρέπει να έχει επιτευχθεί ομοπαράθεση των ακολουθιών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί τη μέθοδο NJ (Neighbour Joining) των Saitou και Nei. Πρώτα υπολογίζονται οι αποστάσεις (ποσοστιαία ποικιλότητα) μεταξύ όλων των ζευγών ακολουθιών της πολλαπλής ομοπαράθεσης και δεύτερον εφαρμόζεται η μέθοδος NJ για τον πίνακα απόστασης.

#### □ **TreeView**

Το TreeView είναι ένα πρόγραμμα οπτικοποίησης των φυλογενετικών δένδρων το οποίο γράφτηκε από τον Roderic D.M. Page. Προηγούμενες εκδόσεις του BioEdit εμπεριείχαν μια εκτελέσιμη κατανομή του TreeView στον φάκελο apps. Μετά την απαίτηση του συγγραφέα η εγκατάσταση ολόκληρου του TreeView διανέμεται με το BioEdit.

#### □ **PHYLIP**

Το στατιστικό πακέτο PHYLIP (PHYLogeny Inference Package, Version 3.6b, January 2004) γράφτηκε από τον Joseph Felsenstein και αποτελείται από 35 προγράμματα. Επιπλέον υπάρχουν αρχεία για ομάδες προγραμμάτων που περιλαμβάνουν προγράμματα μοριακών αλληλουχιών (π.χ. DNADIST, SEQBOOT), προγράμματα πινάκων απόστασης (π.χ. NEIGHBOR), προγράμματα για συχνότητες γονιδίων και συνεχών χαρακτήρων (π.χ. GENDIST), προγράμματα διακριτών χαρακτήρων (π.χ. PARS) και προγράμματα σχεδιασμού δένδρων (π.χ. CONSENSE). Παρακάτω αναφέρονται τα

προγράμματα του PHYLIP που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

## 1. DNADIST

Το πρόγραμμα DNADIST χρησιμοποιεί τις νουκλεοτιδικές ακολουθίες για να υπολογιστεί ένας πίνακας απόστασης κάτω από τέσσερα διαφορετικά μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Επιπλέον υπάρχει δυνατότητα να υπολογισθεί ένας πίνακας ομοιότητας ανάμεσα στις νουκλεοτιδικές ακολουθίες. Η απόσταση για κάθε ζεύγος ειδών εκτιμά το συνολικό μήκος του κλάδου μεταξύ δυο ειδών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα προγράμματα FITCH, KITSCH και NEIGHBOR. Τα τέσσερα διαφορετικά μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης είναι τα εξής: 1. Jukes και Cantor (1969) 2. Kimura (1980) 3. το μοντέλο F84 και 4. το μοντέλο βασισμένο στην απόσταση LogDet. Όλα τα μοντέλα εκτός της απόστασης LogDet επιτρέπουν άνισους ρυθμούς υποκατάστασης σε διαφορετικές θέσεις.

## 2. SEQBOOT

Το SEQBOOT είναι ένα γενικό πρόγραμμα εκκίνησης και ένα εργαλείο για την εφαρμογή και ανάλυση των δεδομένων. Το στατιστικό πρόγραμμα SEQBOOT επιτρέπει την παραγωγή πολλαπλών αρχείων τα οποία είναι ξαναδοκιμασμένες εκδοχές των εισαγόμενων αρχείων. Επειδή σχεδόν όλα τα προγράμματα στο στατιστικό πακέτο PHYLIP μπορούν να αναλύσουν πολλαπλά δεδομένα, αυτό επιτρέπει οτιδήποτε σε αυτό το πακέτο να είναι αυτοδύναμο (bootstrap), αναδιπλωμένο (jackknife) ή μεταθετιμένο (permutation). Το SEQBOOT μπορεί να χειριστεί μοριακές αλληλουχίες, δυαδικούς χαρακτήρες, περιοριστικές θέσεις και συχνότητες γονιδίων. Για να εκτελεσθεί μια bootstrap δοκιμασία (ή jackknife ή permutation) θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τρία προγράμματα. Πρώτα θα πρέπει να τρέξουμε το SEQBOOT για να παρθούν τα αρχικά δεδομένα και να παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός αυτοδύναμων αρχείων (μεταξύ 100 και 1000 είναι συνήθως επαρκή). Κατόπιν θα πρέπει να βρεθεί η φυλογένεια για καθένα από αυτά χρησιμοποιώντας αρχικά το πρόγραμμα

NEIGHBOR και κατόπιν το CONSENSE το οποίο κατασκευάζει ένα φυλογενετικό δένδρο ως το αποτέλεσμα της ανάλυσης.

### 3. CONSENSE

Το πρόγραμμα CONSENSE διαβάζει ένα αρχείο με ευανάγνωστα (από τον υπολογιστή) δένδρα και αποτυπώνει ένα δένδρο κοινής ομολογίας. Προς το παρόν εκτελεί μια οικογένεια μεθόδων για το δένδρο κοινής ομολογίας οι οποίες καλούνται  $M_i$  μέθοδοι. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την αυστηρή ομολογία και την ομολογία του κανόνα πλειοψηφίας. Βασικά το δένδρο κοινής ομολογίας αποτελείται από μονοφυλετικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται όσον το δυνατόν συχνότερα μέσα στα δεδομένα. Εάν μια ομάδα βρίσκεται περισσότερο από το τμήμα  $I$  όλων των εισαγόμενων δένδρων θα εμφανίζεται σίγουρα στο δένδρο κοινής ομολογίας.

Το δένδρο που προκύπτει έχει σε κάθε διακλάδωση ένα αριθμό που δείχνει πόσες φορές η ομάδα, που αποτελείται από το είδος προς στα δεξιά (κατάγεται από) πού υπάρχει η διακλάδωση, λαμβάνει χώρα. Έτσι, εάν διαβαστούν 15 δένδρα και βρούμε ότι μια διακλάδωση έχει τον αριθμό 15, αυτή η ομάδα λαμβάνει χώρα σε όλα τα δένδρα.

### 4. NEIGHBOR

Το πρόγραμμα NEIGHBOR εφαρμόζει τη μέθοδο Neighbor-Joining των Saitou και Nei (1987) και τη μέθοδο ομαδοποίησης UPGMA. Αυτό το πρόγραμμα γράφτηκε από τη Mary Kuhner και τον Jon Yamato χρησιμοποιώντας μερικούς κώδικες από το πρόγραμμα FITCH. Ένα σημαντικό μέρος του κώδικα έχει μεταφραστεί από τον κώδικα FORTAN του προγράμματος Neighbor-Joining το οποίο γράφτηκε από τους Naruya Saitou και Li Jin, και χρησιμοποιείται με την άδεια των Saitou και Jin. Το πρόγραμμα NEIGHBOR κατασκευάζει ένα δένδρο από διαδοχικές ομαδοποίησης των γραμμών, θέτοντας το μήκος των κλάδων καθώς οι γραμμές ομαδοποιούνται. Το δένδρο που προκύπτει δεν μπορεί να αλλαχθεί περαιτέρω. Επιπλέον το δένδρο δεν λαμβάνει υπόψη κανένα μοριακό ρολόι, έτσι στην πραγματικότητα το δένδρο είναι άρριζο. Το πρόγραμμα δεν

μπορεί να εκτιμήσει ένα δένδρο το οποίο μπορεί να αλλαχθεί ούτε μπορεί να εμποδίσει τα μήκη των κλάδων να γίνουν αρνητικά.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά στη παρούσα εργασία, μετά την ανάλυση sequencing, ήταν διαθέσιμες οι ακολουθίες του cytb των 59 δειγμάτων (πίνακας 3). Με βάση τα άτομα των λαγών επιλέχθηκαν διάφορα είδη από τη GenBank μέσω του προγράμματος BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Τα άτομα που επιλέχθηκαν ανήκουν σε διαφορετικά είδη του γένους *Lepus* και ένα διαφορετικό είδος το *Oryctolagus cuniculus* το οποίο χρησιμοποιείται ως outgroup. Τα άτομα που προέρχονται από την GenBank και χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5 Επιλεγμένα άτομα από τη βάση δεδομένων GenBank

Αριθμός GenBank	Είδος	Τμήμα γονιδιώματος	Απλότυπος
AY596960	<i>Lepus capensis</i>	cytb	2
AJ279416	<i>Lepus capensis</i>	cytb	6
AY599078	<i>Lepus oiostolus</i>	cytb	1
AY599082	<i>Lepus oiostolus</i>	cytb	5
AJ279420	<i>Lepus sinensis</i>	cytb	3
AJ279421	<i>Lepus sinensis</i>	cytb	4
AF157464	<i>Lepus corsicanus</i>	cytb	1
AF157463	<i>Lepus corsicanus</i>	cytb	3
AJ279422	<i>Lepus mandshuricus</i>	cytb	1
AU650895	<i>Lepus mandshuricus</i>	cytb	2
AY599077	<i>Lepus hainanus</i>	cytb	-
AY649618	<i>Lepus tolai</i>	cytb	21
AY649614	<i>Lepus tolai</i>	cytb	17
AF157465	<i>Lepus granatensis</i>	cytb	-
AJ279402	<i>Lepus comus</i>	cytb	1

AJ279410	<i>Lepus comus</i>	cytb	9
AY599075	<i>Lepus timidus</i>	cytb	1
AY599076	<i>Lepus timidus</i>	cytb	2
AY292731	<i>Lepus californicus</i>	cytb	-
AY292729	<i>Lepus townsendii</i>	cytb	-
AB058616	<i>Lepus brachyurus</i>	cytb	-
AB058615	<i>Lepus brachyurus</i>	cytb	-
AY292733	<i>Lepus americanus</i>	cytb	-
AJ539432	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	cytb και partial tRNA-Thr	AO6bpsa

Ο όρος Maximum-scoring Segment Pair (MSP) φανερώνει την μεγαλύτερη ομοφωνία στην ερευνούμενη αλληλουχία. Το MSP φανέρωσε υψηλή ομοιότητα ανάμεσα στα αποτελέσματα του εργαστηρίου και στις εγγραφές των βάσεων δεδομένων (97%, 98%, 99% και 100%).

Το τμήμα του κυτοχρώματος b που αλληλουχήθηκε στα 59 άτομα των λαγών που είχαμε στη διάθεση μας έχει μήκος 583 bp. Οι αλληλουχίες των δειγμάτων μας κόπηκαν σε σχέση με τις αλληλουχίες αναφοράς που αποκτήσαμε από το διαδίκτυο στις 462 bp. Επομένως το τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου του κυτοχρώματος b που αναλύθηκε είχε μήκος 462 bp.

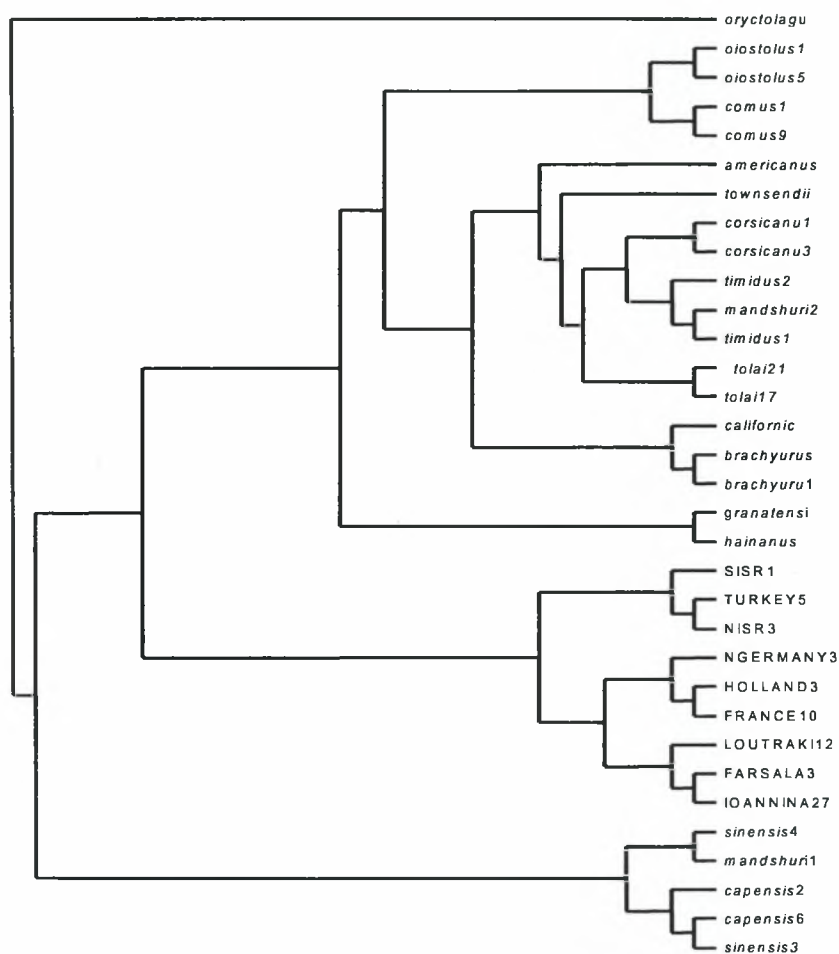
Οι αλληλουχίες των 83 ατόμων ομοπαράτέθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalX (Thompson et al. 1994).

Κατόπιν δημιουργήθηκαν δυο διαφορετικές ομάδες από τα 83 άτομα για να αναλυθούν τα αποτελέσματα μας με το στατιστικό πακέτο PHYLIP. Η πρώτη ομάδα A περιελάμβανε τα 24 είδη από το διαδίκτυο και τα άτομα: TURKEY5, NORTH ISRAEL3, SOUTH ISRAEL1, HOLLAND3, FRANCE10, N. GERMANY3, ΦΑΡΣΑΛΑ3, ΛΟΥΤΡΑΚΙ12, ΙΩΑΝΝΙΝΑ27 και η δεύτερη ομάδα B αποτελούνταν από τα άτομα του πίνακα 3 και δύο άτομα του είδους *Lepus timidus*.

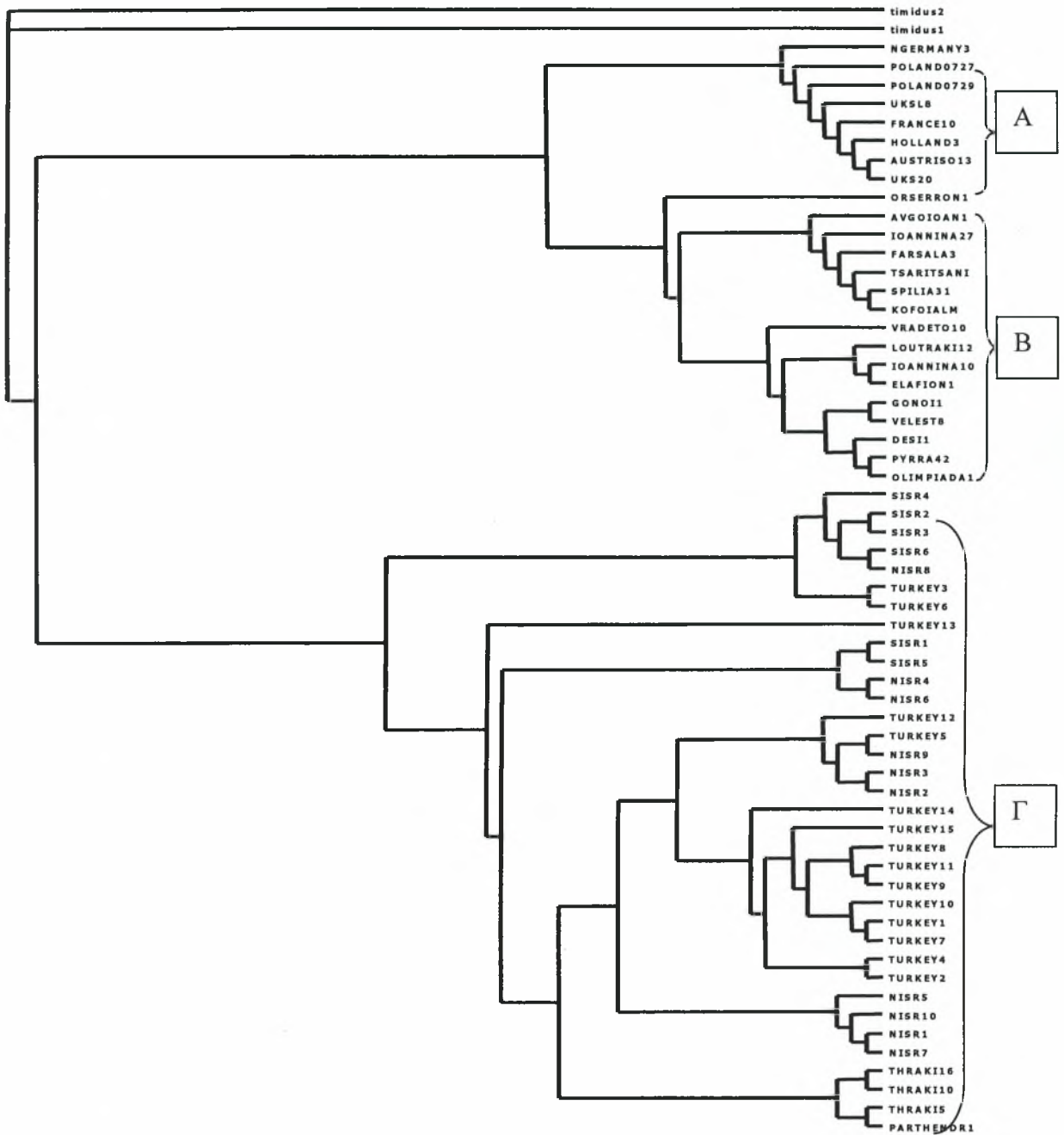
Με τη βοήθεια του προγράμματος DNADIST (Kimura 2-parameter) εξαγάγαμε τους πίνακες γενετικής απόστασης για τις δυο ομάδες.

Για να οπτικοποιηθούν οι γενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών των τριών ομάδων δημιουργήθηκαν NJ (Neighbour-joining) φυλογενετικά δέντρα, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα NEIGHBOUR του στατιστικού πακέτου PHYLIP.

#### Φυλογενετικό δένδρο ομάδας Α



Φυλογενετικό δένδρο ομάδας Β



Επεξηγήσεις:

A: ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΤΥΠΟΥ

B: ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ

Γ: ΑΝΑΤΟΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ

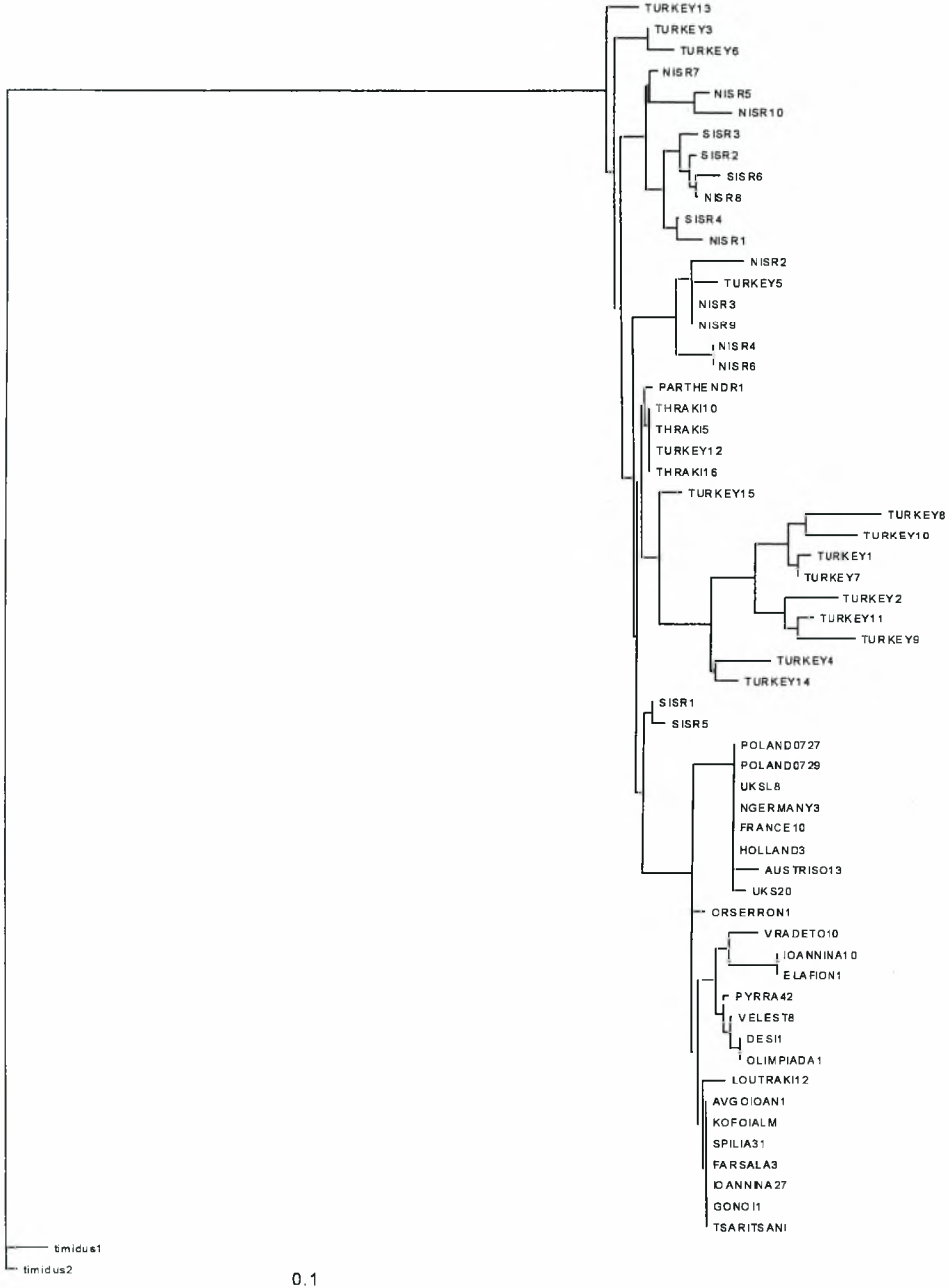
ΔΥΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ

ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΟΜΑΔΑ



Με την χρήση των προγραμμάτων SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR, κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δένδρο CONSENSUS για την δεύτερη ομάδα Β.

**Φυλογενετικό δένδρο CONSENSUS για την ομάδα Β**



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με τον όρο γενετική απόσταση νοείται οποιαδήποτε μέτρηση των γενετικών διαφορών μεταξύ πληθυσμών ή ειδών. Συνήθως η γενετική απόσταση βασίζεται σε διαφορές αλληλικών συχνοτήτων.

Από τις γενετικές αποστάσεις της ομάδας A προκύπτει ότι η μεγαλύτερη γενετική απόσταση είναι μεταξύ των ειδών *Oryctolagus cuniculus* και *Lepus mandshuricus* (0.244) ενώ η μικρότερη είναι μεταξύ των ειδών *Lepus sinensis* - *Lepus mandshuricus* και *Lepus mandshuricus* - *Lepus timidus* (0.004).

Από το φυλογενετικό δένδρο της ομάδας A παρατηρείται ότι το *Oryctolagus cuniculus* που χρησιμοποιείται ως εξωτερική ομάδα διαχωρίζεται πλήρως από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Lepus*. Τα είδη του γένους *Lepus* αρχικά διαχωρίζονται σε δυο ομάδες όπου η πρώτη περιλαμβάνει τα είδη *L. sinensis*, *L. mandshuricus* και *L. capensis* και η δεύτερη ομάδα τα υπόλοιπα είδη.

### Η φυλογεωγραφία και η ιστορία του πληθυσμού του καφέ ευρωπαϊκού λαγού

Έχοντας υπόψη τη κατανομή του καφέ ευρωπαϊκού λαγού, αυτό το είδος είναι πιθανόν να έχει κοινή βιογεωγραφική ιστορία με άλλα στοιχεία της χλωρίδας και της πανίδας της Ευρώπης τα οποία επηρεάστηκαν από τους παγετώνες του τελευταίου Πλειστόκαινου. Οι νότιες χερσόνησοι της Ιβηρίας, της Ιταλίας, των Βαλκανίων αλλά και της Μικράς Ασίας λειτούργησαν ως καταφύγια για διάφορα ευρωπαϊκά είδη κατά τον Πλειστόκαινο (e.g. Taberlet et al. 1998, Hewitt 1999).

Η παρούσα γενετική ποικιλότητα και τα φυλογεωγραφικά πρότυπα αρκετών ευρωπαϊκών ειδών ίσως προέκυψαν κατά την απομόνωση σε τέτοια καταφύγια κατά τη διάρκεια των διαδοχικών παγετωδών-μεσοπαγετωδών περιόδων και τα πρότυπα μετανάστευσης των ειδών ίσως προέκυψαν κατά τη διάρκεια εξάπλωσης τους από τα καταφύγια προς το βορρά.

Μετά την τελευταία παγετώδη περίοδο, οι πληθυσμοί των καταφυγίων επεκτάθηκαν στο βορρά αποικίζοντας την κεντρική και βόρεια Ευρώπη και σε αρκετές περιπτώσεις σχημάτιζαν ζώνες υβριδισμού στις οποίες έρχονταν σε επαφή. Διάφορα παραδείγματα των προτύπων του μεταπαγετωνικού

αποικισμού έχουν περιγραφεί (Hewitt 1999). Στις περισσότερες περιπτώσεις τα Βαλκάνια ήταν η πηγή των ευρωπαϊκών πληθυσμών επειδή δεν υπήρχαν φυσικά εμπόδια προς το βορρά σε αντίθεση με τις Άλπεις και τα Πυρηναία για τα ιταλικά και ιβηρικά καταφύγια αντίστοιχα.

Ο καφέ ευρωπαϊκός λαγός είναι το μοναδικό είδος λαγού στα Βαλκάνια και τη Μικρά Ασία, ενώ στην ιβηρική και στην ιταλική χερσόνησο υπάρχουν και άλλα είδη (*L. granatensis* και *L. castroviejo* στην Ιβηρία και ο *L. corsicanus* στην Ιταλία) τα οποία θα μπορούσαν να έχουν περιορίσει τα καταφύγια του καφέ ευρωπαϊκού λαγού εξαιτίας του συναγωνισμού. Η απουσία άλλων πιθανόν συναγωνιστικών ειδών στην νοτιοανατολική μεσόγειο μπορεί να έχει επιτρέψει μια μακροχρόνια παρουσία και εξέλιξη του καφέ ευρωπαϊκού λαγού και επιπλέον αυτή η περιοχή ίσως πραγματικά να ήταν ένα κύριο καταφύγιο κατά τη διάρκεια των παγετώνων. Αυτή η άποψη υποστηρίζεται επιπλέον και από απολιθώματα από το τελευταίο Πλειστόκαινο στην κεντρική Ελλάδα (Payne 1969, Chevallier 1973, Reisch 1976, Jullien 1981).

Από τα φυλογενετικά δένδρα Α και Β προκύπτει ότι τα άτομα του *Lepus europaeus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (πίνακας 3) ομαδοποιούνται σε τρεις τύπους: Α. Ανατολικού τύπου Β. Ελληνικού τύπου και Γ. Ευρωπαϊκού τύπου σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 6 Ελληνικού τύπου

Αριθμός δείγματος	Τοποθεσία	Ειδικός αριθμός
1	Πύρρα Τρικάλων	42
2	Φάρσαλα Τρικάλων	3
3	Δέση Τρικάλων	1
4	Κωφοί Αλμυρού	1
5	Βελεστίνο	8
6	Ελαφότοπος Ιωαννίνων	1
7	Ιωάννινα	27
8	Ιωάννινα	10

9	Αυγό Ιωαννίνων	1
10	Βραδέτο Ιωαννίνων	10
11	Ολυμπιάδα Λάρισας	1
12	Τσαριτσάνη Λάρισας	2
13	Σπηλιά Λάρισας	31
14	Γόννοι Λάρισας	1
15	Ορεινή Σερρών	1
16	Λουτράκι	12

**Πίνακας 7 Ευρωπαϊκού τύπου**

Αριθμός δείγματος	Τοποθεσία	Ειδικός αριθμός
1	France	10
2	Austria	5.013
3	U.K.	5.20
4	U.K.	SL.8
5	Holland	3
6	Poland	07.29
7	Poland	07.27
8	N. Germany	3

**Πίνακας 8 Ανατολικού τύπου**

Αριθμός δείγματος	Τοποθεσία	Ειδικός αριθμός
1	Northern Israel	1
2	Northern Israel	2
3	Northern Israel	3
4	Northern Israel	4
5	Northern Israel	5
6	Northern Israel	6
7	Northern Israel	7
8	Northern Israel	8
9	Northern Israel	9
10	Northern Israel	10
11	Southern Israel	1
12	Southern Israel	2
13	Southern Israel	3
14	Southern Israel	4
15	Southern Israel	5
16	Southern Israel	6
17	Turkey	1
18	Turkey	2
19	Turkey	3
20	Turkey	4
21	Turkey	5
22	Turkey	6
23	Turkey	7
24	Turkey	8
25	Turkey	9
26	Turkey	10
27	Turkey	11
28	Turkey	12
29	Turkey	13
30	Turkey	14
31	Turkey	15
32	Παρθένο δάσος Δράμας	1
33	Θράκη Ν. Έβρου	5
34	Θράκη Ν. Έβρου	10
35	Θράκη Ν. Έβρου	16

Αρχικά από το φυλογενετικό δένδρο της ομάδας B παρατηρούμε έναν σαφή διαχωρισμό μεταξύ του *L. europaeus* και του *L. timidus*. Τα δυο αυτά είδη παρουσιάζουν διαφορές στο τρόπο και στο περιβάλλον διαβίωσης αλλά και μορφολογικές και γενετικές διαφορές. Επιπλέον μέσα στο είδος *L. europaeus* γίνεται ένας ξεκάθαρος διαχωρισμός ανάμεσα στην «δυτική» και «ανατολική» ομάδα. Για τη δυτική ομάδα υπάρχουν δυο επιπλέον κλάδοι οι οποίοι εμπεριέχουν: ο πρώτος τους λαγούς από τη βόρεια και κεντρική Ευρώπη και ο δεύτερος τα δείγματα από τη κεντρική Ελλάδα. Στην ανατολική ομάδα οι διαχωρισμοί είναι πιο περίπλοκοι αλλά οι λαγοί από την ανατολική Μακεδονία και Θράκη είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους.

Η παρούσα γενετική ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη δυο διακριτών φυλογενετικών ομάδων μια «δυτική» και μια «ανατολική» ομάδα. Αυτές οι δυο ομάδες παρουσιάζουν ένα ξεκάθαρο φυλογενετικό πρότυπο. Οι λαγοί από την κεντρική Ελλάδα (ελληνικού τύπου) και τη κεντρική και βόρεια Ευρώπη (ευρωπαϊκού τύπου) ανήκουν στην «δυτική» ομάδα ενώ οι λαγοί από την ανατολική Μακεδονία και Θράκη, από τη Τουρκία και από το βόρειο και νότιο Ισραήλ ανήκουν στην «ανατολική» ομάδα. Αυτές οι δυο ομάδες σχηματίζουν μια ζώνη αλληλοεπικάλυψης στην περιοχή τα Θράκης η οποία ίσως εκτείνεται και στην τουρκική Θράκη βόρεια του Βοσπόρου αλλά και στην Μικρά Ασία. Αυτή η περιοχή είναι μια γνωστή ζώνη υβριδισμού στην Ευρώπη (Hewitt 1999) για πληθυσμούς οι οποίοι περιορίστηκαν στα νότια Βαλκάνια και στη Μικρά Ασία κατά τους παγετώνες του Πλειστόκαινου. Για τον καφέ ευρωπαϊκό λαγό ο σχηματισμός αυτής της ζώνης υβριδισμού είναι αποτέλεσμα της δευτερογενούς επαφής των γονιδιακών δεξαμενών ενός πληθυσμού σε καταφύγια στα νότια Βαλκάνια και ενός ανατολικού πληθυσμού. Αυτή η ζώνη πιθανόν δημιουργήθηκε πριν από 15.000-9.500 χρόνια όταν η Ευρώπη και η ανατολή ήταν ενωμένες (Aksu et al. 1999) και το κλίμα ήταν αρκετά θερμό για να επιτρέψει στους λαγούς να διασκορπιστούν από τα καταφύγια.

Αρκετά θηλαστικά παρουσιάζουν παρόμοια φυλογεωγραφικά πρότυπα με αυτά που παρατηρήθηκαν για το λαγό. Οι πληθυσμοί των καφέ αρκούδων (*Ursus arctos*) στην Ευρώπη χαρακτηρίζεται από δυο κύριες ομάδες: μια δυτική ομάδα η οποία χωρίζεται επιπλέον σε δυο υποκατηγορίες, πληθυσμοί

από τα βαλκανικά καταφύγια και πληθυσμοί από τα ιβηρικά καταφύγια, και μια ανατολική ομάδα η οποία περιλαμβάνει αρκούδες από τη Ρουμανία, τη δυτική Ρωσία, και μεγάλα τμήματα της Σκανδιναβίας (Taberlet et al. 1994). Επίσης ο σκαντζόχοιρος (*Erinaceus concolor*) παρουσιάζει παρόμοιο φυλογεωγραφικό πρότυπο με του λαγού. Υποδιαιρείται σε δυο κατηγορίες όπου η μια κατανέμεται στην Θράκη (Ελλάδας και Τουρκίας) έως και την Αυστρία και ίσως αυτή η ομάδα να αντιπροσωπεύει ένα παγετώδες καταφύγιο των Βαλκανίων. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει σκαντζόχοιρους από τη Μικρά Ασία και την Παλαιστίνη (Seddon et al. 2001).

#### Μονάδες διατήρησης και μετακινήσεις του καφέ ευρωπαϊκού λαγού

Τα γενετικά δεδομένα θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη για τη σωστότερη διατήρηση και διαχείριση του καφέ ευρωπαϊκού λαγού. Αν και το συγκεκριμένο είδος δεν βρίσκεται σε κίνδυνο εξαφάνισης, οι τοπικοί πληθυσμοί συχνά μειώνονται εξαιτίας του κυνηγιού αλλά και των επιδημικών ασθενειών. Επίσης οι εκτενείς μετακινήσεις έχουν την τάση να αντικαθιστούν τις τοπικές γενετικές δεξαμενές και να μειώνουν την γενετική ποικιλότητα (Flux 1983, Perez-Suarez et al. 1994, Pierpaoli et al. 1999). Ειδικά όταν τα απελευθερωμένα άτομα προέρχονται από εκτρεφόμενες μοναδικές γραμμές, τότε η επίδραση στη γενετική ποικιλότητα είναι μεγαλύτερη. Στην Ιταλία και στην κεντρική Ευρώπη η γενετική ποικιλότητα είναι χαμηλότερη από τα νότια Βαλκάνια και αυτό πιθανώς να οφείλεται στην απώλεια της ποικιλότητας λόγω της μεταπαγετωνικής εξάπλωσης προς το βορρά (Hewitt 1999) αλλά και λόγω των εκτενών μετακινήσεων του καφέ ευρωπαϊκού λαγού.

Στην Ελλάδα η φυλογεωγραφική δομή των πληθυσμών του καφέ ευρωπαϊκού λαγού υποδεικνύει ότι οι πληθυσμοί δεν έχουν επηρεαστεί από απελευθερώσεις αν και στην μελέτη των Mamuris et al. (2001) έχουν βρεθεί απλότυποι μετακινήμενων ατόμων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στον ελλαδικό χώρο οι απελευθερώσεις λαγών από διαφορετικές ευρωπαϊκές χώρες άρχισαν την δεκαετία του 1980 και δεν έγιναν σε μεγάλη κλίμακα όπως σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες. Επιπρόσθετα η εισδοχή του mtDNA από

αλλόχθονες γονιδιακές δεξαμενές σε φυσικούς πληθυσμούς δεν είναι υψηλή εξαιτίας της περιορισμένης βιωσιμότητας των εκτρεφόμενων ατόμων σε σχέση με τους άγριους πληθυσμούς. Η ύπαρξη δυο διακριτών φυλομάδων μέσα στον καφέ ευρωπαϊκό λαγό, η γεωγραφική δομή μέσα σε κάθε ομάδα και η υψηλότερη γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών από τα καταφύγια είναι οι τρεις παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη σε κάθε σχέδιο διαχείρισης και διατήρησης του καφέ ευρωπαϊκού λαγού. Οι δυο ομάδες η «δυτική» και η «ανατολική» συνιστούν διαφορετικές εξελικτικές μονάδες (Moritz 1994) και περαιτέρω ανάμειξή τους, εκτός από τη ζώνη υβριδισμού, θα πρέπει να αποφευχθεί.

Η πρώτη ενέργεια για τη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας του καφέ ευρωπαϊκού λαγού στην Ελλάδα είναι να σταματήσουν όλα τα προγράμματα εμπλουτισμού όπως έχει προταθεί από τους Mamuris et al. (1999). Όταν ο εμπλουτισμός είναι αναπόφευκτος θα πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή στη γενετική σύνθεση των ατόμων του προγράμματος εμπλουτισμού. Θα πρέπει να γίνεται εμπλουτισμός μόνο σε πληθυσμούς με παρόμοιο γενετικό υπόβαθρο και τα απελευθερωμένα άτομα θα πρέπει να παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλότητα.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aksu AE, Hiscott RN, Yasar D (1999) Oscillating Quaternary water levels of the Marmara Sea and vigorous outflow into the Aegean Sea from the Marmara Sea-Black Sea drainage corridor. *Marine Geology*, **153**: 275-302.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389-3402.

Alves Paulo C., Madalena Branco, Osorio Matias and Nuno Ferrand (2000) New Genetic Variation in European Hares, *Lepus granatensis* and *L. europaeus*. *Biochemical Genetics*, Vol. **38**, Nos. ¾.

Alves Paulo C., Nuno Ferrand, F. Suchentrunk and D.J. Harris (2003) Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**: 70-80.

Angerbjorn A. & Flux J.E.C. (1995) *Lepus timidus*. *Mammalian Species*, **495**: 1-11.

Avise J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York, 511p.

Avise J.C. (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts 1-447.

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

Bernatchez L., Saverd L., Dodson J., Pallota D., (1988) Mitochondrial DNA sequence heterogeneity among James-Hudson Bay anadromous coregonines. Finnish Fish Research **9**: 17-26.

Bjork S. (1995) A review of the history of the Baltic sea, 13.0-8.0 ka BP. Quaternary international **27**: 19-40.

Bonhomme F., Fernandez J., Palacios F., Catalan L., Machordon A. (1986) Caracterisation biochimique du complex d'especies du genre *Lepus* en Espagne. Mammalia **50**: 495-506.

Brown W. M. George M. J. Wilson A. C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. acad. Sci. USA **76**: 1967-1971.

Burton Cole, Charles J. Krebs and Eric B. Taylor (2002) Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada. Molecular Ecology, **11**: 1689-1701.

Γεωργάτσος Ι. Γ., Τ. Α. Γιουψάνης, Δ. Α. Κυριακίδης (2001) Ενζυμολογία, Εκδόσεις Ζήτη.

Chevallier H-J (1973) Les Mollusques. In: Grottes de Kitos (Attique). Bulletin Correspondance Hellenique, **97**: 443-459.

De Beaufort F. (1991) La faune des mammiferes de Grece: Caracteristiques, endemisme, particularismes. Biologia Gallo-hellenica, **18**: 99-106.

De Beaux O. (1929) Ricerche faunistiche nelle isole Italiane dell' Egeo. Mammiferi. Arch. Zool. Ital. **13**: 1-25.

Dragg A. (1974) Mammals of Ontario. Waterloo, Ontario: Otter Press.

Ellermann J. R., Morrison-Scott T.C. (1951) Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758-1946. British Museum (Nat. History), London.

Felsenstein J. (1995) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Flux JEC, Angermann R. (1990) Chapter 4: The Hares and Jackrabbits. In: Rabbits, Hares and Pikas. Status Survey and Conservation Action Plan (eds Chapman JA, Flux JEC), pp 61-94, IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group, Gland Switzerland.

Frylestam B. (1990) Lär Känna Fältharen. Schmidts Boktryckeri AB, Helsingborg.

Gelehrter D. Thomas, Francis S. Collins, David Ginsburg (2003) Αρχές Ιατρικής Γενετικής Ιατρικές, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

Gissi Carmela, Annette Gullberg and Ulfur Arnason (1998) The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. Genomics, **50**: 161-169.

Halanych M. Kenneth, John R. Demboski, Bettine Jansen van Vuuren, David R. Klein and Joseph A. Cook (1999) Cytochrome *b* Phylogeny of North American Hares and Jackrabbits (*Lepus*, Lagomorpha) and the Effects of Saturation in Outgroup Taxa. Molecular Phylogenetics and Evolution, Vol. **11** No. 2: 213-221.

Halanych M. Kenneth, Terence J. Robinson (1999) Multiple Substitutions Affect the Phylogenetic Utility of Cytochrome *b* and 12S rDNA Data: Examining a Rapid Radiation in Leporid (Lagomorpha) Evolution. The Journal of Molecular Evolution, **48**: 369-379.

Hall E., Kelson K. (1959) Mammals of North America. New York: The Ronald press Co.

Hanström B. (1972) Djurens Värld 12: Däggdjur 2. FörlagshusetNordens Boktryckeri, Malmö 86 p.

Hartl G.B., Suchentrunk F., Nadlinger K., Willing R., (1993) An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Acta Theriologica*, **38**: 33-57.

Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**: 87-112.

Hillis DM, MT Dixon (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* **66**:411-453.

Hilzheimer M. (1906) Die europäischen Hasen. *Zool. Anz.* **30**: 510-513.

Hilzheimer M. (1908) Die Hasenarten Europas. *Mitt. Kgl. Naturalienkab. Zu Stuttgart*, **59**: 1-39.

Hodges K. E. (2000a) The ecology of snowshoe hares in northern boreal forests. In: *Ecology and Conservation of Lynx in the United States* (eds Ruggiero L., Aubry K., Buskirk S. et al.), pp 117-161. University Press of Colorado, Boulder, CO.

Hodges K. E. (2000b) Ecology of snowshoe hares in southern boreal and montane forests. In: *Ecology and Conservation of Lynx in the United States* (eds Ruggiero L., Aubry K., Buskirk S. et al.), pp 163-206. University Press of Colorado, Boulder, CO.

Hoffman RS (1993) Order Lagomorpha. In: Wilson DE, Reeder DM (eds) Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. Smithsonian Institution Press, London 807-827.

Jullien R (1981) La faune des vertebrates a L' exclusion de l' homme, des oiseaux, des rongeurs et des poissons. In: La grotte Prehistorique de Kithos (Attique). Mimos 1968-78. recherche sur les grandes civilisations. Synthese (ed Lambert N) **7**: 569-590.

Lang G. (1994) Quartäre Vegetationsgeschichte Europas. Methoden und Ergebnisse. G Fischer, Jena, 62pp.

Lönnerberg E. (1905) On hybrids between *Lepus timidus* and *Lepus europaeus* Pall. From southern Sweden. Proceedings of the Zoological Society of London, **1**: 278-287.

Lopez-Martinez N. (1989) Tendencias en paleogeografía. In: Paleontología, Col. "Nuevas tendencias", CSIC, Madrid, pp. 271-296.

Μαμούρης Ζ. (2001) Εργαστηριακές Σημειώσεις Γενετικής, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.

Mamuris Z., A. Sfougaris, C. Stamatis (2001) Genetic structure of Greek Brown Hare Populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity Biological conservation, **101**:187-196.

Mamuris Z., A. Sfougaris, C. Stamatis and F. Suchentrunk (2002) Assessment of Genetic Structure of Greek Brown Hare Populations based on Variation in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Biochemical Genetics, Vol.**40**, Nos.9/10.

Miller G. S. (1912) Catalogue of the Mammals of Western Europe. British Museum, London.

Moritz CC (1994) Defining "evolutionary significant units" for conservation. Trends in Ecology and Evolution, **9**: 373-375.

Nei M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY, USA.

Palacios F. (1976) Descripción de una nueva especie de liebre (*Lepus castroviejo*) endémica de la cordillera Cantábrica. Don. Acta Vert. **3**: 205-223.

Palacios F. (1996) Systematics of the indigenous hares of Italy traditionally identified as *Lepus europaeus* Pallas 1778 (Mammalia: Leporidae). Bonner Zoologische Beiträge, **56**: 59-91.

Palumbi S.R., Martin A., Romano S., McMillan W.O., Stice L., Grabowski G., (1991) The Simple Fool's Guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.

Parson W., K. Pegoraro, H. Niederstatter, M. Foger, M. Steinlechner (2000) Species identification by means of the cytochrome *b* gene. Int J Legal Medicine, **114**:23-28.

Payne S (1969) Animal bones. In: Th. W. Jacobsen: Excavations at Porto Cheli and vicinity. Preliminary report II: The Franchthi Cave 1967-68. Hesperia, **38**: 350-354.

Perez-Suarez Gonzalo, Fernando Palacios and Pierre Boursot (1994) Speciation and Paraphyly in Western Mediterranean Hares (*Lepus castroviejo*, *L. europaeus*, *L. granatensis*, and *L. capensis*) Revealed by Mitochondrial DNA Phylogeny. Biochemical Genetics, Vol. **32**, Nos 11/12.

Peterson R. (1966) The mammals of Eastern Canada. Oxford University Press.

Pierpaoli Massimo, Francesco Riga, Valter Trocchi and Ettore Randi (1999) Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology*, **8**: 1805-1817.

Pierpaoli Massimo, Francesco Riga, Valter Trocchi, Ettore Randi (2003) Hare populations in Europe: intra and interspecific analysis of mtDNA variation. *C.R. Biologies*, **326**: 80-84.

Reisch L (1976) Beobachtungen an Vogelknochen aus dem Spatpleistozan an der Hohle Kephalaria (Argolis, Griechenland). *Archaisches Korrespondenzblatt*, **6**: 261-265.

Riddle B. R., Honeycott R. L. and Lee P. L. (1993) Mitochondrial DNA phylogeography in northern grasshopper mice (*Onychomys leucogaster*) – the influence of Quaternary climatic oscillation on population dispersion and divergence. *Molecular Ecology*, **2**: 183-193.

Rouchka C. Eric (2003) Introduction to Bioinformatics. University of Louisville.

Saccone Cecilia, Carla De Giorgi, Carmela Gissi, Graziano Pesole, Aurelio Reyes (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, **238**: 195-209.

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

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA, **74**: 5463-5467.

Seddon JM, Santucci F, Reeve NJ, Hewitt GM (2001) DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. Molecular Ecology, **10**: 2187-2198.

Stuart A. J. (1974) Pleistocene history of the British vertebrate fauna. Biological reviews, **49**: 225-266.

Suchentrunk F., C. Michailov, G. Markov and A. Haiden (2000) Population genetics of Bulgarian brown hares *Lepus europaeus* : allozymic diversity at zoogeographical crossroads Acta Theriologica, **45**: 1-12.

Suchentrunk Franz, Zisis Mamuris, Athanassios I. Sfougaris and Costas Stamatis (2003) Biochemical Genetic Variability in Brown Hares (*Lepus europaeus*) From Greece. Biochemical Genetics, Vol. **41**, Nos. 5/6.

Taberlet P., Bouvet J. (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. Proceeding of the Royal Society of London, Series B **255**: 195-200.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, **24**: 4876-4882.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence



weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.

Thulin Carl-Gustaf and Hakan Tegelstrom (2001) High mtDNA haplotype diversity among introduced Swedish brown hares *Lepus europaeus*. *Acta Theriologica*, **46**: 375-384.

Thulin Carl-Gustaf and Hakan Tegelstrom (2002) Biased geographical distribution of mitochondrial DNA that passed the species barrier from mountain hares to brown hares (genus *Lepus*): an effect of genetic incompatibility and mating behaviour? *J. Zool.*, **258**: 299-306.

Thulin Carl-Gustaf, M. Isaksson, Hakan Tegelstrom (1997) The origin of Scandinavian mountain hares (*Lepus timidus*). *Game Wildl.*, Vol.**14**: 463-475.

Thulin Carl-Gustaf, M. Jaarola, Hakan Tegelstrom (1997) The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares. *Molecular Ecology*, **6**: 463-467.

Vinge J. D. (1992) Zooarchaeology and the biogeographical history of mammals of Corsica and Sardinia since the last ice age. *Mamm. Rev.*, **2**: 87-89.

Von Wettstein O. (1943) Eine neue Hasenrasse vom Peloponnes. *Zool. Anz.*, **143**: 282-284.

Wang Hurng-Yi, Mung-Pei Tsai, Ming-Chung Tu and Sin-Che Lee (2000) Universal Primers for Amplification of the Complete Mitochondrial 12S rRNA Gene in Vertebrates. *Zoological Studies*, **39**(1): 61-66.

Woese C. R. (1998) "The Universal Ancestor". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**: 6854-6859.

Wolstenholme D. R. (1992) Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, **141**: 173-216.

Wu Chun-Hua, Hai-Peng Li, Ying-Xiang Wang, Ya-Ping Zhang (2000) Low Genetic Variation of the Yunnan Hare as revealed by Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Sequences *Biochemical Genetics*, Vol. **38**, Nos. 5/6.

Zehner R., S. Zimmermann, D. Mebs (1998) RFLP and sequence analysis of the cytochrome *b* gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int J Legal Medicine*, **111**: 323-327.