



Τμήμα
Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Department
of Biochemistry &
Biotechnology
University of Thessaly

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βιολογία των νήσων: το παράδειγμα του *Lepus
Europeaus*

Πλαγεράς Δημήτρης



Λάρισα 2013

Βιολογία των νήσων : το παράδειγμα του *Lepus europeus*

Island Biology: the case of *Lepus europeus*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΨΑΡΡΑ ANNA MAPIA	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία 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 για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντας την εκτέλεση της συγκεκριμένης μελέτης, καθώς και για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, κα Σαραφίδου Θεολογία και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας κα Ψαρρά Άννα Μαρία για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Θέλω να ευχαριστήσω ακόμα δύο ανθρώπους χωρίς τους οποίους η πραγματοποίηση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη : τον υποψήφιο διδάκτορα Θέμη Γιαννούλη, ο οποίος μου έμαθε όλα όσα χρειαζόμουν για να σταθώ στο εργαστήριο και με καθοδήγησε από την αρχή ως το τέλος της εργασίας, τόσο στο πειραματικό κομμάτι, όσο και στο κομμάτι της συγγραφής. Και φυσικά, το Κώστα Σταμάτη τόσο για την εξαιρετική του εργασία που αποτέλεσε τη βάση της παρούσας διπλωματικής, όσο και για τη καθημερινή του παρουσία και βοήθεια με ότι ζήτημα και αν προέκυπτε στο εργαστήριο και .Θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής για την εξαιρετική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε καθημερινά στο εργαστήριο.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καλό φίλο και συνάδελφο Νίκο Τρασανίδη, που έπαιξε καθοριστικό ρόλο κατά τη τελική φάση της συγγραφής αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) είναι ένα ευρέως διαδεδομένο είδος με μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων και ιδιαίτερη οικονομική αλλά και ερευνητική σημασία. Η εκτεταμένη κατανομή του και η ικανότητα του να προσαρμόζεται σε αλλαγές ενδιαιτημάτων τον καθιστούν ένα είδος μοντέλο, μέσω του οποίου είμαστε σε θέση να εξάγουμε συμπεράσματα για τη συμπεριφορά, τη βιολογία, τη γενετική και πληθυσμιακή δομή πολλών άγριων πληθυσμών θηλαστικών.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, η οποία έρχεται να προστεθεί σε μια σειρά αντίστοιχων μελετών που διενεργηθήκαν στην Ελλάδα και στην Ευρώπη τα προηγούμενα χρόνια, πραγματοποιήθηκε πληθυσμιακή ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ευρωπαϊκού λαγού σε ένα εκτεταμένο δίκτυο δειγματοληψίας σε ελληνικά νησιά, (Σάμος, Χίος, Ρόδος, Μυτιλήνη) στη Κύπρο, στη Νέα Ζηλανδία, στο Ηνωμένο Βασίλειο, καθώς και στην Τουρκία. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δημοσιευμένα δείγματα από προηγούμενες μελέτες, από την κεντρική Ευρώπη και την ηπειρωτική Ελλάδα. Η μελέτη στηρίχτηκε στην ανάλυση δυο μοριακών δεικτών του mtDNA του γονιδίου του Cytb και της περιοχής ελέγχου D-loop με χρήση τεχνικών όπως PCR, PCR-SSCP και αλληλούχηση DNA. Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση των αποτελεσμάτων με προγράμματα βιοπληροφορικής. Κατά την εργασία αυτή επιλέχθηκε να μελετηθούν κυρίως νησιωτικοί πληθυσμοί λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν λόγω της γεωγραφικής και άρα αναπαραγωγικής απομόνωσης που υφίστανται. Βασικός στόχος της εργασίας ήταν να διερευνηθεί το κατά πόσον τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά των νησιωτικών πληθυσμών οδηγούν

σε διαφοροποιημένη γενετική δομή και διαφορετικούς ρυθμούς φυλογένεσης σε σχέση με τους ηπειρωτικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώνουν αυτή τη θεωρία καθώς από την ανάλυση και των δυο δεικτών προέκυψαν πολύ λιγότεροι απλότυποι στους νησιωτικούς πληθυσμούς σε σχέση με τους αντίστοιχους ηπειρωτικούς, άρα βρέθηκε μειωμένη γενετική ποικιλομορφία στους πληθυσμούς των νησιών. Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν κατανεμήθηκαν φυλο-γεωγραφικά στις 3 απλοομάδες που είχαν προκύψει από την εργασία των Stamatis *et al* (2009), ανάλογα με τη περιοχή προέλευσης τους. Η μελέτη αυτή φανέρωσε επίσης υψηλά επίπεδα διαφοροποίησης τόσο μεταξύ των νησιωτικών πληθυσμών, όσο και μεταξύ νησιωτικών και ηπειρωτικών, ενώ επιβεβαίωσε τη προέλευση των λαγών της Κύπρου και ορισμένων νησιών του Αιγαίου από τη Τουρκία, αλλά και τη προέλευση των λαγών της Νέας Ζηλανδίας από το Ηνωμένο Βασίλειο μέσω των αποίκων.

ABSTRACT

The brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778), is a widespread species occurring in a variety of environments. It has considerable economic importance, as well as research importance. The extensive distribution of its species and the fact that its populations respond rapidly to environmental and habitat changes, make this species an ideal model for the study of the behavior, biology and genetic structure of many wild mammals populations.

In this thesis, that comes after a series of similar studies conducted in Greece and Europe over the last few years, a population analysis was conducted on a large number of samples of brown hare, across a widespread network of sampling, in greek islands (Samos, Chios, Rodos, Mytilini), in Cyprus, in New Zealand, in the United Kingdom and in Turkey. Also we used previously published samples from central Europe and from the Greek mainland. The study was based in the analysis of two mtDNA molecular markers, the gene Cytb and the control region D-loop, using techniques as PCR, PCR-SSCP and DNA sequencing. Also we conducted analysis on the results using bioinformatics software.

In this study, we chose to analyze mainly island populations because of their special traits, that occur because of their geographic and thus reproductive isolation. Our basic aim was to examine if these unique island's populations traits lead them to different genetic structure and different phylogenetic rates, compared with the mainland's populations. This study's results, support this theory, because the analysis of the two molecular markers lead to a significant less number of haplotypes in island's populations compared to the mainland's populations, thus we discovered reduced genetic diversity in the island's populations. All the samples that we examined, were allocated to the 3 haplogroups that have been found from the study of Stamatis *et al* (2009), according to their regions of origin. This thesis, also revealed high levels of differentiation, among the island's populations, as well as among the island's and the mainland's populations. It also confirmed that the brown hares of Cyprus and some Aegean islands came from Turkey. Finally we confirmed that the brown hares of New Zealand came from the United Kingdom, through the colonists.

Εισαγωγή	7
Πληθυσμιακή γενετική	7
Γενετική ποικιλομορφία	7
Μοριακή φυλογένεση	8
Φυλογενετικά δέντρα.....	9
Επιλογή χαρακτήρων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.....	10
Μοριακοί δείκτες στις φυλογενετικές μελέτες	10
Το Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)	11
Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA	12
Μιτοχονδριακά γονίδια και φυλογένεση	13
Ο ευρωπαϊκός λαγός(<i>Lepus europaeus</i> Pallas, 1778)	14
Βιολογία του <i>Lepus europaeus</i>	14
Μοριακές πληθυσμιακές μελέτες του <i>Lepus europaeus</i> στην Ευρώπη.....	15
Υλικά και μέθοδοι.....	21
Μέθοδοι	23
Αποτελέσματα.....	31
Απομόνωση DNA.....	31
PCR.....	31
Καθαρισμός DNA	32
Αλληλούχηση.....	32
ΑΝΑΛΥΣΗ Cytb	33
Απλότυποι	33
Νουκλεοτιδική Ανάλυση	38
Αμινοξική Ανάλυση	38
Γενετικές Αποστάσεις μέσα στους πληθυσμούς.....	38
Γενετικές Αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς	39
Φυλογενετική Ανάλυση	39
Φυλογενετικό δέντρο	40
ΑΝΑΛΥΣΗ D-loop	41
Απλότυποι.....	41
Νουκλεοτιδική Ανάλυση	51
Γενετικές Αποστάσεις μέσα στους πληθυσμούς.....	51
Γενετικές Αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς	51
Φυλογενετική Ανάλυση	52
Φυλογενετικό δέντρο.....	53
Συζήτηση	55

Εισαγωγή

Πληθυσμιακή γενετική

Η πληθυσμιακή γενετική είναι ο κλάδος ο οποίος μελετά τη γενετική ποικιλομορφία που παρατηρείται τόσο στα άτομα ενός πληθυσμού όσο και μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, δηλαδή τη ποικιλότητα αλληλομόρφων και γενοτύπων και τις αντίστοιχες συχνότητες τους καθώς και τα αίτια μηχανισμούς, οι οποίοι μεταβάλλουν τη γενετική δομή των πληθυσμών. Η πληθυσμιακή γενετική είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την εξέλιξη και αποτελεί τη βάση για τη γενετική βελτίωση των ζωικών οργανισμών, τη διατήρηση των ειδών και της βιοποικιλότητας. Εφαρμόζοντας τις αρχές της κλασικής γενετικής σε μεγάλες ομάδες ατόμων, η πληθυσμιακή γενετική μελετάει τα πρότυπα της γενετικής ποικιλομορφίας που εντοπίζονται μέσα σε κάθε ομάδα, δηλαδή τη γενετική δομή των πληθυσμών, τη γεωγραφική τους διαφοροποίηση και τη μεταβολή τους στο χρόνο.

Γενετική ποικιλομορφία

Η πληθυσμιακή γενετική ποικιλομορφία έχει τη βάση της στη διαφοροποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Προϋπόθεση για την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας είναι οι νουκλεοτιδικές αλλαγές-μεταλλάξεις. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να προκύψουν κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA και αν συμβούν στα κύτταρα της γαμετικής σειράς, είναι δυνατόν να μεταβιβαστούν στις επόμενες γενιές. Τις τελευταίες δεκαετίες, η εξέλιξη των μοριακών τεχνικών και των μεθόδων αλληλούχησης συνετέλεσε στη ραγδαία αύξηση των δεδομένων της πληθυσμιακής ποικιλομορφίας στο επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Γενετική ποικιλότητα μπορεί επίσης να προκύψει και από τον γενετικό ανασυνδυασμό. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν δυο διεργασίες ανασυνδυασμού : Α) Ο διαχρωμοσωματικός ανασυνδυασμός, που γίνεται με βάση τον ελεύθερο συνδυασμό των χρωμοσωμάτων, κατά τον οποίο τα μειωτικά προϊόντα αντιστοιχούν στο 50% του συνόλου των απογόνων και Β) Ο ενδοχρωμοσωματικός ανασυνδυασμός(διασκελισμός), που συμβαίνει κατά τη μείωση ανάμεσα σε μη αδελφές χρωματίδες και οδηγεί σε διαφορετικό συνδυασμό αλληλομόρφων. Τα παραγόμενα μειωτικά προϊόντα αυτού του τύπου ανασυνδυασμού αντιστοιχούν σε ποσοστό μικρότερο από το 50% του συνόλου των απογόνων.

Η γενετική ποικιλομορφία που παράγεται μέσα σε έναν πληθυσμό από τις μεταλλάξεις και τον ανασυνδυασμό, τροποποιείται(αυξομειώνεται, καθιερώνεται ή εξαλείφεται) μέσα από μηχανισμούς διεργασιών όπως η φυσική επιλογή, η γονιδιακή ροή και η γενετική παρέκκλιση. Η φυσική επιλογή είναι μια ομάδα διεργασιών, μέσω των οποίων, χαρακτηριστικά τα οποία καθιστούν τους οργανισμούς καλύτερα προσαρμοσμένους στο περιβάλλον τους, αυξάνουν δηλαδή τη πιθανότητα επιβίωσης και αναπαραγωγής τους, διατηρούνται και μεταβιβάζονται, διαμορφώνοντας ένα

μεγάλο μέρος της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας που παρατηρούνται στη φύση και ταυτόχρονα της υποκείμενης γενετικής παραλλακτικότητας. Η γονιδιακή ροή περιγράφει την είσοδο στη γενετική δεξαμενή ενός πληθυσμού, γονιδίων (ή αλληλομόρφων τους) από έναν ή περισσότερους πληθυσμούς. Συνήθως οι πληθυσμοί αυτοί ανήκουν στο ίδιο είδος, σε μερικές περιπτώσεις, όμως πραγματοποιείται υβριδισμός ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, τα οποία δεν είναι πλήρως αναπαραγωγικά απομονωμένα. Η γονιδιακή ροή πραγματοποιείται με μετακίνηση ατόμων μεταξύ δύο πληθυσμών, μέσω της μετανάστευσης ή μεταφοράς ατόμων από τον άνθρωπο. Εισάγει νέα αλληλόμορφα ή μεταβάλλει τη συχνότητα υπάρχοντων αλληλομόρφων στους πληθυσμούς. Ο όρος γενετική παρέκκλιση αναφέρεται σε αλλαγές από γενιά σε γενιά στις συχνότητες των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό που οφείλονται σε τυχαία γεγονότα. Πρόκειται για πολύ σημαντική εξελικτική διεργασία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε απότομες αλλαγές των αλληλομορφικών συχνοτήτων σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Μπορεί να συμβάλλει στην εγκαθίδρυση νέων αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό αλλά και στην απώλεια κάποιων, με συνέπεια τη σημαντική μείωση της γενετικής ποικιλότητας.

Μοριακή φυλογένεση

Ο όρος φυλογένεση αναφέρεται στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ οργανισμών, πληθυσμών και ειδών όπως αυτές διαμορφώνονται με το πέρασμα του χρόνου. Καθώς η εξέλιξη μπορεί να θεωρηθεί ως η γενετική αλλαγή που διέρχεται μέσα από το φίλτρο της φυσικής επιλογής, η ανάλυση των γενετικών σχέσεων είναι πρωταρχικής σημασίας για την αποκρυπτογράφηση των εξελικτικών σχέσεων. Η μεγαλύτερη προοπτική που δίνει στους επιστήμονες η υπόθεση του μοριακού ρολογιού είναι ότι τα μοριακά δεδομένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να αποκρυπτογραφηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις όλων των ζωντανών οργανισμών. Πολύ απλά, οι οργανισμοί με μεγάλο βαθμό ομοιότητας στο μοριακό επίπεδο αναμένεται να έχουν στενότερη συγγένεια μεταξύ τους απ' ό,τι οι οργανισμοί που διαφέρουν περισσότερο στο μοριακό επίπεδο. Πριν από την ανάπτυξη της τεχνολογίας της μοριακής βιολογίας που επιτρέπει τη συλλογή δεδομένων για τέτοιου είδους αναλύσεις, οι εξελικτικοί βιολόγοι βασιζόνταν εξ ολοκλήρου στη σύγκριση των φαινοτύπων για την εκτίμηση της γενετικής ομοιότητας. Πίσω από την πρακτική αυτή βρισκόταν η παραδοχή ότι αν οι φαινότυποι είχαν ομοιότητες μεταξύ τους το ίδιο θα ίσχυε και για τα γονίδια που ήταν υπεύθυνα για τους φαινότυπους αυτούς. Αν οι φαινότυποι ήταν διαφορετικοί, θα ήταν διαφορετικά και τα αντίστοιχα γονίδια. Οι φαινότυποι που εξετάστηκαν αρχικά ήταν κυρίως γενικά ανατομικά χαρακτηριστικά. Αργότερα μελετήθηκαν η συμπεριφορά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, καθώς και οι παρατηρήσεις μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Οι συγκρίσεις αυτών των γνωρισμάτων χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων πολλών ομάδων ειδών, τόσο φυτών όσο και ζώων, και εξακολουθούν να αποτελούν τη βάση πολλών εξελικτικών μελετών. Παρόλα αυτά, δε μπορούμε να βασιστούμε στη μελέτη των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, παρά μόνο μέχρι ενός σημείου. Ορισμένες φορές κατά την εξέλιξη μπορεί να εμφανιστούν, μέσα από μια διαδικασία που ονομάζεται συγκλίνουσα εξέλιξη (convergent evolution), παρόμοιοι φαινότυποι σε οργανισμούς που δε συγγενεύουν στενά μεταξύ τους.

Ένα άλλο πρόβλημα που αντιμετωπίζουμε όταν βασιζόμαστε στους φαινότυπους για να προσδιορίσουμε εξελικτικές σχέσεις είναι ότι πολλοί οργανισμοί δε διαθέτουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που να προσφέρονται για μελέτη και σύγκριση. Για

παράδειγμα, η μελέτη των σχέσεων μεταξύ βακτηρίων παρουσίαζε πάντα προβλήματα, επειδή τα βακτήρια δεν έχουν πολλά εμφανή γνωρίσματα που να συσχετίζονται με το βαθμό της γενετικής τους συγγένειας. Ένα τρίτο πρόβλημα δημιουργείται όταν προσπαθούμε να συγκρίνουμε οργανισμούς με πολύ μακρινή συγγένεια. Ποια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά θα έπρεπε να συγκρίνουμε, για παράδειγμα, αναλύοντας βακτήρια και θηλαστικά, οργανισμούς που έχουν τόσα λίγα κοινά χαρακτηριστικά;

Ακόμη και αν ο σχετικός ρυθμός μοριακής εξέλιξης μπορεί να είναι διαφορετικός από κλάδο σε κλάδο και παρά το γεγονός ότι θα πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί απέναντι στους ρυθμούς απόκλισης που υπολογίζουμε με βάση τα μοριακά δεδομένα, οι μοριακές προσεγγίσεις μπορούν συνήθως να χρησιμοποιηθούν αξιόπιστα για τη φυλογενετική ταξινόμηση των οργανισμών. Πολλοί υποστηρίζουν ότι η μοριακή φυλογενετική ταξινόμηση είναι περισσότερο αξιόπιστη ακόμη και όταν υπάρχουν διαθέσιμες εναλλακτικές πηγές δεδομένων, επειδή η δράση της φυσικής επιλογής γενικά είναι λιγότερο έντονη στο επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Όταν εντοπίζονται ασυμφωνίες ανάμεσα στη μοριακή και τη μορφολογική φυλογενετική ταξινόμηση, παρουσιάζονται πολύτιμες ευκαιρίες για την εξέταση της επίδρασης που έχει η φυσική επιλογή στο επίπεδο των φαινοτυπικών διαφορών (Αλαχιώτης, 2007).

Φυλογενετικά δέντρα

Λόγω της μακράς ιστορίας των εξελικτικών μελετών, οι γενικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών είχαν καθιερωθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό, ήδη πριν από την ανάπτυξη της τεχνολογίας μοριακής ανάλυσης. Κεντρική θέση κατέχει η έννοια του φυλογενετικού δέντρου (phylogenetic tree), το οποίο αναπαριστά τις εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στα διάφορα είδη. Όλοι οι οργανισμοί, τόσο αυτοί που ζουν σήμερα, όσο και αυτοί που έζησαν κατά το παρελθόν, έχουν ένα κοινό πρόγονο που έζησε πριν από τέσσερα δισεκατομμύρια χρόνια περίπου. Σε κάθε φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται τουλάχιστον ένα μέρος αυτής της γενεαλογίας με κλάδους (branches) που συνδέουν δυο (ορισμένες φορές και περισσότερους) γειτονικούς κόμβους (nodes). Οι τελικοί κόμβοι αντιστοιχούν στα taxa, για τα οποία διαθέτουμε δεδομένα από τη μοριακή ανάλυση. Οι εσωτερικοί κόμβοι αντιστοιχούν σε κοινούς προγόνους που υπήρχαν πριν από την απόκλιση των ειδών, από την οποία προέκυψαν δυο ξεχωριστές φυλογενετικές ομάδες οργανισμών. Τα μήκη των κλάδων σχεδιάζονται πολλές φορές σε κλίμακα, ώστε να φανερώνουν το βαθμό απόκλισης ανάμεσα στα taxa που συνδέουν. Όταν είναι δυνατόν να διακριθεί ένας κόμβος ως ο κοινός πρόγονος όλων των άλλων κόμβων του δέντρου, μπορούμε να φτιάξουμε ένα δέντρο με ρίζα (rooted tree). Τα δέντρα χωρίς ρίζα (unrooted trees) αναπαριστούν μόνο τη σχέση ανάμεσα στους κόμβους και δε μας δίνουν καμιά πληροφορία σχετικά με το εξελικτικό μονοπάτι που έχει ακολουθηθεί. Ωστόσο, ακόμα και στην περίπτωση των δέντρων χωρίς ρίζα, μπορεί συνήθως να προσδιοριστεί μια ρίζα χρησιμοποιώντας μια εξωομάδα, ώστε να προκύψει ένα δέντρο με ρίζα (Αλαχιώτης, 2007).

Επιλογή χαρακτήρων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων

Πριν την ανάπτυξη των τεχνικών ανάλυσης του DNA, οι χαρακτήρες επιλογής περιορίζονταν στο μορφολογικό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Έτσι, είχαν αναπτυχθεί κατάλληλα μορφολογικά κριτήρια που αφορούσαν διάφορες ομάδες οργανισμών, τα οποία θεωρούνταν ως κλειδιά για την αναγνώριση και τον διαχωρισμό των ειδών. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μορφολογικής σύγκρισης είχαν κατασκευαστεί κατά το παρελθόν φυλογενετικά δέντρα που απεικόνιζαν τις φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών, άλλοτε με ικανοποιητικά και άλλοτε με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Η αδυναμία αυτής της μεθόδου ήταν ότι τα χαρακτηριστικά που εξετάζονταν δεν ήταν διαθέσιμα για όλα τα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού, οπότε, για παράδειγμα, στα έντομα δε μπορούσε να γίνει αναγνώριση και διαχωρισμός των ειδών σε προνυμφικό στάδιο για πολλά είδη. Επίσης, σε είδη πολύ συγγενικά, ήταν αδύνατος ο διαχωρισμός τους με βάση αυτά τα κριτήρια. Από την άλλη πλευρά, η χρήση των ισοενζύμων για τέτοιου είδους μελέτες ήταν μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος στις αρχές του 1980, καθώς εμβάθυνε την ανάλυση σε μοριακό επίπεδο. Η χρήση της μεθόδου αυτής έχει εγκαταλειφθεί στις μέρες μας, λόγω της διαπίστωσης ότι η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών δεν εκφράζεται πάντα στις πρωτεΐνες, κυρίως λόγω της ύπαρξης συνώνυμων μεταλλάξεων στην αλληλουχία του DNA, οι οποίες εμφανίζουν τον ίδιο φαινότυπο.

Στις μέρες μας, η ραγδαία εξέλιξη τόσο των τεχνικών ανάλυσης των αλληλουχιών DNA όσο και η εξέλιξη των υπολογιστών και των προγραμμάτων βιοπληροφορικής, έχει επιτρέψει την χρήση κατάλληλων τμημάτων DNA για την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων και τη διαλεύκανση ταξινομικών προβλημάτων που είχαν προκύψει όλα αυτά τα χρόνια από την ασυμφωνία των προηγούμενων μεθόδων. Οι τεράστιες βάσεις δεδομένων αλληλουχιών που έχουν δημιουργηθεί (π.χ. GenBank) από ανεξάρτητες μελέτες ερευνητικών ομάδων, προσφέρουν μια πληθώρα επιλογών για τον ερευνητή όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου τμήματος DNA, καθιστώντας πιο εύκολο το σχεδιασμό εκκινήτων για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος με τη χρήση της τεχνικής της PCR. Τα τμήματα που επιλέγονται συνήθως είναι τμήματα γονιδίων ή και σπανιότερα μικροδορυφόροι. Ιδιαίτερα τα τμήματα του μιτοχονδριακού DNA, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, είναι αυτά που επιλέγονται συχνότερα για φυλογενετικές αναλύσεις.

Μοριακοί δείκτες στις φυλογενετικές μελέτες

Οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται ευρέως στην εξελικτική βιολογία και στις φυλογενετικές μελέτες, ενώ οι μοριακές μέθοδοι ανάλυσης βελτιώνονται με ταχείς ρυθμούς. Υπάρχει μια πληθώρα μοριακών δεικτών σε επίπεδο DNA. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι :

- Πολυμορφισμοί μεγέθους τμημάτων περιορισμού(RFLP) (Bostein *et al*, 1980) που αφορά στη παραγωγή τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού.

- Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD) (Williams et al, 1990) ο οποίος βασίζεται στο διαφορικό πολλαπλασιασμό, τυχαίων αλληλουχιών ενός δείγματος DNA. Η ταυτοποίηση τους επιτυγχάνεται μέσω PCR με ολιγονουκλεοτικούς εκκινητές(8-10 βάσεις)
- Μικροδορυφόροι, που αποτελούνται από διαδοχικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 1-6 βάσεων οι οποίες φέρουν εκατέρωθεν μοναδιαίες αλληλουχίες. Εμφανίζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού και εντοπίζονται σε πάρα πολλές διαφορετικές θέσεις του γονιδιώματος. (Queller et al, 1993)
- Αλληλουχίες DNA. Παλαιότερα, οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούνταν ευρέως στις φυλογενετικές μελέτες κυρίως λόγω του χαμηλού κόστους και της ταχύτητας εκτέλεσης τους σε σύγκριση με την αλληλούχηση του DNA. Ωστόσο, πλέον τόσο το κόστος όσο και ο χρόνος που απαιτείται για την αλληλούχηση έχουν μειωθεί δραματικά. Έτσι, η αλληλούχηση του DNA εφαρμόζεται πια πολύ συχνά στις φυλογενετικές μελέτες, καθώς συνιστά μια λεπτομερή και αναλυτική μέθοδο για την εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων γονιδιακών τμημάτων και γονιδίων.

Παρ όλα αυτά, σε μια συγκεκριμένη φυλογενετική ανάλυση είναι δυνατόν να απαιτείται η ανάλυση πολλαπλών μοριακών δεικτών που παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες.

.

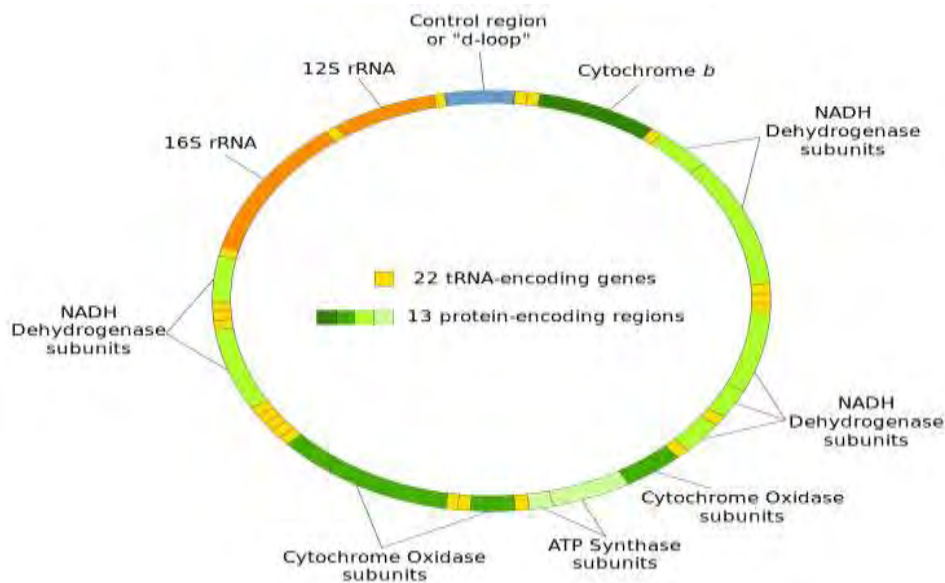
Το Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Οι μοριακές φυλογενετικές μελέτες στηρίζονται συνήθως στη χρήση μιτοχονδριακών γονιδίων. Το mtDNA ως μοριακός δείκτης χρησιμοποιείται ευρύτατα στις φυλογενετικές μελέτες. Τα περισσότερα μιτοχονδριακά γενώματα είναι κυκλικά, δίκλινα, υπερελικωμένα μόρια DNA (εικόνα 2). Γραμμικά μιτοχονδριακά γονιδιώματα εντοπίζονται σε μερικά πρωτόζωα και σε μερικούς μύκητες (π.χ. Cnophyta, Scyphozoa και Hydrozoa). Σε πολλές περιπτώσεις, το περιεχόμενο του mtDNA σε GC διαφέρει σημαντικά από το πυρηνικό και έτσι το mtDNA 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 μιτοχονδριακά γονιδιώματα διαφορετικών ειδών παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες ως προς τον αριθμό και τις λειτουργίες των γονιδίων τους. Το ζωικό mt DNA είναι ένα μικρό, εξωχρωμοσωμικό γονιδίωμα, που έχει συνήθως μέγεθος της τάξης των 16 kb. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα ζωικά μιτοχονδριακά γενώματα περιέχουν τα ίδια 37 γονίδια: 2 για rRNAs, 13 για πρωτεΐνες και 22 για tRNAs. Και τα 37 γονίδια που βρίσκονται σε ένα σύνθετο mtDNA 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). Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο αυτές οι περιοχές ελέγχου είναι ομόλογες μεταξύ απόμακρων ζωικών ειδών, ή εναλλακτικά έχουν προκύψει από διαφορετικές μη κωδικές αλληλουχίες ανεξάρτητα σε ξεχωριστές εξελικτικές γενεαλογίες, δεδομένου ότι δε μοιράζονται κάποια ομολογία στις

αλληλουχίες εκτός από τις περιπτώσεις που πρόκειται για στενά συγγενικά είδη(Boore,1999).

Τα προϊόντα αυτών των 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. 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 1 : Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού 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 μεταλλαξιγόνων, 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 φυλογενεσίες σε αρκετές περιπτώσεις όπου τα υπόλοιπα δεδομένα ήταν αμφίβολα, όπως έγινε με τις περιπτώσεις των μεγάλων ομάδων των εχινόδερμων και των αρθροπόδων.

Μιτοχονδριακά γονίδια και φυλογένεση

Η μελέτη των αλληλουχιών του mtDNA 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).

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).

Μια περιοχή που παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον σε φυλογενετικές μελέτες αν και δεν είναι μεταγραφικά ενεργή, είναι η περιοχή ελέγχου του μιτοχονδρίου γνωστή ως dloop. Ο ρόλος της δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς, ωστόσο θεωρείται ότι παίζει ρόλο κατά την αντιγραφή του mtDNA. Η dloop χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές μελέτες ως ουδέτερος εξελικτικά δείκτης μιας και δεν υφίσταται εξελικτική πίεση, οπότε παρουσιάζει πολύ υψηλά επίπεδα πολυμορφισμών.

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus* Pallas, 1778)

Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus europaeus*

Βασίλειο:	Ζώα
Φύλο:	Χορδωτά
Υπο-φύλο:	Σπονδυλωτά
Κλάση:	Θηλαστικά
Τάξη:	Λαγόμορφα
Οικογένεια:	Leporidae
Γένος:	<i>Lepus</i>
Είδος:	<i>europaeus</i>

Ο ευρωπαϊκός λαγός αποτελεί ένα κυρίαρχο στοιχείο της πανίδας των ανοιχτών εκτάσεων με μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων και ιδιαίτερη οικονομική σημασία, καθώς αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή θηράματα στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στη Βαλκανική χερσόνησο και στην Ελλάδα. Η εκτεταμένη κατανομή του και το γεγονός ότι οι πληθυσμοί του ανταποκρίνεται ταχύτατα στις αλλαγές ενδιαιτημάτων, το καθιστούν ένα είδος-μοντέλο, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε χρήσιμα συμπεράσματα για τη συμπεριφορά, τη βιολογία και την πληθυσμιακή δομή των άγριων πληθυσμών πολλών θηλαστικών.

Βιολογία του *Lepus europaeus*

Περιοχές διαβίωσης: η φυσική κατανομή του ευρωπαϊκού λαγού περιλαμβάνει τη Μεγάλη Βρετανία και τη δυτική Ευρώπη και εκτείνεται ως τη Μέση Ανατολή της κεντρικής Ασίας (Lincoln, 1974 ◊ Broekhuizen et al., 1980 ◊ Caillol et al., 1989 ◊ Poli et al., 1991). Ωστόσο, έχει εισαχθεί από τον άνθρωπο στην βόρεια και κεντρική Αμερική (Bonino et al., 1997) και στην Αυστραλία (Bonino et al., 1997 ◊ Caillol et al., 1989, Lincoln, 1974).

Κατοικία: οι ευρωπαϊκοί λαγοί προτιμούν τους αγρούς και τα λιβάδια που περιφράσσονται και τις περιοχές υλοτόμησης που βρίσκονται κοντά σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις (Peterson, 1966, Bansfield, 1974, William and Whitaker, 1943).

Φυσική περιγραφή: έχουν συνολικό μήκος 600-750mm. Το βάρος τους ποικίλλει από 3 έως 5 κιλά. Τα αυτιά τους είναι μακριά με μήκος 94-102mm και είναι γκρίζα στο εσωτερικό τους. Το τρίχωμα και το πρόσωπό τους είναι καστανό. Η ουρά τους έχει μήκος 72-110mm και είναι μαύρη στην κορυφή και άσπρη στο κάτω μέρος της

(Peterson 1966 ◦ Hall et al., 1959). Το χειμώνα ο ευρωπαϊκός λαγός δεν αλλάζει το τρίχωμά του σε άσπρο αλλά το τρίχωμα γίνεται ελαφρά πιο γκρι. Δεν υπάρχει αξιοσημείωτος φυλετικός διμορφισμός (Peterson 1966, Bansfield, 1974, Dragg 1974).

Αναπαραγωγή: η αναπαραγωγική περίοδος του *Lepus europaeus* είναι μεταξύ Ιανουαρίου/Φεβρουαρίου και Ιουνίου/Ιουλίου (Peterson 1966, Bansfield, 1974). Η περίοδος κυοφορίας κυμαίνεται από 30 έως 42 ημέρες. Ο απογαλακτισμός υπολογίζεται ότι διαρκεί ένα μήνα (Broekhuizen et al., 1980, Bansfield, 1974). Οι λαγοί γίνονται αναπαραγωγικά ώριμοι μετά από 8 έως 12 μήνες. Η μητέρα για να προστατέψει τα νεογέννητα, τα σκορπίζει σε μία μεγάλη περιοχή και στη συνέχεια κάνει κύκλους για να τα φροντίσει (Peterson 1966, Bansfield, 1974).

Συμπεριφορά: οι ευρωπαϊκοί λαγοί είναι κυρίως μοναχικά ζώα με εξαίρεση την περίοδο του ζευγαρώματος. Μπορούν να βλέπουν καλά ακόμη και σε χαμηλό φωτισμό και είναι νυκτόβιοι. Παραμένουν ενεργοί όλη τη διάρκεια του χρόνου. Έχουν ιδιαίτερα αναπτυγμένη την αίσθηση της όρασης, της ακοής και της όσφρησης. Υπό την απειλή κάποιου θηρευτή έχουν την ικανότητα να τρέξουν πολύ γρήγορα και να αλλάξουν κατεύθυνση εάν αυτό χρειαστεί. Είναι πολύ γρήγοροι και μπορούν να τρέξουν και με 60km/h στην ευθεία. Οι θηρευτές τους είναι οι αλεπούδες, οι λύκοι, τα γεράκια και οι κουκουβάγιες (Peterson 1966, Bansfield, 1974).

Διατροφικές συνήθειες: είναι ζώα φυτοφάγα και τρώνε χορτάρι και καρπούς δέντρων το καλοκαίρι. Το χειμώνα τρέφονται με κλαριά, βλαστούς και θάμνους (Peterson 1966, Bansfield, 1974, William and Whitaker, 1943).

Οικονομική σημασία για τον άνθρωπο: στην Αργεντινή και στην Αυστραλία αποτελεί πρόβλημα εξαιτίας της γρήγορης αναπαραγωγής και τη ζημιογόνο δράση του στις καλλιέργειες (Bonino et al., 1997, Bansfield, 1974 ◦ William and Whitaker, 1943). Στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική αποτελεί θηρεύσιμο είδος καθώς το κρέας του είναι εξαιρετικής ποιότητας (Bansfield, 1974, William and Whitaker, 1943).

Μοριακές πληθυσμιακές μελέτες του *Lepus europaeus* στην Ευρώπη

Η γνώση της γενετικής ποικιλότητας του ευρωπαϊκού λαγού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη κατανόηση της πληθυσμιακής δομής και δυναμικής αυτού του είδους υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρόλο που το είδος *L. europaeus* είναι αρκετά διαδεδομένο στην Ευρώπη, οι μελέτες που σχετίζονται με τη πληθυσμιακή δομή τόσο αυτού του είδους όσο και άλλων ειδών της οικογένειας και βασίζονται σε μοριακούς δείκτες, είναι περιορισμένες. Παρακάτω αναλύονται οι βασικότερες μοριακές μελέτες σε επίπεδο DNA, που αφορούν τον ευρωπαϊκό λαγό και είχαν δημοσιευτεί μέχρι την έναρξη της συγκεκριμένης εργασίας.

Πληθυσμιακές μελέτες με χρήση δεικτών mtDNA

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ολόκληρου του μιτοχονδριακού γενώματος του ευρωπαϊκού λαγού πραγματοποιήθηκε από τους Arnason *et al*, στο πλαίσιο της μελέτης των φυλογενετικών σχέσεων 60 ειδών θηλαστικών διάφορων ταξινομικών επιπέδων.

Η μελέτη των Thulin *et al*, (1997) σε πληθυσμούς *L. europaeus* και *L. timidus* της Σουηδίας βασίστηκε στην ανάλυση του mtDNA με τη μέθοδο RFLP. Στους πληθυσμούς *L. europaeus*, ανιχνεύθηκε χαμηλή απλοτυπική διαφοροποίηση, γεγονός το οποίο οφείλεται στο ότι οι πληθυσμοί του *L. europaeus* στις Σκανδιναβικές χώρες εισήχθησαν από περιοχές της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης, στις οποίες παρατηρείται χαμηλό επίπεδο γενετικής ποικιλότητας. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από την ερευνα στην οποία βρέθηκε χαμηλή διαφοροποίηση σε επίπεδο σε πληθυσμούς της Αυστρίας. Επίσης τα αποτελέσματα ανέδειξαν τον υβριδισμό φυσικών πληθυσμών, γεγονός που είχε ήδη παρατηρηθεί σε κατάσταση αιχμαλωσίας.

Υψηλός βαθμός ενδοειδικής διαφοροποίησης του mtDNA παρατηρήθηκε στο είδος *L. europaeus* στην Ιβηρική χερσόνησο, από τους Perez-Suarez *et al*, (1994) το οποίο αποτελεί ένδειξη υβριδισμού του *L. europaeus* με τα είδη *L. castroviejoi* και *L. granatensis* που συνυπάρχουν στη περιοχή.

Οι Fickel *et al*, (2008) αναλύοντας αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου (control region, CR) σε πληθυσμούς ευρωπαϊκού λαγού από επτά ευρωπαϊκές χώρες, απέδειξαν ότι η ιταλική χερσόνησος αποτέλεσε ένα επιπλέον καταφύγιο για τους λαγούς εκτός από τη Βαλκανική και τη Μικρά Ασία, κατά την τελευταία περίοδο των Παγετώνων, από τις οποίες προέκυψε η επαναποικίση των χωρών της κεντρικής Ευρώπης.

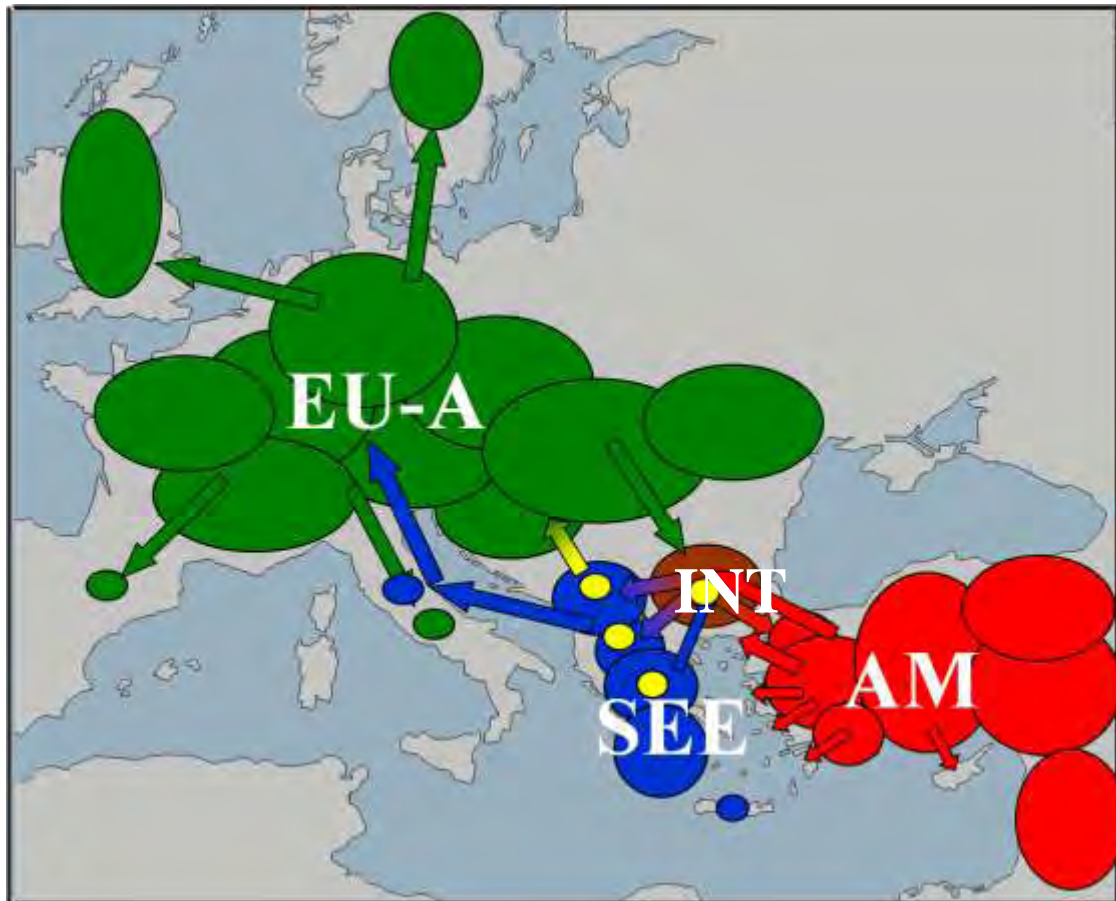
Οι Kasapidis *et al*, μελέτησαν τη φυλογεωγραφική κατάσταση του ευρωπαϊκού λαγού, αναλύοντας αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου του από 98 λαγούς από ηπειρωτική και νησιωτική Ελλάδα, τη Βουλγαρία, την Κύπρο και το βόρειο Ισραήλ καθώς και 44 δημοσιευμένες αλληλουχίες που προέρχονταν από λαγούς της κεντρικής Ευρώπης και της Ιταλίας. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν δύο διακριτούς τύπους mtDNA, έναν ανατολικό τύπο και έναν δυτικό τύπο, με μέση νουκλεοτιδική διαφοροποίηση 6,6%. Ο ανατολικός τύπος περιλαμβάνει απλότυπους από τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου, τη Κύπρο, το βόρειο Ισραήλ, τη Θράκη και την ανατολική Μακεδονία, στο δυτικό τύπο περιλαμβάνονται οι απλότυποι από τη Κρήτη τη Λευκάδα, τη Νάξο, τα Κύθηρα και την ηπειρωτική Ελλάδα καθώς και οι απλότυποι της Αυστρίας, της Ουγγαρίας, της Γερμανίας, της Σερβίας, της Ιταλίας, της Ρουμανίας και της Βουλγαρίας. Μια ζώνη επικάλυψης των δύο τύπων εντοπίζεται στη περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας.

Οι Mamuris *et al*, (2001) μελέτησαν τη γενετική διαφοροποίηση και τη φυλογενετική κατάσταση πληθυσμών του ευρωπαϊκού λαγού της κεντρικής Ελλάδας, καθώς και την επίδραση των απελευθερώσεων εκτρεφόμενων ατόμων στη γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν τμήματα του mtDNA με τη μέθοδο RFLP-PCR. Η ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε εκτεταμένη απλοτυπική ποικιλότητα εντός και μεταξύ των φυσικών πληθυσμών (42 από τους 56 απλότυπους ήταν μοναδικοί). Η απλοτυπική ποικιλότητα ήτα εξίσου κατανομημένη εντός και μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών, ενώ η ετερογένεια των απλοτυπικών συχνοτήτων υπέδειξε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας. Επιπλέον προσδιορίστηκαν συγκεκριμένα πρότυπα, τα οποία διαφοροποιούσαν εντελώς τους εκτρεφόμενους από τους φυσικούς πληθυσμούς και αποδείκνυαν σε μεγάλο βαθμό την ύπαρξη εκτρεφόμενων λαγών εντός των φυσικών πληθυσμών, πιθανόν από παλιότερες απελευθερώσεις. Επίσης η ανάλυση του mtDNA απέδειξε τη διείσδυση αλλόχθονων γονιδιακών αποθεμάτων στους φυσικούς πληθυσμούς. Έτσι

για να διατηρηθούν οι γηγενείς γονότυποι και να προληφθεί η μείωση της γενετικής ποικιλότητας προτάθηκε να σταματήσουν τα προγράμματα εμπλουτισμού και να αναπτυχθούν κατάλληλα προγράμματα διαχείρισης προσαρμοσμένα στη δυναμική των φυσικών πληθυσμών.

Στη μελέτη των Stamatis C. *et al* (2009) πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο σε τρία τμήματα του γονιδιώματος (cytb/CR, COI 12S/16S rRna). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 926 δείγματα ευρωπαϊκού λαγού, από 33 περιοχές δειγματοληψίας που προέρχονταν από 15 χώρες της Ευρώπης και της Ασίας. Επιπλέον αναλύθηκαν αλληλουχίες της περιοχής έλεγχου του *L. europaeus* από 69 δείγματα λαγού, αντιπροσωπευτικά από όλες τις περιοχές δειγματοληψίας, οι οποίες συγκριθήκαν με 137 αλληλουχίες από τη τράπεζα δεδομένων. από την ανάλυση με τη μέθοδο, προέκυψαν 112 απλότυποι οι οποίοι ομαδοποιούνται σε πέντε σαφώς διαχωρισμένες φυλογεωγραφικές απλοομάδες (εικόνα 2) οι οποίες είναι οι εξής:

1. Νοτιανατολικού Ευρωπαϊκού τύπου Απλοομάδα (SEEH)
2. Ανατολικού- Μεσανατολικού τύπου Απλοομάδα (AMh)
3. Ευρωπαϊκού τύπου Απλοομάδα- Υποομάδα Α (EUh-A)
4. Ευρωπαϊκού τύπου Απλοομάδα- Υποομάδα Β (EUh-B)
5. Ενδιάμεση Απλοομάδα (INTERh)



Εικόνα 2: Οι τρεις βασικές απλοομάδες των πληθυσμών του *L. europaeus* και η ζώνη επικάλυψης, όπως προέκυψαν από προηγούμενες μελέτες. Στο διάγραμμα απεικονίζονται επίσης τα πιθανά σενάρια για την επαναποικίση της Ευρώπης από πληθυσμούς του ευρωπαϊκού λαγού από τα καταφύγια της Μικράς Ασίας και της Βαλκανικής χερσονήσου κατά το τέλος της τελευταίας περιόδου των παγετώνων. (Stamatis C. et al.2011).

Στην εργασία των Stamatis et al (2008) αναλύθηκαν μετά από αλληλούχηση γονίδια σε δείγματα ευρωπαϊκού λαγού από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας. Μελετήθηκαν οι ενδο- και δια-ειδικές μεταλλάξεις με σκοπό να εξηγηθούν οι φυλογενετικές διαφοροποιήσεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για το trna της θρεονίνης και το trna της προλίνης, δυο γονίδια που εντοπίζονται κοντά στη περιοχή έλεγχου dloop, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες που εξετάζουν τις φυλογενετικές, εξελικτικές και φυτογεωγραφικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών αλλά και μέσα στο ίδιο είδος. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των αλληλουχιών αυτών συμφωνούν με τη φυτογεωγραφική κατανομή των πληθυσμών του λαγού, που προέκυψε από ανάλυση της περιοχής d-loop (Stamatis et al., 2009). Οι μεταλλάξεις στα δυο αυτά γονίδια σχετίζονται με μια ευδιάκριτη γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών του λαγού. Το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίστηκαν σε μεγάλο αριθμό ατόμων υποδεικνύει πως δεν επηρεάζονται, προς το παρόν, από τη πίεση της φυσικής επιλογής.

Στην εργασία των Mamuris et al, (2010) πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αλληλουχιών του κυτοχρώματος b, σε δείγματα 75 λαγών αντιπροσωπευτικών των χωρών και των απλοομάδων που περιγράφηκαν στην εργασία των Stamatis et al

(2009). Από αυτή την ανάλυση προέκυψαν 57 διαφορετικές αλληλουχίες, οι οποίες ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις απλοομάδες : την απλοομάδα, που βρέθηκε στην Ευρώπη, εκτός της Ελλάδας, τις απλοομάδες οι οποίες εντοπίστηκαν στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία και την απλοομάδα η οποία εντοπίστηκε στη Βουλγαρία, τη βορειανατολική Ελλάδα, τη Τουρκία και το Ισραήλ. Η ανάλυση αυτή επιβεβαίωσε την ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών απλοομάδων γεωγραφικά καθορισμένων σε Ευρώπη και Ανατολή, όπως αυτές είχαν προκύψει από προηγούμενες μελέτες, (2008,2009) όπως επίσης και το σαφή διαχωρισμό των ευρωπαϊκών λαγών της Ανατολής από τους λαγούς της Ευρώπης σε επίπεδο mtDNA.(2009)

Πληθυσμιακές μελέτες με χρήση δεικτών του πυρηνικού γονιδιώματος

Οι Fickel *et al*, (1999) χρησιμοποίησαν τέσσερις μικροδορυφορικούς γενετικούς τόπους καθώς και τη περιοχή ελέγχου του mtDNA για να μελετήσουν τη γενετική δομή και ποικιλότητα δυο πληθυσμών στη περιοχή της Βεστφαλίας της Γερμανίας. Από τη κατανομή των αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων δε προέκυψε καμία διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών, ενώ αντιθέτως από τη κατανομή των απλοτύπων του mtDNA οι δυο πληθυσμοί εμφανίζονται γενετικά δομημένοι και σημαντικά διαφοροποιημένοι μεταξύ τους, αποδεικνύοντας ότι η μητρική γονιδιακή ροή είναι πολύ περιορισμένη.

Οι Putze *et al*, (2007) χρησιμοποίησαν δέκα νέους μοριακούς δείκτες για το χρωμόσωμα Y του ευρωπαϊκού λαγού , οι οποίοι είναι κατάλληλοι για προσδιορισμό του φύλου στα άτομα ενός πληθυσμού καθώς και για τη διερεύνηση της γενετικής δομής και της γονιδιακής ροής στους πληθυσμούς του σε επίπεδο πυρηνικού DNA και κυρίως σε γονίδια που κληρονομούνται πατρικά.

Η μέθοδος RAPD χρησιμοποιήθηκε από τους Mamuris *et al*, (2002) για να εκτιμηθεί η γενετική διαφοροποίηση πληθυσμών του ευρωπαϊκού λαγού από τη κεντρική Ελλάδα. Οι ελληνικού φυσικοί πληθυσμοί συγκρίθηκαν με δείγματα από την Αυστρία, τη Γερμανία, τη Βουλγαρία, τη Πολωνία και τη Γαλλία καθώς επίσης και με εκτρεφόμενους λαγούς που χρησιμοποιούνται σε απελευθερώσεις, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των απελευθερώσεων στη γενετική σύνθεση των γηγενών πληθυσμών. Η απουσία διαγνωστικών ζωνών, που θα μπορούσαν να διαχωρίσουν πληθυσμούς λαγού, επιβεβαίωσε την ύπαρξη υψηλής πυρηνικής γονιδιακής ροής μεταξύ απομακρυσμένων πληθυσμών λαγού. Τα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν από τις γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν από τις συχνότητες των ζωνών RAPD, υπόδειξαν ένα κύριο σημείο διαχωρισμού της γενεαλογίας του πυρηνικού DNA. Τα εκτρεφόμενα άτομα, ομαδοποιήθηκαν με τους πληθυσμούς της Γερμανίας, της Αυστρίας, της Πολωνίας και της Γαλλίας, ενώ οι πληθυσμοί της Ελλάδας διαφοροποιήθηκαν και ομαδοποιήθηκαν με τους πληθυσμούς της Βουλγαρίας. Η διαφοροποίηση των φυσικών πληθυσμών στην Ελλάδα δεν ακολούθησε κάποια γεωγραφική τάση, καθώς η γενετική τους απόκλιση δε φάνηκε να σχετίζεται με τις γεωγραφικές αποστάσεις. Ωστόσο ορισμένα πρότυπα RAPD εκτρεφόμενων και άγριων λαγών ήταν πολύ διαφορετικά από το κοινό πρότυπο που βρέθηκε στη συντριπτική πλειοψηφία των λαγών που μελετήθηκαν, γεγονός που πιθανώς να αντανάκλα την ανάμιξη γενετικά διαφοροποιημένων ατόμων. Η ανάλυση RAPD έδειξε ότι οι απελευθερώσεις των εκτρεφόμενων λαγών είχαν ήδη αρχίσει να επηρεάζουν τη γενετική δομή των ελληνικών πληθυσμών.

Στην εργασία ,Mamuris *et al*, (2010) παράλληλα με την ανάλυση του κυτοχρώματος b, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Y, του

ευρωπαϊκού λαού οι οποίοι κληρονομούνται μονογονεϊκά με σκοπό να συγκριθεί το πρότυπο κατανομής της γονιδιακής τους ροής με αυτό του mtDNA αλλά και με δείκτες που κληρονομούνται διγονεϊκά (RAPDs, αλλοένζυμα, μικροδορυφόροι). Η πληθυσμιακή ανάλυση αποκάλυψε τρεις διαφορετικές αλληλουχίες για το εξόνιο *SRY* (EX-A, EX-B, EX-C) και δυο αλληλουχίες για το ιντρόνιο *DBY* (IN-A, IN-B). Οι λαοί που αναλύθηκαν σε αυτή την εργασία είχαν προηγουμένως αναλυθεί σε επίπεδο mtDNA, (Stamatis et al, 2009) δίνοντας τη δυνατότητα για σύγκριση των αποτελεσμάτων των δυο δεικτών που κληρονομούνται μονογονεϊκά. Επίσης τα ίδια δείγματα είχαν μελετηθεί ως προς τη γενετική τους διαφοροποίηση σε επίπεδο πυρηνικού DNA, χρησιμοποιώντας δείκτες μικροδορυφόρων, αλλοενζύμων και RAPDs. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ένα γενικευμένο πρότυπο πληθυσμιακής ποικιλομορφίας και διαφοροποίησης, με σχετικά μεγάλο αριθμό μοναδικών αλληλομόρφων αλλά και ενδείξεις για παρουσία γενετικής ροής ανάμεσα σε πληθυσμούς που βρίσκονται σε γειτονικές περιοχές (Mamuris et al 2002, Suchentrunk et al 2003, Sert et al 2005, Ben Slimen et al 2008). Αντίθετα τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεικτών του Y χρωμοσώματος υποδηλώνουν τη παρουσία δύο κύριων φυλογενετικών κλάδων για τον ευρωπαϊκό λαό, ανάμεσα στην Ευρώπη και την Ανατολή

Σκοπός

Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε πληθυσμιακή ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ευρωπαϊκού λαού σε ένα εκτεταμένο δίκτυο δειγματοληψίας σε ελληνικά νησιά, στη Κύπρο, στη Νέα Ζηλανδία, στη Μεγάλη Βρετανία, καθώς και στην ηπειρωτική Ελλάδα και την Τουρκία. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δείγματα από προηγούμενες μελέτες, από την κεντρική Ευρώπη. Η μελέτη στηρίχτηκε στην ανάλυση δυο μοριακών δεικτών του mtDNA του γονιδίου του Cytb και της περιοχής ελέγχου D-loop με χρήση τεχνικών όπως PCR, PCR-SSCP και αλληλούχηση DNA. Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση των αποτελεσμάτων με προγράμματα βιοπληροφορικής. Βασικός στόχος της εργασίας ήταν να διερευνηθεί το κατά πόσον διαφοροποιείται η γενετική δομή και οι ρυθμοί φυλογένεσης των νησιωτικών πληθυσμών του ευρωπαϊκού λαού σε σχέση με τους ηπειρωτικούς πληθυσμούς, εξαιτίας της γεωγραφικής και συνεπώς αναπαραγωγικής, απομόνωσης που αυτοί υφίστανται.

Αντιδραστήρια

Υλικά και μέθοδοι

Acetic Acid
Acrylamide
Agarose
Bis-Acrylamide
Ammonium persulfate
2-propanol
Bromophenol Blue
Boric acid
Xylene Cyanol
Chloroform
NaCl
SDS
dNTPs
EDTA
Ethidium bromide
EtOH
Proteinase K
Glycerol
HCl 37%
Formamide
NaOH
Formaldehyde
MgCl₂ x 6H₂O
NaBH₄
Phenol
Potassium Acetate
TEMED
Tris Base
AgNO₃
100bp Ladder

ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ DNA

Taq (KapaTaq)

Μέθοδοι

Δείγματα

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό από 188 συνολικά δείγματα του είδους *Lepus europaeus* από ένα εκτεταμένο δίκτυο δειγματοληψίας. Όσον αφορά τη προέλευση των δειγμάτων, 157 προέρχονται από νησιωτικούς πληθυσμούς και τα υπόλοιπα 31 από ηπειρωτικούς. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν 37 δείγματα από τη Κύπρο, 6 από τη Ρόδο, 8 από τη Μυτιλήνη, 16 από τη Χίο, 24 από τη Σάμο, 37 από τη Νέα Ζηλανδία, 29 από το Ηνωμένο Βασίλειο και 31 δείγματα από τις ακτές της Τουρκίας.

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν για λόγους σύγκρισης δημοσιευμένες αλληλουχίες στο διαδίκτυο των υπό μελέτη γενετικών τόπων από προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από την ηπειρωτική Ελλάδα και την Ευρώπη.

Απομόνωση του DNA

Για τη μελέτη των απλοτύπων 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 mtDNA. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle, (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

Για τη μελέτη των απλοτύπων του mtDNA, 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 mtDNA. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle, (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

CH₃COONa 0,5M (200ml)

- 8,20 gr CH₃COONa
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

- 5 gr SDS
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

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

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα eppendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 0,5ml CH_3COONa 0,5M, 20μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K 10mg/ml.
2. Επιάζουμε τα δείγματα στους 55° C για μια ώρα.
3. Μετά την επώαση, προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά
5. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf και προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε έντονα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
7. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf.
8. Προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
10. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf.
11. Προσθέτουμε 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη, αναδεύουμε ήπια.
12. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20° C για 20 λεπτά.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
14. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσπαθώντας να διατηρήσουμε ανέπαφο το ίζημα που εμφανίζεται.
15. Προσθέτουμε 1ml αλκοόλη 70%, αναδεύουμε ήπια.
16. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 λεπτά.
17. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
18. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37° C, ώστε να ξηρανθεί το ίζημα από τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων.
19. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl ddH₂O και τοποθετούμε τα δείγματα είτε στο ψυγείο (4° C) είτε στην κατάψυξη (-20° C).

Μετά το βήμα 11, υπάρχει πιθανότητα να εμφανιστούν ινίδια DNA, τα οποία μπορούμε να τα συλλέξουμε με τη βοήθεια μιας λαβίδας και να συνεχίσουμε τη διαδικασία από το βήμα 15.

Το διάλυμα οξικού νατρίου χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης καθώς επίσης αποδιατάσσει

τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η proteinase K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και αυτή προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση του τμήματος της μιτοχονδριακής περιοχής που περιλαμβάνει τη d-loop, δύο trnas και ένα μέρος του γονιδίου του cytb πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Για την ενίσχυση του τμήματος του mtDNA χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές (Pierpaoli et al., 1999)

Εκκινητής	Αλληλουχία
LepCyb2L	5'-GAAACTGGCTCCAATAACCC-3'
LepD2H	5'-ATTTAAGAGGAACGTGTGGG-3'

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων για το control region του mtDNA περιγράφεται στον πίνακα 1

Πίνακας 1 : Συστατικά αντίδρασης PCR

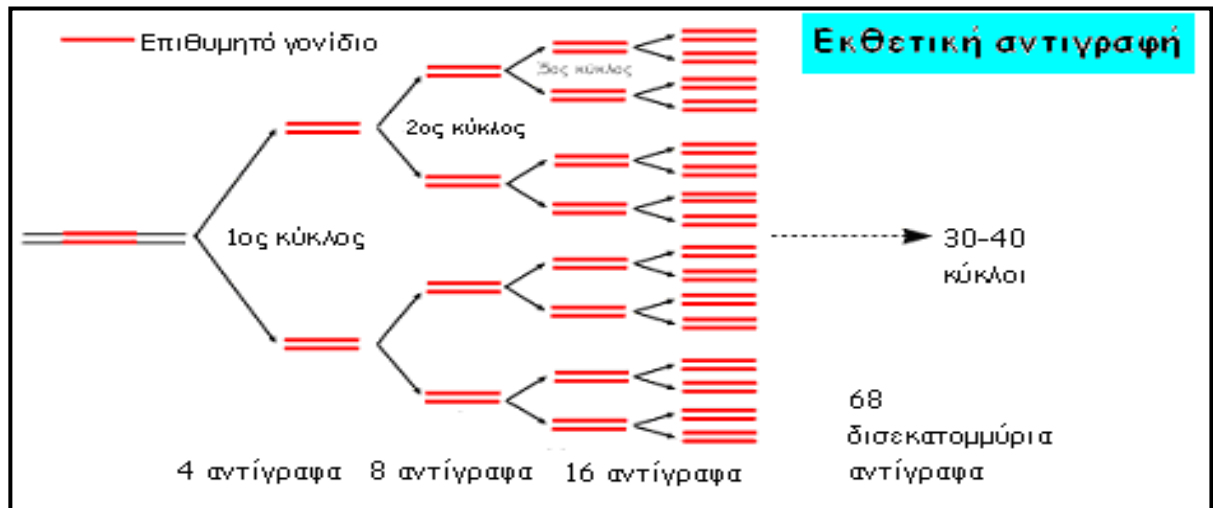
Εκμαγείο DNA	1μl
dNTPs (10mM each)	1 μl
Buffer 10x	5 μl
Εκκινητής Fw 50pmol/μl	1 μl
Εκκινητής Rv 50pmol/μl	1 μl
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2 μl
ddH ₂ O	39,8μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του mtDNA είναι :

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 5 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec
Υβριδοποίηση: 52° C για 50sec
Επιμήκυνση: 72° C για 1.30 min
Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

35 κύκλοι



Εικόνα 3: στάδια PCR

Τα προϊόντα PCR στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 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
ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1ml 1% w/v
TBE 20x 0,5ml
Glycerol 5ml
ddH₂O 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 3μl 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 πηκτή 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 πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων PCR που χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω πειράματα για την ανάλυση των πολυμορφισμών.

Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα (denaturation buffer), η σύσταση του οποίου είναι η εξής:

Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

Σε 5-7μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλινα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλινη κατάσταση.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

Ακρυλαμίδη 75gr
Bis-acrylamide 2gr
ddH₂O έως τα 200ml
TBE 10x (2lt)
Tris Base 121 gr
Boric acid 81,5gr
EDTA 0,5M 80ml
ddH₂O έως τα 2lt

Glycerol 50% v/v
APS 20% w/v
TEMED

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

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

Πίνακας 2 : Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

	8%
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	10,6ml
Glycerol 50%	8ml
TBE 10x	5ml
TEMED	50μl
APS 20%	350μl
H ₂ O	Έως τα 50ml
Συνολικός όγκος	50ml

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.

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (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 φορμαλδεΰδη, 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
ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO₃ 1gr/lit

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH₄ 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH₂O 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 1 min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και οι πηκτές αναδεύονται για 20min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1 min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

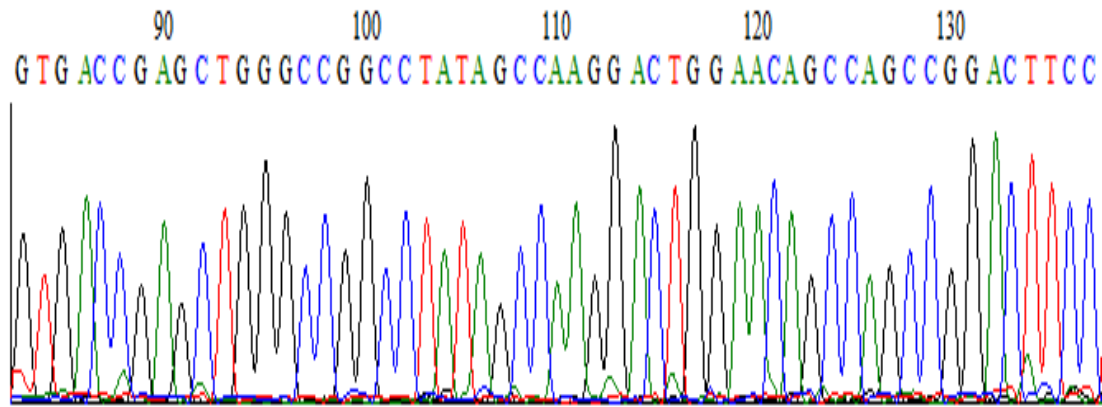
Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέγονται 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για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

Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Για την πληθυσμιακή μελέτη και τη κατασκευή φυλογενετικών δέντρων, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τις αλληλουχίες των γονιδίων των ατόμων των οποίων ερευνούμε τις φυλογενετικές σχέσεις. Γι' αυτό το λόγο, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να απαλλαγθούν από την παρουσία παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και να ακολουθήσουμε με την περαιτέρω ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής. (Bioedit, MEGA)

Ανάλυση χρωματογραφήματος αλληλούχησης

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Στο γράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαρατίθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή (Thompson et al, 1997). Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.



Εικόνα 4

Στην εικόνα φαίνεται το χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση ενός τυχαίου τμήματος μιας ακολουθίας (sequencing) με τη βοήθεια του προγράμματος Bioedit 7.0

Σύγκριση αλληλουχιών – Φυλογενετική και πληθυσμιακή ανάλυση

Οι αλληλουχίες που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν τον καθένα από τους διαφορετικούς απλότυπους. Για την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των απλοτύπων της ανάλυσης, χρησιμοποιούμε το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al, 2007). Με τη χρήση αυτού του προγράμματος, είναι δυνατή η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών, η εύρεση των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων ανάμεσα στους απλότυπους, η εύρεση της επί τοις εκατό σύστασης σε νουκλεοτίδια, καθώς και ο προσδιορισμός των αλλαγών στην αμινοξική αλληλουχία, με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα. Τέλος, το πρόγραμμα προσφέρει την δυνατότητα της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου με το επιθυμητό μοντέλο (NJ,UPGMA,ML,MP), όπως και τον έλεγχο bootstrap για το κατασκευασμένο δέντρο, ο οποίος είναι ενδεικτικός για την αξιοπιστία των δέντρων που προκύπτουν. Για την αναλυτικότερη φυλογενετική και πληθυσμιακή μελέτη χρησιμοποιήσαμε επίσης τα προγράμματα Network και Arlequin.

Αποτελέσματα

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl και τιμές A^{260}/A^{280} κοντά στο 2. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης 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 mtDNA (εικ 2).



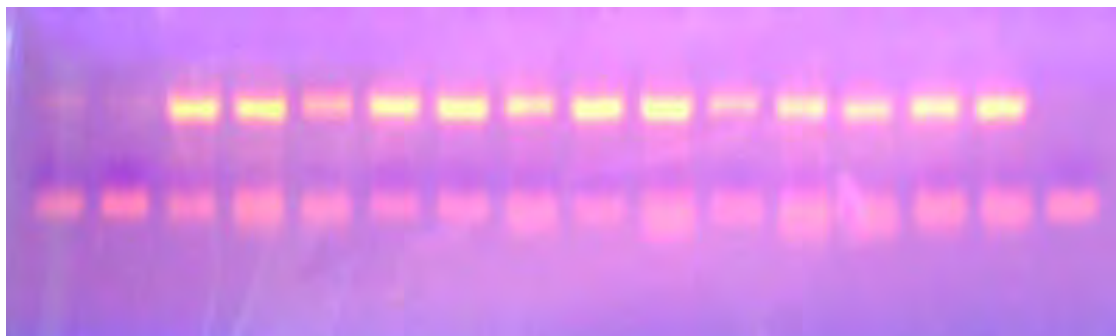
→ MtDNA

Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών, ενισχύθηκε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος μήκους 1170 βάσεων και περιλαμβάνει τη d-loop, δυο trnas και ένα μέρος του cyt b. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%, 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 1000 ζευγών βάσεων και φαινόταν να έχει το ίδιο μέγεθος για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Επίσης στα περισσότερα δείγματα παρατηρήθηκε μια ζώνη παραπροϊόντων που απομακρύνθηκε κατά των καθαρισμό τους.

→ PCR προϊόν



Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR

Καθαρισμός DNA

Μετά την PCR και την ηλεκτροφόρηση, παρατηρήθηκε μια ζώνη παραπροϊόντων. Προκειμένου να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν, πραγματοποιήθηκε απομόνωση από πηκτή αγαρόζης (gel extraction) με βάση το πρωτόκολλο του kit της Macherey-Nagel (Nucleospin Gel and PCR Clean-up). Μετά τον καθαρισμό ακολούθησε εκ νέου ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% για την πιστοποίηση της καθαρότητας του προϊόντος.

Αλληλούχηση

Μετά τον καθαρισμό των PCR προϊόντων έγινε επιλογή δειγμάτων τα οποία εστάλησαν για αλληλούχηση. Στην αντίδραση της αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκε ο ένας από τους δυο εκκινητές και συγκεκριμένα ο

Οι αλληλουχίες που ελήφθησαν στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων MEGA 4,1 και Bioedit 7. Από τα συνολικά 192 δείγματα που αλληλουχήθηκαν πραγματοποιήθηκε ανάλυση της d-loop σε 104 από αυτά ενώ για το τμήμα του cyt**b** έγινε ανάλυση σε 146. Η αλληλουχία που ανακτήθηκε τελικά από τα γραφήματα της αλληλούχησης για κάθε δείγμα είχε μέγεθος 459 βάσεις για το cyt**b** και 412 για το d-loop. Τα δυο trn**a**s που περιλαμβάνονταν στην συνολική αλληλουχία που απομονώθηκε δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν 10 δημοσιευμένες αλληλουχίες από την ηπειρωτική Ελλάδα και δέκα από την ηπειρωτική Ευρώπη για το cyt**b** και d-loop, οπότε συνολικά αναλύθηκαν 166 cyt**b** και 140 d-loop αλληλουχίες. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται ξεχωριστά παρακάτω.

Τα δείγματα χωρίστηκαν βάσει της προέλευσης τους σε δέκα πληθυσμιακές ομάδες (Κύπρος, Τουρκία, Σάμος, Μυτιλήνη, Χίος, Ρόδος, Ηνωμένο Βασίλειο, Νέα Ζηλανδία, ηπειρωτική Ελλάδα και ηπειρωτική Ευρώπη)

Μετά την ανάλυση με τη χρήση του MEGA 4.1 και του arlequin βρέθηκαν 51 διαφορετικοί απλότυποι για το cytb και 112 για το d-loop. Οι αλληλουχίες των απλοτύπων αναγράφονται στη συνέχεια.

ΑΝΑΛΥΣΗ Cytb

Απλότυποι

1)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTCGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCCATCCCTAATAAACTAGGTGGAGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGCAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATTGGAGGGCAACCAGTTGAGCACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTTACTTCTCCATTATCCTCATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

2)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTCGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCCATCCCTAATAAACTAGGTGGTGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGCAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATTGGAGGGCAACCAGTTGAGCACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTTACTTCTCCATTATCCTCATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

3)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTCGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCCATCCCTAATAAACTAGGTGGAGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGCAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATTGGAGGGCAACCAGTTGAGCACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTTACTTCTCCATTATCCTCATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

4)AAAGACGCGCTAGGATTTCTGATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTCGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCCATCCCTAATAAACTAGGTGGAGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGCAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATTGGAGGGCAACCAGTTGAGCACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTTACTTCTCCATTATCCTCATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

5)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTCATTCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTATTCTCCCCTGATCTTCTCGGGG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAGTGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCTATCCCTAATAAACTAGGTGGTGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGTAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATTGGAGGACAACCAGTTGAACACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTACTTCTCCATCATCCTTATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

6)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTCGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCCATCCCTAATAAACTAGGTGGTGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGCAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATTGGAGGACAACCAGTTGAGCACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTACTTCTCCATTATCCTCATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

7)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTCGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCCATCCCTAATAAACTAGGTGGTGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGCAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATTGGAGGGCAACCAGTTGAGCACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTACTTCTCCATTATCCTCATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

8)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTTGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC
TACGCCATCCTACGTTCCATCCCTAATAAACTAGGTGGTGTCTAGCCCTAGTTATATCAATTCTTATCCTAGCAAT
TATCCCTTCCTTCATATATCCAAACAACGCAGCATAAATATCCGCCCCATTAGCCAAGTCCTTTTCTGAATCCTTG
TCGCAGACCTTCTTACACTCACATGAATCGGAGGGCAACCAGTTGAGCACCCCTTATCACTATTGGTCAAGTAGC
ATCTATCCTTTACTTCTCCATTATCCTCATCCTCATACCTCTCGCAAGCCTAGTCGAGAATAAAATCCTCAAATGA

9)AAAGACGCGCTAGGATTTCTTATACTTATCCTCCTGCTCATACTCCTAGTCTTGTCTCCCCTGATCTTCTCGGAG
ACCCAGACAATTATACCCCTGCCAACCCCTCAACACTCCTCCTCACATCAAACCTGAATGATATTTCTATTTGCC

Νουκλεοτιδική Ανάλυση

Με τη χρήση του προγράμματος MEGA 4.1, ήταν δυνατός ο υπολογισμός του ποσοστού εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες. Το ποσοστό A+T ήταν 62,2% και το G+C ήταν 37,8% κατά μέσο όρο.

Επίσης, προσδιορίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες. Συνολικά, βρέθηκαν 63 πολυμορφικές θέσεις, εκ των οποίων οι 40 είναι πληροφοριακές για τη φειδωλότητα, ενώ οι υπόλοιπες 23 βρίσκονταν σε μεμονωμένα δείγματα.

Αμινοξική Ανάλυση

Η μετάφραση των αλληλουχιών με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα (μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας των σπονδυλωτών) δεν αποκάλυψε κωδικόνιο λήξης σε κάποια αλληλουχία, ούτε κάποια προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίου (indels) οπότε πράγματι η αλληλουχία μας είναι η λειτουργική μιτοχονδριακή και δεν ενισχύθηκε κάποιο πυρηνικό ψευδογονίδιο. Επίσης, εντοπίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις των αμινοξικών αλληλουχιών, οι οποίες ήταν 17, εκ των οποίων οι 8 εμφανίζονται σε περισσότερα. Συγκρίνοντας τα επίπεδα της ποικιλομορφίας των νουκλεοτιδικών και των αμινοξικών αλληλουχιών (63 πολυμορφικές θέσεις έναντι 17), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι συνώνυμες, δηλαδή τα κωδικόνια που προκύπτουν από τις καινούργιες τριπλέτες κωδικοποιούν για το ίδιο αμινοξύ.

Γενετικές Αποστάσεις μέσα στους πληθυσμούς

Οι μέσες γενετικές διαφοροποιήσεις μέσα στους πληθυσμούς, όπως υπολογίστηκαν με τη χρήση του MEGA 4.1 είναι πολύ μικρές, με την ελάχιστη να παρατηρείται στο πληθυσμό της Νέας Ζηλανδίας και να ισούται με 0,002% ενώ η μέγιστη παρατηρείται στο πληθυσμό της Σάμου και είναι ίση με 0,016% (πίνακας 3)

CYPRUS	0,012
NZEAL	0,002
MYT	0,009
RODOS	0,010
CHIOS	0,006
SAM	0,016
ANATOLIA	0,007
UK	0,001
GREECE	0,009
EUROPE	0,009

Πίνακας 3: Γενετικές αποστάσεις μέσα στους πληθυσμούς (cytb)

Γενετικές Αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς

Με βάση τον πίνακα, παρατηρούμε ότι οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις εμφανίζονται ανάμεσα στους πληθυσμούς από το Ηνωμένο Βασίλειο, την ηπειρωτική Ευρώπη και τη Νέα Ζηλανδία και τους πληθυσμούς από τα νησιά του Αιγαίου, τη Κύπρο, τη Τουρκία και την ηπειρωτική Ελλάδα. Αντίστοιχα οι ανατολικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν ελάχιστες γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους, το ίδιο και οι ευρωπαϊκοί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα οι αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς της Κύπρου και της Νέας Ζηλανδίας(0,030%), της Κύπρου και του Ηνωμένου Βασιλείου (0,031%) αλλά και της Κύπρου και της ηπειρωτικής Ευρώπης και Ελλάδας (0,034%) (πίνακας 4)

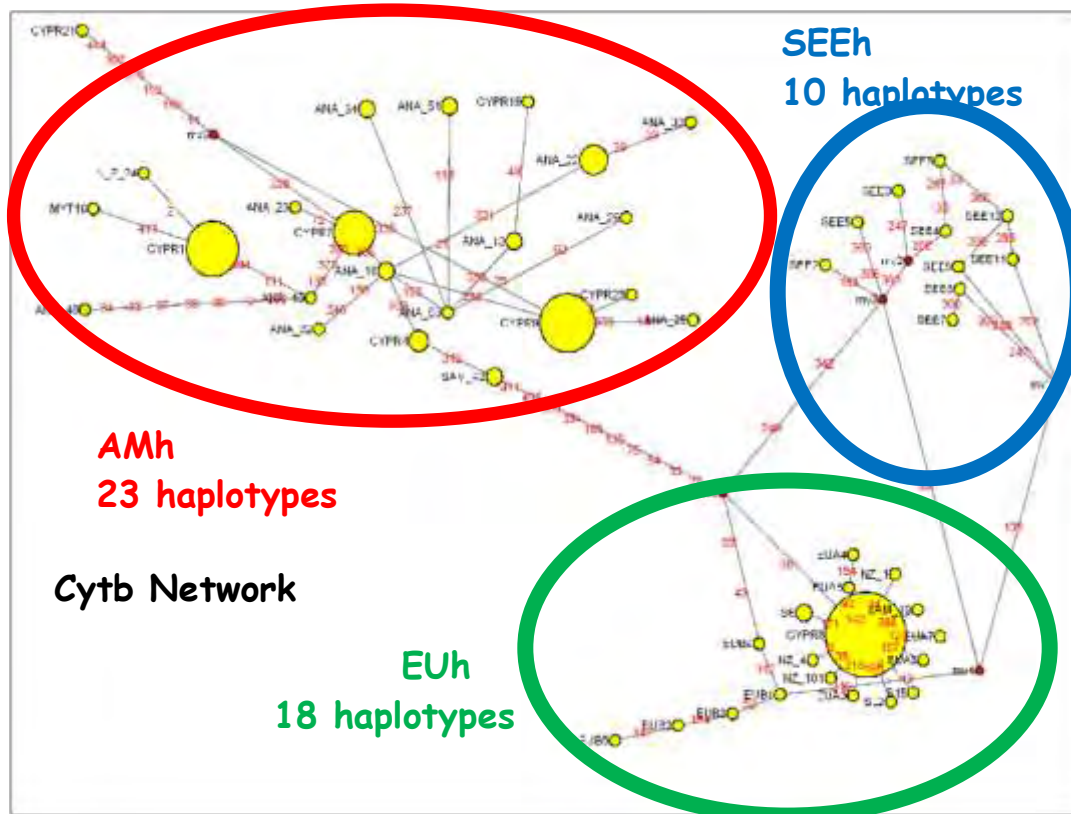
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CYPRUS										
NZEAL	0,030									
MYT	0,010	0,031								
RODOS	0,010	0,033	0,008							
CHIOS	0,009	0,030	0,007	0,009						
SAM	0,014	0,025	0,013	0,014	0,012					
ANATOLIA	0,011	0,030	0,009	0,012	0,007	0,013				
UK	0,031	0,002	0,032	0,034	0,031	0,026	0,031			
GREECE	0,034	0,014	0,034	0,038	0,033	0,03	0,033	0,01		
EUROPE	0,034	0,007	0,035	0,037	0,034	0,029	0,034	0,01	0,015	

Πίνακας 4: γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς (cytb)

Φυλογενετική Ανάλυση

Μετά και την ανάλυση με το πρόγραμμα Network τα δείγματα φαίνεται να διαχωρίζονται με βάση τον τόπο προέλευσής τους. (εικόνα 7) Διακρίνεται μια σαφής διαφοροποίηση ανάμεσα στα δείγματα από τα νησιά του Αιγαίου, την Κύπρο και τη Τουρκία, τα οποία εμφανίζουν το ασιατικό πρότυπο, και στα δείγματα από την κεντρική Ευρώπη, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Νέα Ζηλανδία, τα οποία έχουν το κεντρικό-ευρωπαϊκό πρότυπο. Τα δείγματα από την ηπειρωτική Ελλάδα δείχνουν να ανήκουν στο νοτιοανατολικό ευρωπαϊκό πρότυπο, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.

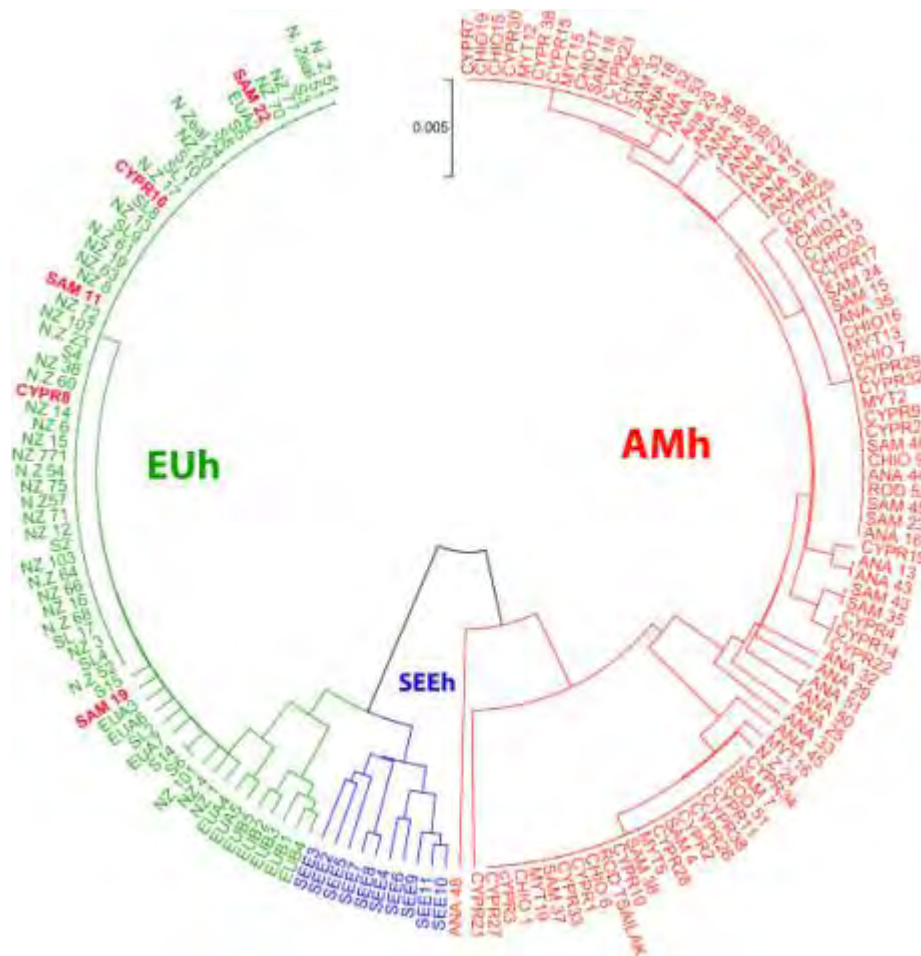
Εξαιρέση αποτελούν τα δείγματα τα οποία εμφανίζουν το κεντροευρωπαϊκό πρότυπο, αν και προέρχονται από περιοχές όπου αναμενόταν το ανατολικό πρότυπο. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τις απελευθερώσεις λαγών ευρωπαϊκής προέλευσης που πραγματοποιούνται. Επομένως πιθανώς τα συγκεκριμένα άτομα έχουν προκύψει από πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκαν σε απελευθερώσεις και δεν ανήκουν στους ντόπιους άγριου τύπου πληθυσμούς.



Εικόνα 7: Ανάλυση Network για το cytb. Τα δείγματα κατανέμονται σαφώς στις τρεις απλοομάδες με βάση το τόπο προέλευσης τους

Φυλογενετικό δέντρο

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης για το cytb φαίνονται και στο παρακάτω φυλογενετικό δέντρο (εικόνα 8) που κατασκευάστηκε με χρήση του προγράμματος MEGA 4.1 με τη μέθοδο UPGMA. Διακρίνονται τα άτομα που θεωρούμε πως έχουν προκύψει από απελευθερώσεις λαγών ευρωπαϊκής προέλευσης.



Εικόνα 8 : Φυλογενετικό δέντρο UPGMA για το Cytb. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα που παρουσιάζουν το ανατολικό πρότυπο, με πράσινο τα δείγματα που εμφανίζουν το κεντρικό ευρωπαϊκό ενώ με μπλε τα δείγματα που παρουσιάζουν το νοτιανατολικό-ευρωπαϊκό πρότυπο. Τα δείγματα SAM22,SAM11,SAM19,CYPR16,CYPR8 αν και προέρχονται από τα ανατολικά, παρουσιάζουν το κεντρικό-ευρωπαϊκό πρότυπο.

ΑΝΑΛΥΣΗ D-loop

Απλότυποι

- 1)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAAACCCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT TAGTGTTTTCCCATTAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTTAATCGTGC ATTAAAGCTTTTCCCATGTCATATAAGCTAGTACATTTCTCTGCTTAATAGGACATAGGACATTACCTATCCAACCC ACATAACCSTATCACCACATGAATATCCAATCCAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCCAGACATCCATTCCCTTGAT TGGACATAGACCATCCAAGTCAAATCTTCTTGTCACATGACTATCCCCCTCCCCAGTAGTCTCTTAATCTACC ATCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
- 2)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAAACCCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT TAATGTTTTCATTAACATGTACCCATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTTAATCGTGC ATTAAAGCTCTTCCCATGTCATATAAGCTAGTACATTTCTGCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCCTAATCA CATAACCSTATCATCAACATGAATATCCAATCCAATACCCACCTTAATCTACATCTAGACATCCATTCCCTTGATTG

GACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCCTATGACTATCCCCCTCCACCAGTGGTCTCTTAATTTACCAT
CCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
3)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT
TAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAGCATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATTACCTATCCAACCC
ACATAATCCTATCATCAACATGAATATCCAAATCCAACACCCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
TGGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTAGTCTCTTAATCTACC
ATCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
4)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT
TAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCTAACTCA
CAAAACCCTATCATCAACATGAATATCCAAATCCAATACCCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTTTCCCCCTCCACCAGTGGTCTCTTAATCTACCA
TCGTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
5)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT
TAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCTAACTCA
CAAAACCCTATCATCAACATGAATATCCAAATCCAATACCCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTGGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
6)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT
TAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCCCATATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCTAACTCA
CATAACCCTATCATCAACATGAATATCCAAATCCAATACCCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTGGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
7)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT
TAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATA--
TCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGCATTAAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCCCTGCTTA
ATAGGACATAGTACATTACCTATCCAACCTACATAATCCTATTACCAACATGAATATTCAAATCCAATACTCACC
TTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGATTGGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGGCTA
TCCCCTCCACCAGTAATCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAGCAACCCCGCC--
8)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT
TAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTCCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGCACATTACCTATCTAACTCA
CATAACCCTATCAACATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATTACCTTGATTG
GACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTAATCTCTTAATCTACCAT
CCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
9)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCAT
TAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTCCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATCTACCTATCCAACCTCA
ATAACCCTATCACCAGCATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTAGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
10)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCTAACTCA
CATAATCTTATCACCACATGAATATCCAACCTCCAATACCCACCTTAATCAACATCCAGACATCCATTCCCTTGATTG
GACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGGCTATCCCCCTCCACCAGTAGTCTCTTAATCTACCAT
CCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
11)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAGTGTTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTCCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATCTACCTATCCAACCTCA
CATAACCCTATCACCAGCATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTAGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
12)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGTCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGCACATCCACCTATCCAACCT
ACATAACCCTATCACCACATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCCAGACATCCATTCCCTTGAT
TGGAAATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTAGTCTCTTAATCTACC
ATCCTCCGTGAAACCAGCAACC-GCCAC--
13)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAGTGTTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATCTACCTATCCAACCT
ACATAACCCTATCACCACATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
TGGAAATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTAGTCTCTTAATCTACC
ATCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--
14)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCACTATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCCCATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTG
CATTAAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGTCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCTAACT
ACATAACCCTATCATCAACATGAATATTCAAATCCAATACCCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
TGGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTACTTGTCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTGGTCTCTTAATCTACC
ATCCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCA--

ACATAACCCTATCACCAACATGAATATTCAAATCCAACACTACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
TGGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTAGTCTCTTAATCTACC
ATCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
90)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCTAACTCA
CAAAACCTATCATCAACATGAATATCCAATCCAATACCCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACCAGTGGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
91)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCCATACTATCATTCCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTG
CATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATCCACCTATCCCCTCA
ACATAACCCTATCACCAACATGAATATTCAAATCCAATACTCACCTTAATCAACATCCAGACATTCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTCGTCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
92)CTCTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATCCACCTATCCCCTCA
CATAACCTATCACCAACATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTCGTCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
93)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGCTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGGCCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATTTACCTATCTAACTCA
CATAATCCTATCATCAACATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTGATCAACATCTGGACATCCATTCCCTTGATT
GACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAGTCTCTTAATCTACCAT
CCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
94)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCCATACTATCATTCCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTG
CATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATTCACCTATCTAACTC
ACATAACCCTATCACCAACATGAGTATTCAAATCCAATACTCACCTTAATCAACATCCAGACATTCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTCGTCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAAATCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
95)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCGTTTCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATCCACCTATCCAACTC
ACATAACCCTATCACCAACATGAATATTCAAATCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGAT
TGGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAGTCTCTTAATCTACC
ATCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
96)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCCATACTATCATTCCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTG
CATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAATACATTCACCTATCTAACTC
ACATAACCCTATCACCAACATGAGTATTCAAATCCAATACTCACCTTAATCAACATCCAGACATTCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTCGTCCATATGACTATCCCCCTCCCCAGTAATCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
97)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAATGCTATGTAATTCGTGCA
TTAGTGTTTTTCCCATTAAACATGTACCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGACCATTACATGTTAATCGTG
CATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATCCCTGCTTAATAGGACATAGTACATTCACCTACTAACT
CACATAACTCTATCACCAACATGGATATTCAATTCCAACACCCACCTTAATCAACATCCAGACATCCATTCCCTTGA
TCGAACATAAACCATCCGAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAGTCTCTTAATCTAC
CATCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
98)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCCATACTATCATTCCATAATCAACATTAGACCATTATATGTTAATCGTG
CATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATTCACCTACTAACTC
ACATAACCCTATCACCAACATGAGTATTCAAATCCAATACTCACCTTAATCAACATCCAGACATTCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTCGTCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAAATCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
99)CTTTACTCTTTATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGCA
TTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATCTCATAATCAACATTAGGTCATTATATGTTAATCGTGC
ATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATTCACCTATCCAACCTCA
CATAATCCTATCACTAACATGGATATTCAAAGTCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGATTG
GACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAGTCTCTTAATCTACCAT
CCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
100)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAACGCTATGTAATTCGTGC
ATTAATGTTTTTCCCATTAAACATGTATCTATACTATCATCTCATAATCAACATTAGGTCATTATATGTTAATCGTG
CATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATTCTGCTTAATAGGACATAGTACATTCACCTATCCAACCTC
ACATAATCCTATCACTAACATGGATATTCAAAGTCCAACACTCACCTTAATCAACATCTAGACATCCATTCCCTTGATT
GGACATAGACCATCCAAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAGTCTCTTAATCTACCA
TCCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--
101)CTTTACTCTTAATAACATATCCAAGTAACTTGTCATATTGACAAAAACACCCTTTAATGCTATGTAATTCGTGC
ATTAGTGTTTTTCCCATTAAACATGTACCTATACTATCATTTCATAATCAACATTAGACCATTACATGTTAATCGT
GCATTAAGCTCTTCCCATGCATATAAGCTAGTACATCCCTGCTTAATAGGACATAGTACATTCACCTACTAAAC
TCACATAACTCTATCACCAACATGGATATTCAATTCCAACACCCACCTTAATCAACATCCAGACATCCATTCCCTTG
ATCGAACATAAACCATCCGAGTCAAATCCTTTCTTGCCATATGACTATCCCCCTCCACAGGTAAATCTCTTAATCTA
CCATCTCCGTGAAAACAGCAACCCGCCA--

Νουκλεοτιδική Ανάλυση

Με τη χρήση του προγράμματος MEGA 4.1, ήταν δυνατός ο υπολογισμός του ποσοστού εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες. Το ποσοστό A+T ήταν 59,6% και το G+C ήταν 40,4% κατά μέσο όρο.

Επίσης, προσδιορίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες. Συνολικά, βρέθηκαν 132 πολυμορφικές θέσεις, εκ των οποίων οι 85 είναι πληροφοριακές για τη φειδωλότητα, ενώ οι υπόλοιπες 47 βρίσκονταν σε μεμονωμένα δείγματα. Καθώς το dloop είναι ένας ουδέτερος εξελικτικά γενετικός τύπος που δε μεταγράφεται, δεν είχε νόημα να γίνει αμινοξική ανάλυση.

Γενετικές Αποστάσεις μέσα στους πληθυσμούς

Οι μέσες γενετικές διαφοροποιήσεις μέσα στους πληθυσμούς (πίνακας 5), όπως υπολογίστηκαν με τη χρήση του MEGA 4.1 είναι μικρές, αλλά σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες που υπολογίστηκαν με τη χρήση του cyt b. (πίνακας 3) Η ελάχιστη τιμή παρατηρείται στο πληθυσμό της Ρόδου και να ισούται με 0% (λόγω πολύ μικρού αριθμού δειγμάτων). Η αμέσως επόμενη τιμή παρατηρείται στο πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου και ισούται με 0,004 % ,ενώ η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο πληθυσμό της Σάμου και είναι ίση με 0,038%

CYPRUS	0,034
MYT	0,029
RODOS	0,000
CHIOS	0,028
SAM	0,038
ANATOLIA	0,034
NZEAL	0,005
UK	0,004
GREECE	0,014
EUROPE	0,013

Πίνακας 5: γενετικές αποστάσεις μέσα στους πληθυσμούς(d-loop)

Γενετικές Αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς

Με βάση τον πίνακα 6, παρατηρούμε ότι όπως και στη περίπτωση του cyt b (πίνακας 4), οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις εμφανίζονται ανάμεσα στους πληθυσμούς από το Ηνωμένο Βασίλειο, την ηπειρωτική Ευρώπη και τη Νέα Ζηλανδία και τους πληθυσμούς από τα νησιά του Αιγαίου, τη Κύπρο, τη Τουρκία και την ηπειρωτική

Ελλάδα. Αντίστοιχα οι ανατολικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν μικρές γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους,(αν και μεγαλύτερες από την αντίστοιχη ανάλυση του cyt**b**) το ίδιο και οι ευρωπαϊκοί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα οι αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς της Κύπρου και της Νέας Ζηλανδίας(0,066%), της Κύπρου και του Ηνωμένου Βασιλείου (0,065%) αλλά και της Κύπρου και της ηπειρωτικής Ευρώπης και Ελλάδας (0,064% και 0,071% αντίστοιχα)

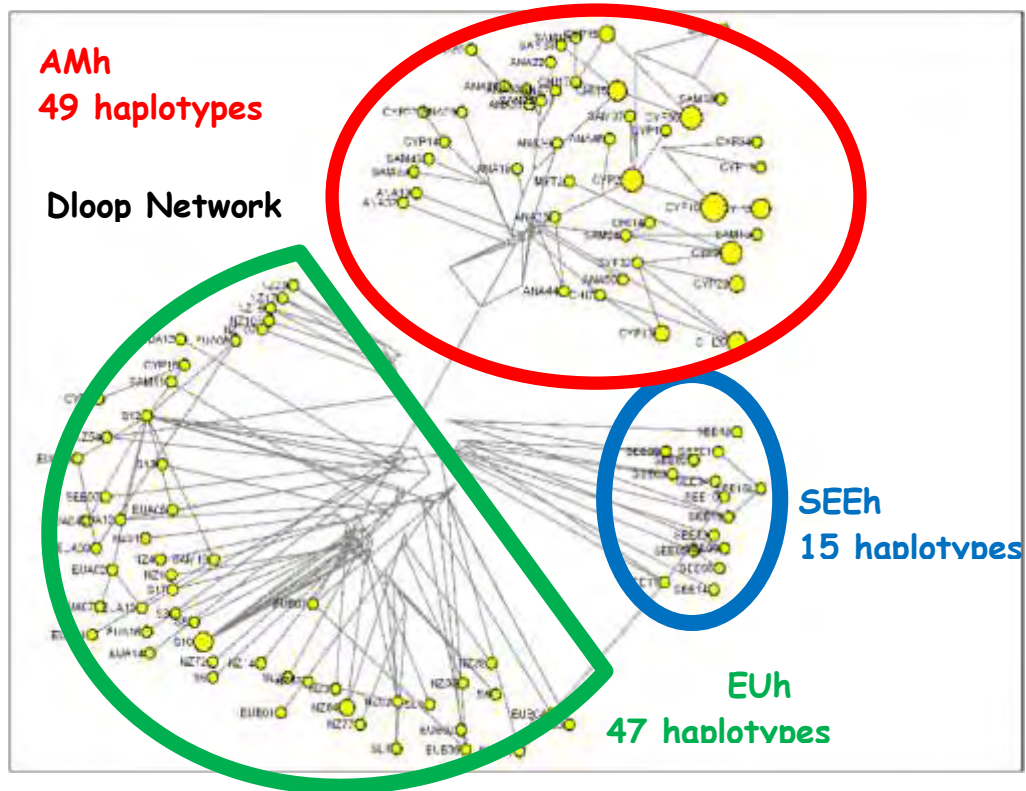
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CYPRUS										
MYT	0,030									
RODOS	0,027	0,025								
CHIOS	0,035	0,030	0,036							
SAM	0,040	0,038	0,037	0,033						
ANATOLIA	0,042	0,039	0,042	0,034	0,038					
NZEAL	0,066	0,074	0,072	0,067	0,059	0,070				
UK	0,065	0,072	0,071	0,066	0,057	0,068	0,005			
GREECE	0,071	0,076	0,066	0,073	0,064	0,074	0,030	0,029		
EUROPE	0,064	0,070	0,067	0,065	0,056	0,067	0,011	0,010	0,026	

Πίνακας 6: γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς (d-loop)

Φυλογενετική Ανάλυση

Μετά και την ανάλυση με το πρόγραμμα Network τα δείγματα φαίνεται να διαχωρίζονται με βάση τον τόπο προέλευσής τους. (εικόνα 9) Διακρίνεται μια σαφής διαφοροποίηση ανάμεσα στα δείγματα από τα νησιά του Αιγαίου, την Κύπρο και τη Τουρκία, τα οποία εμφανίζουν το ανατολικό πρότυπο(AMh), και στα δείγματα από την κεντρική Ευρώπη, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Νέα Ζηλανδία, τα οποία εμφανίζουν το κεντρικό-ευρωπαϊκό πρότυπο(EUh). Τα δείγματα από την ηπειρωτική Ελλάδα δείχνουν να ανήκουν στο νοτιοανατολικό ευρωπαϊκό πρότυπο(SEEh), όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.

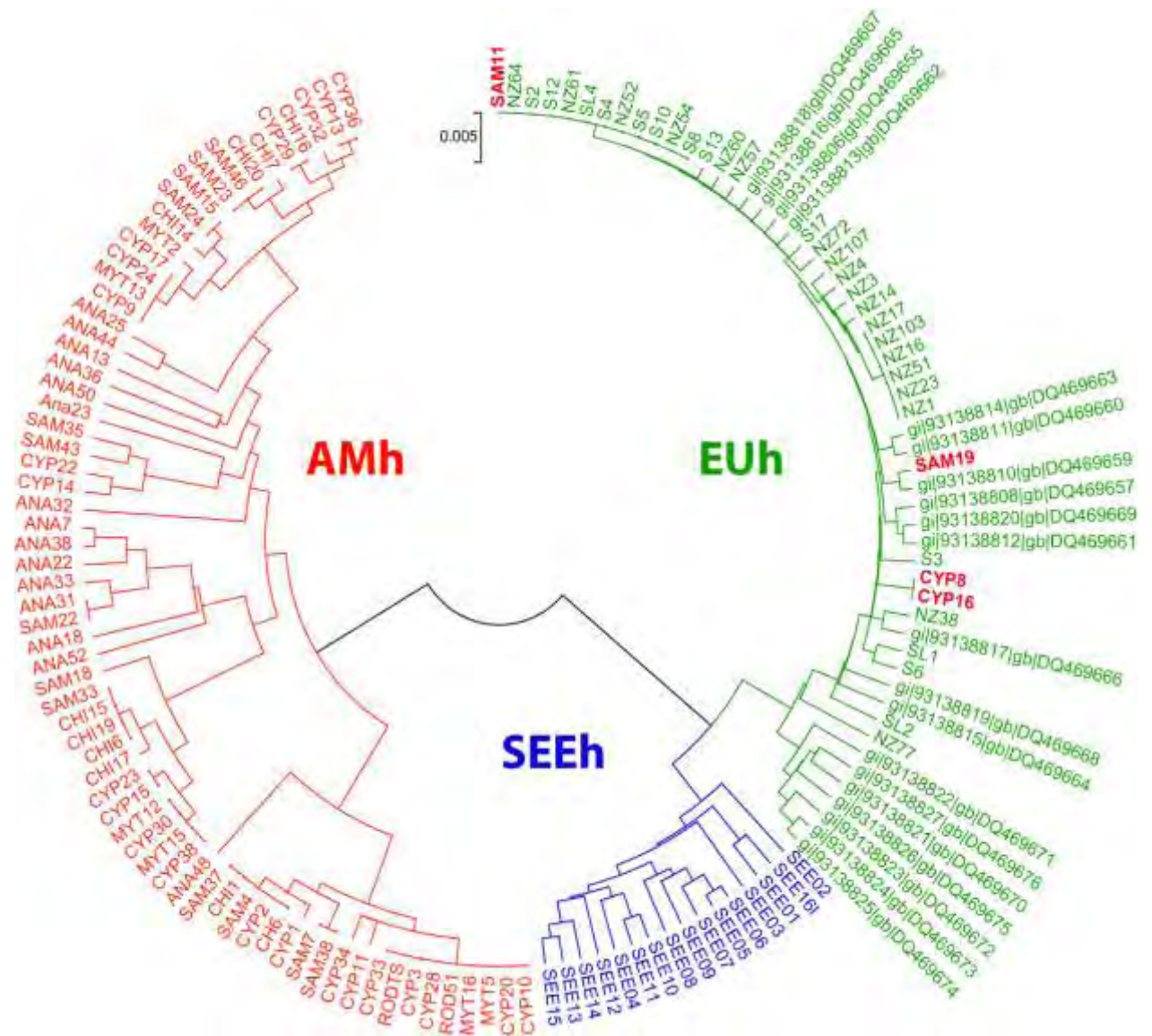
Εξάιρεση αποτελούν τα δείγματα τα οποία εμφανίζουν το κεντροευρωπαϊκό πρότυπο, αν και προέρχονται από περιοχές όπου αναμενόταν το ανατολικό πρότυπο. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τις απελευθερώσεις λαγών ευρωπαϊκής προέλευσης που πραγματοποιούνται. Επομένως τα συγκεκριμένα άτομα έχουν προκύψει από πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκαν σε απελευθερώσεις και δεν ανήκουν στους ντόπιους άγριου τύπου πληθυσμούς.



Εικόνα 9: Ανάλυση Network για το d-loop. Τα δείγματα κατανέμονται σαφώς στις τρεις απλοομάδες με βάση το τόπο προέλευσης τους

Φυλογενετικό δέντρο

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης για το dloop φαίνονται και στο παρακάτω φυλογενετικό δέντρο(εικόνα 10) που κατασκευάστηκε με χρήση του προγράμματος MEGA 4.1 με τη μέθοδο UPGMA. Διακρίνονται με διαφορετικό χρώμα οι τρεις απλοομάδες, καθώς και τα άτομα που θεωρούμε πως έχουν προκύψει από απελευθερώσεις λαγών ευρωπαϊκής προέλευσης, μιας και εμφανίζουν το κεντροευρωπαϊκό πρότυπο αν και προέρχονται από περιοχές όπου αναμένεται το ανατολικό πρότυπο.



Εικόνα 10 : Φυλογενετικό δέντρο UPGMA για το d-loop. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα που παρουσιάζουν το ανατολικό πρότυπο, με πράσινο τα δείγματα που εμφανίζουν το κεντρικό ευρωπαϊκό ενώ με μπλε τα δείγματα που παρουσιάζουν το νοτιανατολικό-ευρωπαϊκό πρότυπο. Τα δείγματα SAM11, SAM19, CYP16, CYP8 αν και προέρχονται από τα ανατολικά, παρουσιάζουν το κεντρικό-ευρωπαϊκό πρότυπο.

Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν δείγματα ευρωπαϊκού λαγού (*L. europaeus*) και αναλύθηκαν ως προς τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου Cytb που κωδικοποιεί για το αποένζυμο του κυτοχρώματος b και την νουκλεοτιδική αλληλουχία της μιτοχονδριακής d-loop. Μελετήθηκαν δηλαδή ταυτόχρονα ένας μη λειτουργικός ουδέτερος γενετικός δείκτης (d-loop) και ένας λειτουργικός (Cytb), προκειμένου να γίνει σύγκριση στα διαφορετικά επίπεδα συσσώρευσης μεταλλάξεων. Τα δείγματα που μελετήθηκαν προέρχονταν από πληθυσμούς λαγών από την ηπειρωτική Ευρώπη και Ελλάδα, από το Ηνωμένο Βασίλειο, από τη Νέα Ζηλανδία από νησιά του Αιγαίου (Σάμος, Χίος, Ρόδος, Μυτιλήνη) από τη Κύπρο και τη Τουρκία. Από τη νουκλεοτιδική ανάλυση του Cytb παρατηρήθηκαν αρκετές θέσεις μεταλλάξεων, οι περισσότερες από τις οποίες ήταν συνώνυμες. Στα 166 δείγματα που μελετήθηκαν βρέθηκαν συνολικά 51 διαφορετικοί απλότυποι. Όσον αφορά την ανάλυση της περιοχής ελέγχου d-loop βρέθηκαν πολύ περισσότερες μεταλλάξεις σε σχέση με το κυτόχρωμα και σε σύνολο 140 δειγμάτων βρέθηκαν 112 διαφορετικοί απλότυποι, δηλαδή περισσότεροι από τους διπλούς από ότι στο cytb αν και σε μικρότερο αριθμό δειγμάτων, γεγονός που οφείλεται στην ουδετερότητα της περιοχής, η οποία συσσωρεύει μεταλλάξεις με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό από ότι το γονίδιο του κυτοχρώματος, το οποίο φαίνεται πως δέχεται ισχυρή εξελικτική πίεση. Παρ' όλα αυτά, τόσο στη περίπτωση του κυτοχρώματος όσο και της περιοχής έλεγχου d-loop, οι μεταλλάξεις εμφάνιζαν σαφή γεωγραφική κατανομή, δηλαδή δείγματα από την ίδια γεωγραφική περιοχή παρουσίαζαν ομοιότητες στις μεταλλάξεις που βρέθηκαν και διαφορές σε σχέση με τα δείγματα ατόμων διαφορετικής γεωγραφικής περιοχής. Τα δείγματα που προέρχονταν από την ηπειρωτική Ευρώπη, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Νέα Ζηλανδία παρουσίαζαν ένα κοινό πρότυπο και στους δυο γενετικούς τύπους που αναλύθηκαν, ενώ τα δείγματα από τα νησιά του Αιγαίου, τη Κύπρο και τη Τουρκία μοιράζονταν ένα διαφορετικό πρότυπο που απείχε αρκετά από το Ευρωπαϊκό. Τα δείγματα από την ηπειρωτική Ελλάδα παρουσιάζουν ένα πρότυπο αρκετά διαφορετικό από αυτό των πληθυσμών των νησιών του Αιγαίου και πιο κοντά στο αντίστοιχο ευρωπαϊκό.

Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών από τα οποία προκύπτει η ύπαρξη τριών διαφορετικών απλοομάδων με πολύ καλά προσδιορισμένη κατανομή στην Ευρώπη και την Ανατολία. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε την κεντρική ευρωπαϊκή απλοομάδα EUh(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).

Στη παρούσα μελέτη, μετά από τη φυλογενετική ανάλυση τα δείγματα κατανεμήθηκαν με σαφήνεια στις τρεις απλοομάδες όπως μπορεί να φανεί παραπάνω στις εικόνες 7,8,9,10

Εξαίρεση σε αυτή τη σαφή γεωγραφική κατανομή αποτελούν τρία δείγματα από τη Σάμο και δύο από τη Κύπρο, τα οποία εμφάνισαν το κεντρικό ευρωπαϊκό πρότυπο. Το πιο πιθανό είναι πως τα άτομα αυτά προέρχονται από απελευθερώσεις λαγών ευρωπαϊκής προέλευσης που γίνονται με σκοπό την ενίσχυση των άγριων πληθυσμών, μια πρακτική που δεν ενδείκνυται καθώς η αναπαραγωγή ανάμεσα σε λαγούς ανατολικής και ευρωπαϊκής προέλευσης μπορεί να οδηγήσει σε γενετική κατάπτωση, εξαιτίας της μεγάλης γενετικής απόστασης των πληθυσμών.

Πιο αναλυτικά, πάνω στο θέμα των απελευθερώσεων έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες από τους Mamuris *et al* . Σύμφωνα με αυτές προέκυψε ότι σε αντίθεση με τους φυσικούς πληθυσμούς οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί που χρησιμοποιούνται στις απελευθερώσεις εμφανίζουν σχετικά μικρή γενετική ποικιλότητα ενώ βρέθηκε ακόμα πως η Βουλγαρία και η Ελλάδα είναι οι μόνες χώρες όπου εντοπίζονται και τα τέσσερα διαφορετικά πρότυπα mtDNA(εικόνα 2) , γεγονός το οποίο θεωρείται ότι οφείλεται στις απελευθερώσεις λαγών με διαφορετικού τύπου mtDNA. Η αυξημένη γενετική ποικιλομορφία των πληθυσμών του λαγού στην Ελλάδα σε σχέση με τις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες(Mamuris *et al*, 2001,2002 Suchentrunk *et al*, 2003) και η αλλαγή που παρατηρήθηκε στη γενετική δομή των ελληνικών πληθυσμών, ως αποτέλεσμα των απελευθερώσεων, οδήγησαν στην απαγόρευση των προγραμμάτων εμπλουτισμού στην ελληνική επικράτεια και στον επαναπροσδιορισμό των προγραμμάτων διαχείρισης των φυσικών ζωικών πληθυσμών, ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός συγγένειας με τους φυσικούς πληθυσμούς.(Stamatis, 2011)

Επίσης τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν τη θεωρία σχετικά με τη προέλευση των λαγών των νησιών του Αιγαίου, κοντά στα παράλια της Τουρκίας, (Ρόδος, Χίος, Μυτιλήνη, Σάμος) από την Τουρκία, (Stamatis *et al* 2011) καθώς εμφανίζουν όλοι τους το ανατολικό πρότυπο. Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα μας φαίνεται να ισχύει το ίδιο και για τους πληθυσμούς της Κύπρου. Η αρχική εγκαθίδρυση των πληθυσμών του λαγού στα νησιά του Αιγαίου και τη Κύπρο, θεωρείται πως συνέβη κάποια στιγμή πριν τη τελευταία περίοδο των παγετώνων, όταν τα νησιά ήταν ακόμα ενωμένα με τμήματα στεριάς . Από τη στιγμή της δημιουργίας των νησιών μετά την άνοδο του νερού που προκάλεσε το λιώσιμο των πάγων, οι νησιωτικοί πλέον πληθυσμοί, εξαιτίας της αρχής του ιδρυτή που προκαλεί η απομόνωση τους, διατήρησαν το αρχικό πρότυπο (AMh), σε αντίθεση με τους πληθυσμούς της ηπειρωτικής Ελλάδας που χάρη στη συνεχή γενετική ροή διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, σε σημείο που πλέον να ανήκουν σε διαφορετική απλοομάδα (SEEh) (εικόνα 11)

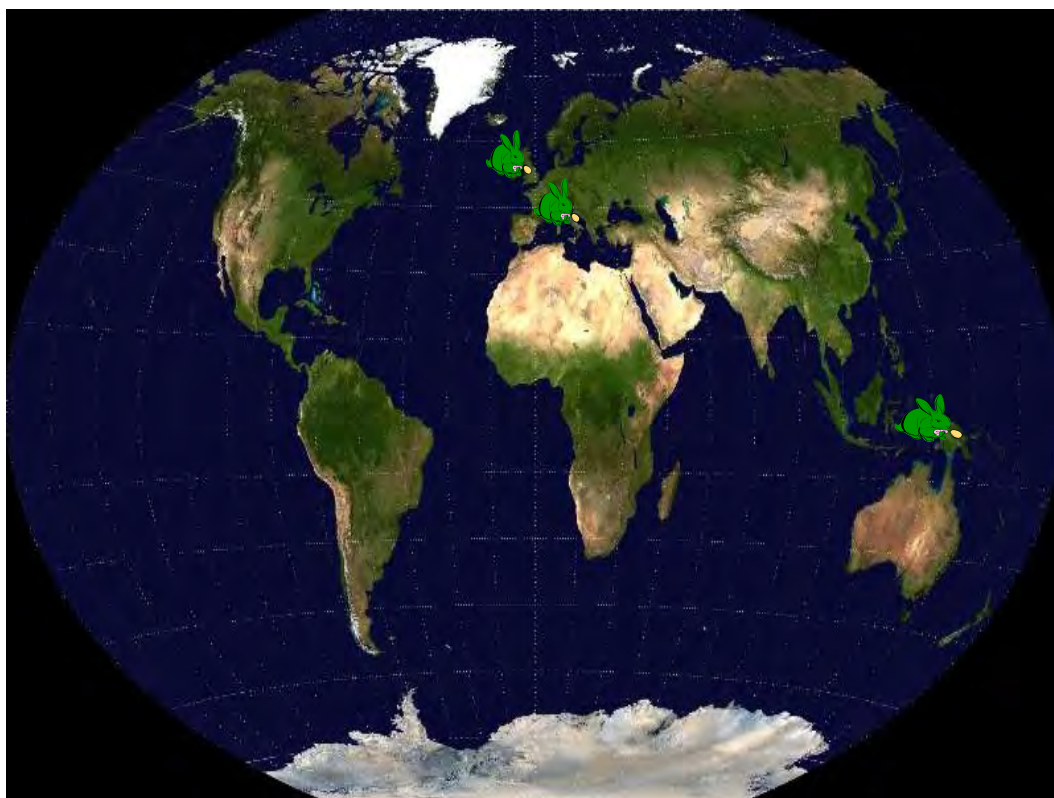
Όσον αφορά τους πληθυσμούς λαγού του Ηνωμένου Βασιλείου, τα αποτελέσματα μας στηρίζουν τη θεωρία για τη προέλευση τους από τη βόρεια Ευρώπη προς το τέλος της τελευταίας παγετωνικής περιόδου (Stamatis *et al* 2011) μιας και όλοι εμφανίζουν το κεντρικό ευρωπαϊκό πρότυπο (EUh). Πιο αναλυτικά, στη μελέτη των οι πληθυσμοί των λαγών του Ηνωμένου Βασιλείου βρέθηκε να έχουν πολύ μειωμένη γενετική ποικιλότητα, καθώς στον πληθυσμό του βορείου Ηνωμένου Βασιλείου βρέθηκε μόνο ένας απλότυπος, ο οποίος στην υπόλοιπη Ευρώπη βρέθηκε μόνο στη Βόρεια Γερμανία κοντά στα σύνορα με τη Δανία ,ενώ στον πληθυσμό του νότιου Ηνωμένου Βασιλείου βρέθηκε επίσης ένας μοναδικός απλοτυπος, ο οποίος επίσης εντοπίστηκε στον πληθυσμό της βόρειας Γερμανίας. Με βάση αυτά διατυπώθηκε η θεωρία ότι οι πληθυσμοί λαγού του Ηνωμένου Βασιλείου προέρχονται είτε από φυσική μετανάστευση του είδους μέσω μιας ζώνης γέφυρας ξηράς που υπήρχε κατά τη διάρκεια του Νεώτερου Ολόκαινου και συνέδεε τα Βρετανικά νησιά με την

ηπειρωτική Ευρώπη, είτε μεταφέρθηκαν εκεί από τους αρχαίους Ρωμαίους ή από νεώτερες αποικίσεις. (Corbert, 1986, Suchentrunk *et al*, 2006)

Όσον αφορά τους πληθυσμούς λαγού της Νέας Ζηλανδίας, εμφανίζουν επίσης όλοι το κεντρικό ευρωπαϊκό πρότυπο καθώς και ελάχιστες γενετικές διαφοροποιήσεις τόσο ανάμεσα τους όσο και σε σχέση με τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, οπότε υποθέτουμε ότι μεταφέρθηκαν εκεί με την άφιξη των αποίκων από το Ηνωμένο Βασίλειο. (εικόνα 12)



Εικόνα 11: Το μοντέλο του εποικισμού των νησιών του Αιγαίου και της Κύπρου από λαγούς από τη Τουρκία. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται οι πληθυσμοί που εμφανίζουν το ανατολικό πρότυπο,(AMh) ενώ με μπλε οι πληθυσμοί που εμφανίζουν το νότιο-ανατολικό ευρωπαϊκό πρότυπο(SEEH). Η κόκκινη γραμμή αναπαριστά ένα νοητό όριο στην εξάπλωση του ανατολικού προτύπου και την εμφάνιση του νοτιοανατολικού-ευρωπαϊκού στην ηπειρωτική Ελλάδα. (Stamatis *et al* 2011)



Εικόνα 12 : Οι πληθυσμοί του λαού του Ηνωμένου Βασιλείου προέκυψαν από πληθυσμούς της Βόρειας Ευρώπης. Οι πληθυσμοί της Νέας Ζηλανδίας προήλθαν αρκετά πρόσφατα, από το Ηνωμένο βασίλειο μέσω των αποίκων. Από τότε παρουσίασαν ελάχιστη διαφοροποίηση σε σχέση με τους αρχικούς ευρωπαϊκούς πληθυσμούς

Όσον αφορά τις διαφορές ανάμεσα σε νησιωτικούς και ηπειρωτικούς πληθυσμούς, στη παρούσα μελέτη φαίνεται να επιβεβαιώνεται το νησιωτικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο στα νησιά κυρίαρχη εξελικτική δύναμη είναι η αρχή του ιδρυτή, γεγονός που οδηγεί σε πληθυσμούς με πολύ μειωμένη γενετική ποικιλομορφία.

Το γεγονός αυτό στη συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να φανεί από την κατανομή των απλοτύπων σε ηπειρωτικά δείγματα (Τουρκία και Ελλάδα) και νησιωτικές περιοχές (νησιά Αιγαίου, Κύπρος, Ηνωμένο Βασίλειο, Νέα Ζηλανδία). Όπως φαίνεται στο πίνακα 7 στη περίπτωση του κυτοχρώματος παρατηρήθηκαν 14 απλότυποι σε σύνολο 25 ηπειρωτικών δειγμάτων, ενώ αντίστοιχα σε 121 νησιωτικά δείγματα είχαμε μόλις 17 απλότυπους. Αντίστοιχα αποτελέσματα πήραμε και στη περίπτωση της περιοχής ελέγχου d-loop, όπου είχαμε 15 απλότυπους για δεκαπέντε ηπειρωτικά δείγματα, (δηλαδή κάθε άτομο εμφάνιζε ξεχωριστό απλότυπο) ενώ σε 90 νησιωτικά δείγματα είχαμε 62 απλότυπους, οι οποίοι αν και είναι σημαντικά περισσότεροι από ότι στη περίπτωση του κυτοχρώματος είναι αναλογικά λιγότεροι σε σχέση με τους ηπειρωτικούς πληθυσμούς. Τέλος, όσον αφορά τη σύγκριση ανάμεσα στους νησιωτικούς πληθυσμούς με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης όπως φαίνονται στο πίνακα 8, οι απλότυποι κατανέμονται στα περισσότερα νησιά. Στη περίπτωση του cytb από τους 17 συνολικά απλότυπους που ανιχνεύσαμε, οι 15 είναι μοναδικοί ανά νησί και κατανέμονται ως εξής : 5 μοναδικοί απλότυποι για το πληθυσμό της Κύπρου, 3 για το πληθυσμό της Νέας Ζηλανδίας, 2 για το πληθυσμό της Σάμου, 1 για τον πληθυσμό της Μυτιλήνης και 4 για το πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου. Οι 2 εναπομείναντες απλότυποι εμφανίζονται ο μιν ένας στα περισσότερα άτομα από τους

πληθυσμούς της Νέας Ζηλανδίας και του Ηνωμένου Βασιλείου, ενώ ο άλλος εμφανίζεται σχεδόν σε όλα τα άτομα από τη Κύπρο και στα περισσότερα από τα νησιά του Αιγαίου. Η ανάλυση της dloop παρέχει αντίστοιχα αποτελέσματα (πίνακας 8) καθώς από τους 62 συνολικά απλοτύπους που ανιχνεύσαμε, οι 54 είναι μοναδικοί ανά νησί και κατανέμονται ως εξής : 9 μοναδικοί απλότυποι για το πληθυσμό της Κύπρου, 18 για το πληθυσμό της Νέας Ζηλανδίας, 11 για το πληθυσμό της Σάμου, 1 για τον πληθυσμό της Μυτιλήνης, 10 για το πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου, 1 για τον πληθυσμό της Ρόδου και 4 για τον πληθυσμό της Χίου. Από τους 8 εναπομείναντες απλότυποι, οι 7 εμφανίζονται στα υπόλοιπα άτομα από τη Κύπρο και τα νησιά του Αιγαίου, ενώ ο όγδοος εμφανίζεται σε 3 άτομα από το Ηνωμένο Βασίλειο. Φαίνεται λοιπόν ότι σε γενικές γραμμές ο πληθυσμός του κάθε νησιού έχει μια σχετικά διαφοροποιημένη γενετική σύσταση, παρά την πιθανή κοινή τους προέλευση, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί και πάλι με βάση την αρχή του ιδρυτή.

Επί της ουσίας, από τη στιγμή της δημιουργίας τους, οι νησιωτικοί πληθυσμοί υφίστανται μια πλήρη γεωγραφική και άρα και αναπαραγωγική απομόνωση, με μοναδική εξαίρεση την εισαγωγή ξένων πληθυσμών μέσω απελευθερώσεων. Η απομόνωση αυτή οδηγεί στην εγκαθίδρυση πολύ ομοιογενών γενετικά πληθυσμών, οι οποίοι έχουν προκύψει από έναν αρχικό μικρό πληθυσμό με πολύ μικρά ποσοστά πολυμορφισμού, εξαιτίας της αρχής του ιδρυτή. Αυτό εξηγεί την παρουσία τόσο μικρού αριθμού απλοτύπων στους νησιωτικούς πληθυσμούς του λαγού που μελετήθηκαν σε σχέση με τους αντίστοιχους ηπειρωτικούς. Εξηγεί επίσης το γεγονός πως στη πλειοψηφία τους οι απλότυποι που βρεθήκαν είναι μοναδικοί για κάθε νησιωτικό πληθυσμό, φανερώνοντας έναν αρκετά βαθύ διαχωρισμό μεταξύ τους. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι εξαιτίας αυτής τους ακριβώς της μειωμένης γενετικής ποικιλομορφίας, οι νησιωτικοί πληθυσμοί του *L. europaeus* είναι πολύ πιο ευάλωτοι σε φαινόμενα γενετικής κατάπτωσης που προκαλούνται από ανεξέλεγκτες απελευθερώσεις εκτρεφόμενων πληθυσμών, από ότι οι αντίστοιχοι πληθυσμοί των ηπειρωτικών περιοχών, οπότε είναι εύκολο να αλλοιωθεί η γενετική δομή τους και άρα η προσαρμογή τους με την εισαγωγή πολλών διαφορετικών απλοτύπων από περιοχές με υψηλότερη γενετική διαφοροποίηση.

Δεν υπάρχουν αυτή τη στιγμή τα απαραίτητα δεδομένα ώστε να αποφανθούμε για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις διαφορετικές απλοομάδες σε επίπεδο νησιωτικών πληθυσμών του *L. europaeus*, επομένως είναι αναγκαίο να συνεχιστεί η έρευνα προκειμένου να μπορέσουν επαναπροσδιοριστούν αποτελεσματικά τα προγράμματα διαχείρισης των φυσικών ζωικών πληθυσμών και των απελευθερώσεων. Ωστόσο γεγονός παραμένει πως κανένα τέτοιο πρόγραμμα δεν μπορεί να σχεδιαστεί με ασφάλεια χωρίς τη γνώση της γενετικής δομής των φυσικών πληθυσμών.

Cytb	Samples	Haplotypes
Mainland	25	14
Islands	121	17
Dloop		
Mainland	15	15
Islands	90	62

Πίνακας 7: Κατανομή απλοτύπων σε ηπειρωτικούς και νησιωτικούς πληθυσμούς

	Απλότυποι cytb	Απλότυποι dloop
CYP	5	9
NZEAL	3	18
ROD		1
SAM	2	11
CHIOS		4
UK	4	10
MYT	1	1
Συνολικοί απλότυποι	17	62
Συνολικοί μοναδικοί απλότυποι	15	54
Συνολικοί κοινοί απλότυποι	2	8

Πίνακας 8: Κατανομή των απλοτύπων των νησιωτικών πληθυσμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465.
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts και Walter, *Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας* (2006)
- Εξέλιξη* (2007)
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*
- Ben Slimen, H., Suchentrunk, F., Stamatis, C., Mamuris, Z., Sert, H., Alves, P.C., Kryger, U., Shahin, A.B., Ben Ammar Elgaied, A., (2008) Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): a test of Petter's hypothesis of conspecificity. *Biochem. Syst. Ecol.* 36: 22–39.
- Fickel, J., Lieckfeldt, D., Pitra, C., (1999) Analysis of genetic diversity and tructure in neighboring populations of the European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 45: 230–237.
- Fickel, J., Hauffe, H.C., Pecchioli, E., Soriguer, R., Vapa, L. and Pitra, C. (2008) Cladogenesis of the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *Eur. J. WildlRes.* 54: 495-510
- Kasapidis, P., Suchentrunk, F., Magoulas, A., Kotoulas, G. (2005) The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 34: 55-66.
- Pierpaoli, M., Riga, F., Trocchi, V. & Randi, E. (1999) Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 8: 1805–1817.
- 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

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. and Mamuris Z. Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hares *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. 2007 *FFI, Oryx*, 41(4), 548–551

Stamatis C., Giannouli S., Suchentrunk F., Sert H., Stathopoulos C., Mamuris Z. (2008). Recruitment of mitochondrial tRNA genes as auxiliary molecular markers for linked functional genomic and genetic analyses: The paradigm of brown hare (*Lepus europaeus*). *Gene* 410: 154- 164

Suchentrunk F., Mamuris Z., Sfouggaris A.I., Stamatis C. (2003). Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *Biochemical Genetics* 41: 127- 140

Suchentrunk, F., Jaschke, C., Haiden, A. (2001) Little allozyme and mtDNA variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from New Zealand and Britain - A legacy of bottlenecks? *Mammalian Biology*, 66: 48-59.

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

Suchentrunk, F., Ben Slimen, H., Stamatis, C., Sert, H., Scandura, M., Apollonio, M. & Mamuris, Z. (2006) Molecular approaches revealing prehistoric, historic, or recent translocations and introductions of hares (genus *Lepus*) by humans. *Human Evolution*, 21:151–165.

Αλαχιώτης Σ., Εισαγωγή στην Εξέλιξη (2007)