

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της φοιτήτριας:

ΑΜΑΛΙΑ Γ. ΒΟΥΛΓΑΡΗ

**«Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ
ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΑΓΟΥ»**

ΛΑΡΙΣΑ 2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της φοιτήτριας:
ΑΜΑΛΙΑ Γ. ΒΟΥΛΓΑΡΗ

**«Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ
ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΑΓΟΥ»**

ΛΑΡΙΣΑ 2004



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

Αριθ. Εισ.: 3995/1

Ημερ. Εισ.: 29-11-2004

Δωρεά: _____

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΒΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075141

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΑΜΑΛΙΑ Γ. ΒΟΥΛΓΑΡΗ

**«Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΑΓΟΥ»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

**Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

**Δ. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Α. ΜΟΥΤΟΥ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2004.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ. Ζ. Μαμούρη, ο οποίος με τίμησε αναθέτοντάς μου την παρούσα εργασία, καθώς και για το ενδιαφέρον και τις υποδείξεις του για τη διεκπεραίωσή της.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών κ. Α. Μούτου, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας- Ιολογίας κ. Δ. Μαρκουλάτο που με τίμησαν με τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κ Σταμάτη για τη συνεχή καθοδήγησή του, τη στήριξη και τη βοήθεια που μου πρόσφερε, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κ. Ε. Ψόχιου για τις συμβουλές και το ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Θέλω ακόμη, να ευχαριστήσω τη συμφοιτήριά μου Μ. Δαρβάρη που με βοήθησε να φέρω εις πέρας το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου για τη στήριξη και την υπομονή που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Έννοια της φυλογένεσης	6
2. Μοριακές τεχνικές και εφαρμογή τους	8
α) Ισοένζυμα	8
β) Τεχνική RAPD	10
γ) VNTRs και SSRs	11
δ) Μιτοχονδριακό DNA	12
3. Περιγραφή του <i>Lepus europaeus</i>	17
α) Φυσική Περιγραφή	19
β) Αναπαραγωγή	19
γ) Διατροφικές συνήθειες	19
δ) Σημασία για τον άνθρωπο	20
ε) Κατανομή του <i>Lepus europaeus</i>	20
4. Ταξινόμηση του <i>Lepus europaeus</i> και συγγενικών ειδών	20
5. Γενετικές μελέτες για το <i>Lepus europaeus</i> και άλλα συγγενικά είδη	21
6. Σκοπός της εργασίας	26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Βιολογικό υλικό	28
2. Δειγματοληψία	28
3. Απομόνωση ολικού DNA.	30
4. Πολλαπλασιασμός τμημάτων του mtDNA με τη χρήση PCR	33
α) Ενζυμική αντίδραση	36
β) Αποδιάταξη	36
γ) Συγκόλληση εκκινητών	37
δ) Επέκταση ολιγονουκλεοτιδίων	37

ε) Αριθμός κύκλων	37
5. Περιοχές του mtDNA που ενισχύθηκαν και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν	38
6. Διαδικασία PCR	40
7. Ηλεκτροφόρηση	40
α) Πηκτή αγαρόζης	41
β) Πηκτή πολυακρυλαμίδης	42
8. Πέψη με ένζυμα περιορισμού	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	47
--------------------------	----

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
---------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
-----------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	70
---------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73
---------------------	----

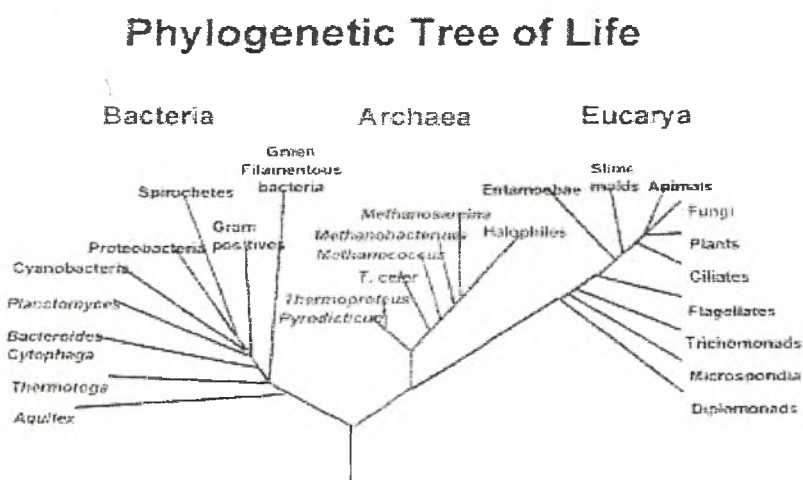
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Έννοια της φυλογένεσης

Με τον όρο φυλογένεση εννοούμε την εύρεση των εξελικτικών σχέσεων των ζωντανών οργανισμών με μια σειρά από διχοτομήσεις που εξηγούν το σχηματισμό των υπάρχοντων ειδών. Στόχος της φυλογένεσης, είτε βασίζεται σε μοριακά δεδομένα ή σε μορφολογικά, είναι η αναπαράσταση της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών (Avise, 1986). Η αναπαράσταση αυτή γίνεται μέσω των φυλογενετικών δέντρων, που ονομάζονται επίσης και δενδρογράμματα.

Τα φυλογενετικά δέντρα δείχνουν τις εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα σε διάφορα είδη που θεωρείται ότι προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο. Σε ένα φυλογενετικό δέντρο κάθε κόμβος αναπαριστά τον πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο των απογόνων (Woese, 1998).



Εικόνα 1. Ένα έριζο φυλογενετικό δέντρο που αναπαριστά τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ τάξων Βακτηρίων, Αρχαιοβακτηρίων και Ευκαρυωτικών.

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

Πολλοί ερευνητές θεωρούσαν ότι οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ειδών μπορούν να διαβαστούν απευθείας από τις απολιθωματικές καταγραφές. Για τις περισσότερες ομάδες όμως, ειδικά για εκείνες που δεν απολιθώνονται εύκολα, οι παλαιοντολογικές καταγραφές είναι πολύ αποσπασματικές και έτσι ελάχιστα χρήσιμες (Futuyma, 1986).

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1960, η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των φυσικών πληθυσμών στηριζόταν αποκλειστικά στη χρήση μορφολογικών χαρακτήρων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 40 ετών η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε μοριακό επίπεδο με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών έχει αποβεί εξαιρετικά χρήσιμη για τη διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των διάφορων πληθυσμών. Τα πλεονεκτήματα των μοριακών δεδομένων έναντι των μορφολογικών είναι τα εξής :

- Το DNA εξελίσσεται με πιο σταθερό ρυθμό από ότι τα μορφολογικά δεδομένα. Το γεγονός αυτό βοηθά στην καλύτερη κατανόηση των σχέσεων μεταξύ των οργανισμών.
- Τα μοριακά δεδομένα έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης σχέσεων σε όλα τα επίπεδα οργάνωσης από τους πληθυσμούς και τα είδη μέχρι τα φύλλα και τα βασίλεια.
- Τα μοριακά δεδομένα είναι λιγότερο υποκειμενικά.
- Τα μοριακά δεδομένα είναι άφθονα.

2. Μοριακές τεχνικές και εφαρμογή τους

Οι μοριακές τεχνικές άρχισαν να χρησιμοποιούνται το 1950 για την αλληλούχιση πρωτεϊνών και την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel) αμύλου για τη διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων.

Λόγω της υψηλής ακρίβειας που παρέχουν, της αυξανόμενης διαθεσιμότητας και της καλύτερης κατανόησης της αξίας των γενετικών δεδομένων, οι μοριακές τεχνικές αποτελούν το σημαντικότερο εργαλείο στην φυλογενετική ανάλυση. Μέχρι το 1990 οι περισσότερες εργασίες που έχουν δημοσιευτεί χρησιμοποιούσαν τα ισοένζυμα και το mtDNA για την ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων.

Στη συνέχεια παραθέτουμε με συντομία τις πιο κοινές βιοχημικές και μοριακές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την αποκάλυψη της γενετικής σύστασης και ποικιλομορφίας και τη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων.

α) Ισοένζυμα

Οι διαφορετικές μορφές των ενζύμων, που όμως έχουν την ίδια εξειδίκευση, ονομάζονται γενικά ισοένζυμα (Markert & Whitt, 1968). Τα ισοένζυμα καταλύουν την ίδια αντίδραση, αλλά διαφέρουν σε ορισμένες ιδιότητες, όπως θερμοανθεκτικότητα, συγγένεια με το υπόστρωμα, ευαισθησία σε αναστολείς, ιστοειδίκευση, δραστηριότητα. Ο παραπάνω ορισμός είναι γενικός. Έτσι, έχει επικρατήσει πια να χρησιμοποιείται ο όρος ισοένζυμα για τις μορφές των ενζύμων που κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους και ο όρος αλλοένζυμα για αλληλόμορφα του ενζύμου που κωδικοποιούνται από τον ίδιο γονιδιακό τόπο (Shaklee et al., 1990).

Με την ισοενζυμική ανάλυση αναλύεται η γενετική δομή των πληθυσμών των ειδών, εκτιμούνται παράμετροι όπως ο βαθμός ετεροζυγωτίας, το ποσοστό των πολυμορφικών γονιδιακών τόπων ή ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο. Ακόμα, όσον αφορά ένα είδος, μπορεί να δώσει πληροφορίες, όπως εάν τα άτομα προέρχονται όλα από έναν παμμικτικό πληθυσμό που βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ή από γενετικά διακριτές ομάδες. Επίσης, μπορεί να βρεθούν αλληλόμορφα μοναδικά για τους πληθυσμούς κάθε είδους τα οποία να το χαρακτηρίζουν και να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες. Επιπλέον μπορεί να υπολογισθεί ο βαθμός της διαπληθυσμιακής διαφοροποίησης και ο βαθμός της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών.

Ωστόσο, τα αλλοένζυμα εξελίσσονται αργά και σε αρκετές περιπτώσεις δεν έχουν τη δυνατότητα να διακρίνουν γενετικές διαφορές τόσο μέσα στους πληθυσμούς ενός είδους όσο και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών (Black et al., 1992; Cognato et al., 1995). Οι περιοχές του γονιδιώματος που κωδικοποιούν για τα περισσότερα αλλοένζυμα έχουν σοβαρή επίδραση σε σημαντικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες και επομένως είναι πιθανό να υπόκεινται σε ισχυρές επιλεκτικές πιέσεις.

Γενετικές πληθυσμιακές μελέτες με βάση τα αλλοένζυμα δεν αποκάλυψαν γενετικές διαφορές ανάμεσα σε δείγματα του είδους που μελετάμε, *Lepus europaeus*, που συλλέχθηκαν από Πολωνία (Hartl et al., 1992), Αυστρία (Hartl et al., 1993) και Βουλγαρία (Suchentrunk et al., 2000).

Συνεπώς, τα αλλοένζυμα μπορεί κάποιες φορές να οδηγήσουν στη συγχώνευση των ταξινομικών ομάδων.

β) Τεχνική RAPD

Σαν επέκταση των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιούν πολυμορφικούς δείκτες DNA, η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD*) αποτελεί μία τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει την ταξινομική ταυτότητα των ειδών, να προσδιορίσει τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα σε είδη και να διαχωρίσει δείγματα ανάμικτου γονιδιώματος.

Η χρησιμοποίηση της μεθόδου RAPD έγινε εφικτή μετά τις προόδους στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εξέταση της γενωμικής ποικιλότητας και έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία στην εξέταση πλήθους οργανισμών όπως στα βακτήρια (Welsh & Mc Clelland, 1990), στα φυτά (Mailier et al., 1994), στα ποντίκια (Welsh et al., 1991), στις αφίδες (Black et al., 1992), στους μύκητες (Lanfranco et al., 1995). Η RAPD τεχνική (Williams et al., 1990) μπορεί να ενισχύσει υψηλά επαναλαμβανόμενες περιοχές που μπορεί να συσσωρεύουν περισσότερες νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις σε σύγκριση με εκείνες που κωδικοποιούν για αλλοένζυμα. Ακόμη οι RAPD δείκτες είναι χρήσιμοι για την αναγνώριση γενετικών διαφορών μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους ή μεταξύ στενά συγγενικών ειδών (Cognato et al., 1995).

Η σύλληψη της ανάλυσης RAPD είναι απλή. Ποσότητες νανογραμμαρίων ολικού γενωμικού DNA με τη χρήση μικρών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (μήκους 10-20 ζευγών βάσεων), γνωστά ως εκκινητικά μόρια (primers), που περιέχουν τυχαίες αλληλουχίες, υποβάλλονται στην τεχνική PCR. Οι συνθήκες ενίσχυσης στο PCR δεν είναι οι τυπικές PCR συνθήκες, γιατί ως εκκινητικό μόριο χρησιμοποιείται ένα τυχαίο ολιγονουκλεοτίδιο και δεν απαιτείται η γνώση της αλληλουχίας του.

Τα πλεονεκτήματα της RAPD μεθόδου είναι:

- Η δυνατότητα μελέτης αγνώστων γονιδιωμάτων.
- Η μελέτη του DNA όταν μόνο περιορισμένες ποσότητες είναι διαθέσιμες.

Οι πιθανές δυσκολίες που προκύπτουν σε μια μελέτη με τη χρήση της μεθόδου RAPD είναι :

- Το μέγεθος του εκκινητικού μορίου.
- Η ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης PCR.
- Η πιθανότητα της ταυτόχρονης μετατόπισης κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ζωνών, οι οποίες ωστόσο έχουν διαφορετική προέλευση και σύνθεση.
- Η δυσκολία συνεχούς αναπαραγωγής των πειραματικών δεδομένων λόγω έλλειψης επαναληψιμότητας.

γ) VNTRs και SSRs

Τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη της δομής πληθυσμών και την εύρεση φυλογενετικών σχέσεων έχουν αρχίσει και χρησιμοποιούνται **πολυμορφισμοί μεγέθους ή "εν σειρά επαναλήψεις ποικίλου αριθμού" (VNTRs)**, καθώς και **"εν σειρά επαναλήψεις απλών αλληλουχιών" (SSRs)**. Οι VNTRs δημιουργούνται από την παρουσία μικρών αλληλουχιών, οι οποίες επαναλαμβάνονται πολλές φορές εν σειρά και είναι τοποθετημένες η μία μετά την άλλη, έτσι ώστε το τέλος της μιας να ακολουθεί η αρχή της επόμενης. Το χαρακτηριστικό που κάνει αυτούς τους πολυμορφισμούς χρήσιμους είναι ότι μπορεί να προκύψει ένας μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων, επειδή το συνολικό μέγεθος της επανάληψης μπορεί να διαφέρει από χρωμόσωμα σε χρωμόσωμα (Gelehrter et al., 2003).

Οι μικροδορυφόροι, **SSRs**, αποτελούν κλάσμα του επαναλαμβανόμενου DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπου το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας κυμαίνεται από 1-5 ζεύγη βάσεων (bp).

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες θεωρείται ότι δεν υπόκεινται σε επιλεκτικές πιέσεις. Οι μεταλλακτικοί ρυθμοί στο μικροδορυφορικό DNA είναι της τάξης του 10^{-5} - 10^{-2} δηλαδή 2-4 τάξεις μεγέθους μεγαλύτεροι από ό,τι στα ισοένζυμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού, δηλαδή πολλά αλληλόμορφα και υψηλή ετεροζυγωτία.

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

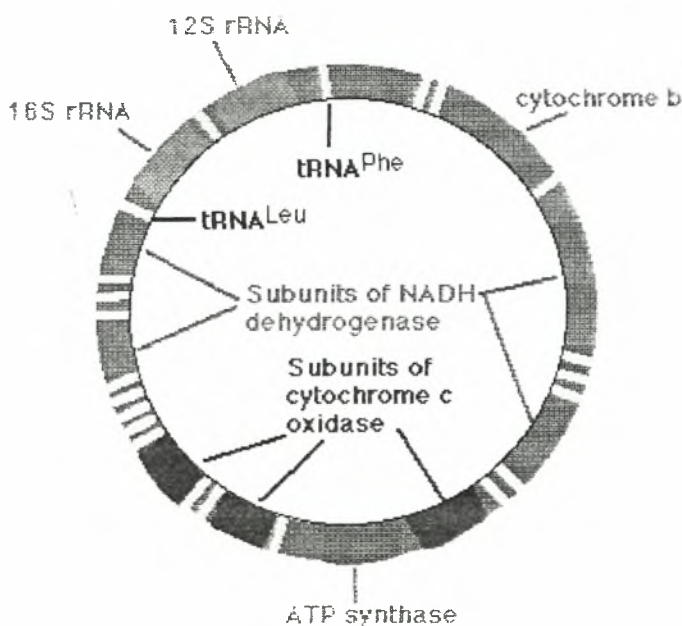
δ) Μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων τα οποία έχουν το δικό τους DNA, το μιτοχονδριακό (mt) DNA. Το mtDNA είναι απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Συγκεκριμένα, το μέγεθος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ζώων κυμαίνεται από 14000 ζευγάρια βάσεων (14 Kb) (στο νηματώδες, *Caenorhabditis elegans*), μέχρι 42000 ζευγάρια βάσεων (42 kb) (στο χτένι, *Placopecten megellanicus*), ενώ στα περισσότερα ζώα είναι γύρω στις 16-20 kb (Wolstenholme, 1992). Στους λαγούς του είδους που μελετάμε, *Lepus europaeus*, το μέγεθος ποικίλλει από 16300-17200 ζεύγη βάσεων (Thulin et al., 2001).

Τα πλεονεκτήματα του mtDNA σε σχέση με το πυρηνικό είναι ότι η απομόνωση του mtDNA των 16-20 kb από τα δισεκατομμύρια άλλα

νουκλεοτίδια του γονιδιώματος είναι σχετικά εύκολη λόγω φυσικού διαχωρισμού του. Το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται και μεταβιβάζεται σχεδόν αποκλειστικά μητρικά. Παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό μεταλλάξεων σε σχέση με το πυρηνικό DNA, στην αλληλουχία των βάσεων του. Έτσι, μπορούν να εντοπισθούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και σε περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι ίδιοι στο επίπεδο του πυρηνικού DNA (Avise et al., 1987).

Το μιτοχondριακό DNA των ζώων αποτελείται από 37 γονίδια, που κωδικοποιούν για 22 tRNA, 2rRNA και 13 mRNA. Τα τελευταία μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH, μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) και δύο υπομονάδες της μιτοχondριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 6 και 8).



Εικόνα 2. Κωδικοποιούσες περιοχές του mtDNA

Επίσης, το μιτοχονδριακό DNA περιλαμβάνει και μια μη κωδικοποιούσα περιοχή, την περιοχή ελέγχου ή βρόγχο D, όπου βρίσκονται οι προαγωγείς για τη μεταγραφή των δύο αλυσίδων καθώς και η ακολουθία έναρξης αντιγραφής της μιας αλυσίδας (Meyer, 1993).

Περιοχές όπως ιντρόνια, επαναλαμβανόμενο DNA, ψευδογονίδια απουσιάζουν συνήθως από το μιτοχονδριακό DNA των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, γεγονός που καθιστά το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση.

Η διάταξη των γονιδίων στο mtDNA των ζώων παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα, ιδιαίτερα για τα ψάρια, τα θηλαστικά και τα αμφίβια (Wilson et al., 1985). Ως πιθανή εξήγηση προτείνεται η συμπαγής δομή του μιτοχονδριακού DNA με την απουσία ιντρονίων και μεσογονιδιακών διαστημάτων. Στη διατήρηση της γονιδιακής διάταξης συμβάλλει και η απουσία ανασυνδυασμού μεταξύ των μορίων του και η σχεδόν αποκλειστικά μητρική κληρονόμησή του (Brown, 1985).

Κάθε άτομο περιλαμβάνει στα κύτταρά του χιλιάδες αντίγραφα του ίδιου όμως μορίου μιτοχονδριακού DNA (ομοπλασμία). Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι μια καινούρια μετάλλαξη μπορεί να δημιουργήσει νέο τύπο μιτοχονδριακού DNA στο ίδιο κύτταρο (ετεροπλασμία), έτσι ώστε να συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο δύο ή περισσότεροι γενότυποι. Τέτοιες περιπτώσεις ετεροπλασμίας έχουν παρατηρηθεί για παράδειγμα στους λαγούς που μελετάμε του είδους *Lepus europaeus* (Mamuris et al., 2001).

Ο ρυθμός εξέλιξης στο μιτοχονδριακό DNA έχει εκτιμηθεί ότι είναι υψηλότερος συγκριτικά με το πυρηνικό DNA στα θηλαστικά, ενώ αντιθέτως σε πολλά έντομα έχουν παρατηρηθεί παρόμοιοι ρυθμοί εξέλιξης (Meyer, 1993).

Ο ταχύτερος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA μπορεί να οφείλεται στους παρακάτω λόγους:

α) Η πολυμεράση του mtDNA δεν έχει ικανότητες επιδιόρθωσης, επειδή δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του mtDNA (Wilson et al., 1985).

β) Η έλλειψη ανασυνδυασμού, μέσω του οποίου η φυσική επιλογή θα μπορούσε να εξαλείψει τις ελαφρά βλαβερές μεταλλάξεις (Wilson et al., 1985).

γ) Στην παρουσία οξειδωτικών ριζών.

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

Το mtDNA είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα τμήματα του ζωικού γονιδιώματος. Αυτό χάρη στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα, τα οποία προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα στις πληθυσμιακές μελέτες. Το γεγονός ότι το δραστικό μέγεθος πληθυσμού του mtDNA είναι το 1/4 σε σύγκριση με το πυρηνικό (Birky et al., 1983), έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση λόγω των φαινομένων γενετικής παρέκκλισης κι έτσι το καθιστά πιο ικανό στην αποκάλυψη ειδικών πληθυσμιακών δεικτών. Από φυλογενετική σκοπιά, η έλλειψη ανασυνδυασμού σημαίνει ότι οι δείκτες του mtDNA μπορεί να χρησιμοποιηθούν στο να διερευνηθεί εάν τα άτομα των πληθυσμών είναι οργανωμένα σε μητριαρχικές σειρές. Οι λόγοι αυτοί καθιέρωσαν το mtDNA ως το δημοφιλέστερο γενετικό υλικό για τη μελέτη της δομής πληθυσμών, της γονιδιακής ροής, της βιογεωγραφίας και των φυλογενετικών σχέσεων σε ενδοειδικό και διαειδικό επίπεδο (Moritz et al., 1987).

Οι πρώτες έρευνες της ποικιλότητας του mtDNA απαιτούσαν μεγάλες ποσότητες ιστού και χρησιμοποιούσαν χρονοβόρα πρωτόκολλα, ενώ ο αριθμός των ατόμων που εξετάζονταν ήταν περιορισμένος και ανεπαρκής για αξιόπιστες πληθυσμιακές μελέτες. Η χρήση όμως κατάλληλων ανιχνευτών του mtDNA και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που επιτρέπει την ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών του mtDNA, έκανε την εξέταση της ποικιλότητας του mtDNA ευκολότερη και γρηγορότερη.

Σήμερα υπάρχουν αρκετοί εκκινητές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση διαφόρων περιοχών του mtDNA (Kocher et al., 1989). Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα μπορούν στη συνέχεια να μελετηθούν είτε με τη βοήθεια των ενζύμων περιορισμού και την *ανάλυση των RFLPs* ή με την εύρεση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας τους (*sequencing*).

Μελέτη του πολυμορφισμού του μιτογονδριακού DNA με τη μέθοδο του πολυμορφισμού του μεγέθους τμημάτων περιορισμού (RFLPs)

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

Η μετάλλαξη σε μια θέση οδηγεί σε απώλεια ή δημιουργία μιας θέσης κοπής. Στη μέθοδο RFLP, λοιπόν, γίνεται σύγκριση, μεταξύ των

περιοριστικών προτύπων των ατόμων που λαμβάνονται από διάφορα ένζυμα περιορισμού.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

- Η ευκολία λήψης δειγμάτων
- Οι ελάχιστες απαιτήσεις σε ποσότητες ιστού
- Η χρησιμοποίηση ιστών που δεν έχουν διατηρηθεί σε καλή κατάσταση (Μαμούρης, 2001).

Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται τα παρακάτω:

- Είναι απαραίτητη κάποια προϋπάρχουσα γνώση για τη μελετούμενη αλληλουχία.
- Πρέπει να αποδίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην προστασία του εξεταζόμενου DNA από τη <<μόλυνση>> με ξένο DNA.
- Η ύπαρξη ψευδογονιδίων στο πυρηνικό DNA από διπλασιασμό και μεταφορά του μιτοχονδριακού που μπορεί να οδηγήσουν σε λάθος συμπεράσματα (Μαμούρης, 2001).

3. Περιγραφή του *Lepus europaeus*

Η συστηματική κατάταξη του *L. europaeus* έχει ως εξής:

Φύλο: Chordate

Υπόφυλο: Vertebrate

Κλάση : Mammalia

Τάξη: Lagomorpha

Οικογένεια: Leporidae

Γένος: *Lepus*

Είδος: *Lepus europaeus*

Στο γένος *Lepus* ανήκουν, επίσης, τα παρακάτω είδη

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>):



Lepus alleni (antelope jackrabbit)
Lepus americanus (snowshoe hare)
Lepus arcticus (Arctic hare)
Lepus brachyurus (Japanese Hare)
Lepus californicus (black-tailed jackrabbit)
Lepus callotis (white-sided jackrabbit)
Lepus capensis (brown hare)
Lepus castroviejoi (Broom Hare)
Lepus comus (Yunnan hare)
Lepus coreanus (Korean hare)
Lepus corsicanus (Corsican hare)
Lepus crawshavi (Corsican Hare)
Lepus granatensis (Granada hare)
Lepus habessinicus
Lepus hainanus (Hainan hare)
Lepus mandshuricus (Manchurian hare)
Lepus oiostolus (woolly hare)
Lepus othus (Alaskan hare)
Lepus saxatilis (scrub hare)
Lepus sinensis (Chinese hare)
Lepus starcki (Ethiopian highland hare)
Lepus timidus (mountain hare)
Lepus tolai (Tolai Hare)
Lepus townsendii (white-tailed jackrabbit)

α) Φυσική Περιγραφή

Το βάρος του *Lepus europaeus* ποικίλλει από 3-5 κιλά. Το συνολικό μήκος του κυμαίνεται από 600-750 mm, το μήκος της ουράς του είναι 72-110 mm. Οι λαγοί αυτού του είδους έχουν μακριά αφτιά μήκους 94-102 mm, τα οποία είναι γκρίζα στο εσωτερικό τους. Το πρόσωπό τους είναι καστανό και η ουρά τους είναι μαύρη στην κορυφή και άσπρη στο κάτω μέρος της. Ακόμη δεν έχει παρατηρηθεί φυλετικός διμορφισμός (Bansfield, 1974).



β) Αναπαραγωγή

Η αναπαραγωγική περίοδος του *L. europaeus* είναι μεταξύ Ιανουαρίου/Φεβρουαρίου και μέσα καλοκαιριού. Η περίοδος κυοφορίας είναι μεταξύ 30 και 40 ημερών (Bansfield, 1974; Peterson, 1966). Τα νεογέννητα καθίστανται ικανά για αναπαραγωγή στους 8 μήνες με ένα χρόνο. Η μητέρα για να προστατέψει τα νεογέννητα από τα αρπακτικά τα διασκορπίζει σε μια μεγάλη περιοχή.

γ) Διατροφικές Συνήθειες

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί είναι φυτοφάγα, τρώγοντας χορτάρι, καρπούς δέντρων καιμανιτάρια (Banfield, 1974; Peterson, 1966).



δ) Σημασία για τον άνθρωπο

Ο *L. europaeus* είναι ανέκαθεν ένα θηρεύσιμο είδος, καθώς το κρέας του είναι νόστιμο και εξαιρετικής ποιότητας (Bansfield, 1974).

Σε μερικές περιοχές, ωστόσο, ο *L. europaeus* έχει ζημιογόνο δράση. Το πρόβλημα αφορά στις καταστροφές που προκαλεί στις αγροκαλλιέργειες.

ε) Κατανομή του *Lepus europaeus*

Η φυσική κατανομή του συγκεκριμένου είδους λαγού περιλαμβάνει την Ευρώπη (Γερμανία, Ιταλία, Γαλλία, Σκωτία, Αγγλία, Ελλάδα), την Κεντρική Ασία (Poli et al., 1991) τη Νότια και Κεντρική Αμερική (Bonino and Montenegro, 1997).

Οι λαγοί του είδους αυτού είναι ευρέως διασκορπισμένοι στην Κεντρική, Βόρεια και Νότια Ελλάδα και τα νησιά, όπου αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό είδος κυνηγιού και βρίσκεται σε ανοικτούς δασότοπους και σε καλλιεργήσιμη γη με λιβάδια .

4. Ταξινόμηση του *Lepus europaeus* και συγγενικών ειδών

Η ταξινόμηση των λαγών στην Ευρώπη εξακολουθεί να αντιμετωπίζει πολλά προβλήματα.

Ιστορικά, δύο είδη λαγών έχουν αναγνωριστεί από την Ιβηρική χερσόνησο, ο Ιβηρικός λαγός, *Lepus granatensis* και ο "καφέ" λαγός, *Lepus europaeus* (Miller, 1912). Η παρουσία μόνο του *Lepus capensis* στην Ιβηρία προτάθηκε από τον Petter (1959), ενώ οι Ellermann και Morrison-Scott (1951) αποδέχτηκαν τα *L.capensis*, *L.europaeus*. Ένα τρίτο είδος λαγού, το *L.castroviejoi*, περιγράφηκε από τον Palacios

(1976). Ο συγγραφέας αυτός βασισμένος σε μια πιο λεπτομερή μορφολογική ανάλυση υποστήριξε επίσης την παρουσία των *L. europaeus* και *L. granatensis*, όπως προτάθηκε από το Miller (1912). Ωστόσο, ο Corbet (1986) θεώρησε ότι οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ των *L. castroviejoi* και *L. europaeus* δεν ήταν αρκετές για να αιτιολογηθεί η ξεχωριστή τάξη του *L. castroviejoi*. Ωστόσο, επιπρόσθετες πληροφορίες από πρωτεϊνικούς δείκτες (Bonhomme et al., 1986) και από την ποικιλομορφία του mtDNA (Perez-Suarez et al., 1994) υποστήριξαν την ύπαρξη των τριών ειδών στην Ιβηρική χερσόνησο.

Ταξινομική αμφισβήτηση υπήρξε, επίσης, με το είδος της Ιταλίας, *L. Corsicanus*, που αρχικά θεωρήθηκε ένα ξεχωριστό είδος από τον De Winton (1898), αλλά αργότερα συμπεριλήφθηκε στο *L. europaeus* (Ellermann and Morrison-Scott, 1951; Flux and Angermann, 1990; Wilson and Reeder, 1993). Πρόσφατα μορφολογικά και μοριακά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το *L. corsicanus* είναι ένα ξεχωριστό είδος (Pierpaoli et al., 1999; Riga et al., 2001). Οι ταξινομικές αυτές αβεβαιότητες μέσα στο είδος *Lepus* πρέπει να προκύπτουν από χαμηλή ποικιλομορφία γονιδιακής δεξαμενής ή υβριδισμό μεταξύ των ειδών του λαγού. Εισδοχή μιτοχονδριακού DNA του *L. timidus* στο *L. europaeus* αναφέρεται από τον Thulin et al. (1997) στη Σουηδία, ενώ περιστασιακός υβριδισμός μεταξύ αυτών των δύο ειδών έχει ανακαλυφθεί και σε άλλες περιοχές (Fraguglione, 1996; Suchentrunk et al., 1999).

Στην Ελλάδα έχουν περιγραφεί ποικίλα υποείδη του *Lepus europaeus* (*Lepus europaeus carpathous*, *L. e. creticus*, *L. e. cyrensis*, *L. e. ghigii*, *L. e. meridiei*, *L. e. niethameri*, *L. e. parnassius*, *L. e. rhodius*, *L. e. transsylvanicus*) με βάση το χρώμα της γούνας, το μέγεθος του σώματος και χαρακτηριστικά του κρανίου και των δοντιών (De Beaux, 1929; Hilzheimer, 1906, 1908; Miller, 1912; von Wettstein, 1943; see also Chaworth-Musters, 1932; Kattinger, 1972; Ondrias, 1965;

Zimmermann et al., 1953; overview in De Beaufort, 1991). Ωστόσο, παρά τις ανεκδοτικές αυτές περιγραφές δεν υπάρχουν αξιόπιστα δεδομένα που να περιγράφουν την εξελικτική κατάσταση αυτών των λαγών (Suchentrunk et al., 2003).

5. Γενετικές μελέτες για το *L. europaeus* και άλλα συγγενικά είδη.

Το κλίμα και η βλάστηση της Ευρώπης κατά τη διάρκεια των τελευταίων παγετώνων, ανάγκασαν τους λαγούς του συγκεκριμένου είδους να απομακρυνθούν από τις περισσότερες περιοχές της Ευρώπης την εποχή του Πλειστόκαινου (Lang 1994).

Με τη βελτίωση του κλίματος όμως και την επακόλουθη αλλαγή της βλάστησης σε ευνοϊκό φυσικό περιβάλλον, οι λαγοί άρχισαν να επαναποικίζουν την Κεντρική και Νοτιοδυτική Ευρώπη από τις ανατολικές και νοτιανατολικές στέπες και από τις θαμνώδεις εκτάσεις (Corbet 1986). Κατά τη διάρκεια του δρόμου τους στην Κεντρική Ευρώπη ίσως να έχασαν μέρος της γενετικής τους ποικιλότητας (αριθμός αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο) εξαιτίας του μικρού δραστικού μεγέθους των πληθυσμών που εισβάλλουν και αποικίζουν (Nei et al. 1975).

Το 1993 οι Hartl et al. μελέτησαν τη γενετική ποικιλομορφία μέσα και ανάμεσα στους πληθυσμούς του λαγού *Lepus europaeus* με βάση τη μορφολογία, τα αλλοένζυμα και το mtDNA. Τα αποτελέσματα από τα αλλοένζυμα ήταν περισσότερο πληροφοριακά και αποκάλυψαν χαμηλή γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα στους πληθυσμούς, που οφείλεται σε ένα υψηλό επίπεδο μετανάστευσης. Η ποικιλομορφία που προέκυψε από το mtDNA και η αντίστοιχη από τα μορφολογικά δεδομένα μέσα στους

πληθυσμούς δε σχετίζονταν σημαντικά μεταξύ τους και δεν έδειξαν κάποια σχέση με τα αποτελέσματα των αλλοενζύμων. Τα ευρήματά τους, λοιπόν, έδειξαν ότι όταν η ποικιλομορφία προκύπτει από ένα μόνο χαρακτήρα, είτε αυτός είναι η μορφολογία, τα αλλοένζυμα ή το μιτοχονδριακό DNA, δεν μπορεί να είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής γενετικής ποικιλομορφίας μέσα στους πληθυσμούς.

Μελέτες των πληθυσμών των λαγών από βορειοδυτικές, νοτιοδυτικές και νότιες ευρωπαϊκές περιοχές με mtDNA RFLPs (Perez-Suarez, 1994) υποθέτουν ότι μετά τους παγετώνες πληθυσμοί από διάφορα καταφύγια κατευθύνθηκαν προς την Κεντρική Ευρώπη. Υπάρχουν, επομένως, διαφορετικά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας ανάμεσα στους πληθυσμούς της Ευρώπης (Hartl et al., 1993; Perez-Suarez et al., 1994; Thulin et al., 1997; Suchentrunk et al., 2000b).

Σε μια μελέτη βασισμένη στα αλλοένζυμα (Suchentrunk et al., 2002), η αλλοενζυμική ποικιλομορφία 91 λαγών του είδους *Lepus europaeus* από 7 περιοχές της Ελλάδας συγκρίθηκαν με υπάρχοντα δεδομένα από βουλγάρικους πληθυσμούς για να εξεταστεί η εμφάνιση συγκεκριμένων αλληλομόρφων στην Ελλάδα, που πιθανώς πηγάζουν από έναν απομονωμένο πληθυσμό του Πλειστόκαινου στα βόρεια Βαλκάνια.

Τρία νέα αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν στους ελληνικούς λαγούς με χαμηλές συχνότητες απόντα από περιοχές της κεντρικής και νότιας Ευρώπης (Hartl et al., 1994; Suchentrunk et al., 2000a, 2001) ενδεικτικά ίσως των καταφυγιακών πληθυσμών του Πλειστόκαινου στα νότια Βαλκάνια.

Οι Mamuris et al. 2001 μελέτησαν τη γενετική διαφοροποίηση και τη φυλογενετική κατάσταση πληθυσμών λαγού του είδους *Lepus europaeus* από την Κεντρική Ελλάδα, καθώς επίσης την επίδραση που μπορεί να έχουν οι απελευθερώσεις εκτρεφόμενων ατόμων από

ευρωπαϊκές χώρες στη γενετική δομή αυτοχθόνων πληθυσμών, χρησιμοποιώντας mtDNA-RFLPs.

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποίησαν 210 λαγούς του συγκεκριμένου είδους, 24 εκτρεφόμενους από δύο διαφορετικές φάρμες και 186 άγριους. Η ανάλυση της ποικιλομορφίας του mtDNA έγινε μέσω των RFLPs με τη χρήση της PCR. Τα ενισχυμένα κομμάτια από κάθε δείγμα παρατηρήθηκαν για πολυμορφισμό χρησιμοποιώντας 20 περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή ποικιλομορφία απλοτύπων, καθώς από τους 56 απλότυπους που βρήκαν οι 42 ήταν μοναδικοί, μέσα και ανάμεσα στους πληθυσμούς. Έδειξε, επίσης, ότι οι ελληνικοί λαγοί του είδους αυτού φαίνεται να είναι υψηλά πολυμορφικοί παρουσιάζοντας έναν υψηλό βαθμό πληθυσμιακής διαφοροποίησης. Ακόμη, συγκεκριμένα πρότυπα του mtDNA διαφοροποίησαν σαφώς τους εκτρεφόμενους από τους άγριους λαγούς. Η ανάλυση, επομένως, μέσω του mtDNA υποθέτει την εισδοχή αλλόχθονων γονιδιακών δεξαμενών σε αυτόχθονους πληθυσμούς.

Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη (Mamuris et al., 2002) χρησιμοποιήθηκε η RAPD μέθοδος για να εκτιμηθεί η γενετική διαφοροποίηση πληθυσμών του λαγού *Lepus europaeus* από την Κεντρική Ελλάδα. Οι ελληνικοί άγριοι πληθυσμοί συγκρίθηκαν με δείγματα από Αυστρία, Πολωνία, Γερμανία, Γαλλία και Βουλγαρία για να διερευνηθεί η επίδραση των απελευθερώσεων στη γενετική δομή των αυτοχθόνων πληθυσμών.

Σαν αποτέλεσμα της μελέτης προέκυψε η απουσία διαγνωστικών ζωνών μεταξύ των πληθυσμών του *Lepus europaeus* που επιβεβαιώνει το υψηλό επίπεδο γονιδιακής ροής μεταξύ πληθυσμών του είδους ανάμεσα σε μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις.

Η RAPD ανάλυση δείχνει ότι οι απελευθερώσεις μπορεί να έχουν αρχίσει να επηρεάζουν τη δομή των ελληνικών πληθυσμών και ενισχύουν την άποψη ότι η σωστή διαχείριση είναι απαραίτητη, προσαρμοσμένη όμως κατάλληλα στη βιολογία και στην οικολογία των τοπικών πληθυσμών.

Φυλογενετικές μελέτες έχουν γίνει επίσης και στα άλλα είδη που ανήκουν στο γένος *Lepus* και που αναφέρθηκαν, όπως το *Lepus timidus*, *Lepus capensis*, *Lepus granatensis*, *Lepus corsicanus* και άλλα που θα αναφερθούν παρακάτω.

Οι Alves et al. (2002) ανέλυσαν τις φυλογενετικές σχέσεις μέσα στο γένος *Lepus* ανάμεσα στα πέντε ευρωπαϊκά είδη λαγού βασισμένοι στις αλληλουχίες του μιτοχονδριακού και του πυρηνικού DNA. Εξέτασαν ειδικότερα αν υπάρχει υβριδισμός ανάμεσα στους λαγούς αυτούς, επειδή mtDNA από τον ορεινό λαγό *Lepus timidus* παρατηρήθηκε στους *L. granatensis*, *L. europaeus* από την Ιβηρική χερσόνησο, αρκετά μακριά από την περιοχή όπου συναντάται ο *L. timidus*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πήραν από την ανάλυση 587 ζευγών βάσεων του γονιδίου του κυτοχρώματος b, ένας σημαντικός αριθμός ατόμων του *L. granatensis* και *L. europaeus* δεν ξεχωρίζουν από το *L. timidus*, αν και αυτά τα τρία είδη είναι οικολογικά και μορφολογικά σαφώς διαφοροποιημένα (Flux and Angermann, 1990).

Οι Alves et al. (2000) περιέγραψαν έξι νέους γενετικούς πολυμορφισμούς για τον Ιβηρικό λαγό (*Lepus granatensis*), τέσσερις για τον "καφέ" λαγό (*Lepus europaeus*). Περιέγραψαν το γενετικό πολυμορφισμό της PEPC στον Ιβηρικό λαγό και επιβεβαίωσαν την ύπαρξή του στον "καφέ" λαγό (Hartl, 1987). Επιβεβαίωσαν ακόμη την ύπαρξη των αλληλομόρφων των αλυσίδων α_1 και α_2 της αιμογλοβίνης στον "καφέ" λαγό που είχε περιγραφεί από τους Hartl και Ferrand (1993).

Οι Perez-Suarez et al. (1994), ανέλυσαν τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των λαγών *Lepus castroviejoii*, *Lepus europaeus*, *Lepus granatensis* και *Lepus capensis* με βάση το mtDNA.

Η ποικιλομορφία του mtDNA ανάμεσα σε δείγματα του αφρικανικού λαγού, *Lepus capensis* και τριών ευρωπαϊκών λαγών από την Ισπανία, *Lepus castroviejoii*, *L. europaeus*, *L. granatensis* αναλύθηκε χρησιμοποιώντας επτά περιοριστικά ένζυμα. Ανάμεσα στα 34 ζώα που εξετάστηκαν βρέθηκαν 14 απλότυποι. Το mtDNA του *L. capensis* ήταν το πιο ποικιλόμορφο, γεγονός που είναι συμβατό με την αλλοπάτρια αφρικανική κατανομή και με μια αφρικανική καταγωγή των ευρωπαϊκών λαγών.

Τα αποτελέσματα, επίσης, έδειξαν ότι ο *L. europaeus* είτε υπήρχε σαν ένας μεγάλος πληθυσμός για μεγάλο χρονικό διάστημα ή είχε διασπαστεί. Προκύπτει ακόμη ότι ο *L. europaeus* είναι ο συνηθισμένος φυλογενετικός κορμός που έχει διαφοροποιηθεί κατά τη διασπορά του σε όλη την Ευρώπη και από το οποίο έχουν προκύψει τα είδη *L. castroviejoii* και *L. granatensis*.

6. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η χρήση μοριακών τεχνικών προκειμένου να προσδιοριστούν δείκτες για την ταυτοποίηση και τη φυλογένεση φυσικών πληθυσμών του είδους *Lepus europaeus*, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Συγκεκριμένα εκτιμάται ο βαθμός διαφοροποίησης στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA, μέσω των πολυμορφισμών περιοριστικών τμημάτων (RFLPs), όπως αυτός αποκαλύπτεται από την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του με τη χρήση της PCR και τη χρήση ενζύμων περιορισμού.

Από την εργασία αυτή μπορούμε να διαφοροποιήσουμε και να ταυτοποιήσουμε τους αυτόχθονες από αλλόχθονους πληθυσμούς βασισμένοι στους απλοτύπους, οι οποίοι είναι διαφορετικοί σε κάθε περίπτωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα εργασία το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν πληθυσμοί του είδους *Lepus europaeus* της οικογένειας Leporidae. Η συστηματική κατάταξη για το συγκεκριμένο είδος έχει αναφερθεί στην εισαγωγή.



2. Δειγματοληψία

Οι περιοχές από τις οποίες προέρχεται το βιολογικό υλικό, καθώς και τα όργανα από τα οποία πάρθηκαν οι ιστοί αναφέρονται στον πίνακα 1. Εκτός από τις περιοχές που αναφέρονται, δύο δείγματα λαγών προέρχονταν από την Τουρκία (*Anatolian, An*) και δύο από την Ελβετία (*Lepus timidus, Lt*).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Περιοχές δειγματοληψίας και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΟΡΓΑΝΑ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Λ ₁	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Λ ₂	ΝΕΦΡΟΙ
ΑΡΤΑ	Λ ₄	ΠΟΔΙ
ΑΡΤΑ	Λ ₅	ΝΕΦΡΟΙ

ΑΡΤΑ	Λ ₆	ΝΕΦΡΟΙ
ΑΡΤΑ	Λ ₇	ΝΕΦΡΟΙ
ΕΛΑΦΟΤΟΠΟΣ ΖΑΓΟΡΙ	Λ ₈	ΝΕΦΡΟΙ
ΕΛΑΦΟΤΟΠΟΣ ΖΑΓΟΡΙ	Λ ₉	ΝΕΦΡΟΙ
ΕΛΑΦΟΤΟΠΟΣ ΖΑΓΟΡΙ	Λ ₁₀	ΝΕΦΡΟΙ
ΕΛΑΦΟΤΟΠΟΣ ΖΑΓΟΡΙ	Λ ₁₁	ΝΕΦΡΟΙ
ΠΤΟΛΕΜΑΙΔΑ	Λ ₁₂	ΠΟΔΙ
ΠΤΟΛΕΜΑΙΔΑ(ΚΟΥΡΙ)	Λ ₁₃	ΠΟΔΙ
ΚΑΡΔΙΤΣΑ(ΠΑΛΑΜΑΣ)	Λ ₁₄	ΠΟΔΙ
ΓΡΕΒΕΝΑ	Λ ₁₅	ΠΟΔΙ
ΓΡΕΒΕΝΑ	Λ ₁₆	ΠΟΔΙ
ΑΘΑΜΑΝΙΚΑ ΟΡΗ	Λ ₁₇	ΠΟΔΙ
ΚΟΖΑΝΗ	Λ ₁₈	ΠΟΔΙ
ΦΙΛΙΑΤΕΣ ΘΕΣΠΡΩΤΙΑΣ	Λ ₁₉	ΠΟΔΙ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Λ ₂₁	ΠΟΔΙ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Λ ₂₂	ΠΟΔΙ
ΚΟΖΑΝΗ	Λ ₂₄	ΠΟΔΙ
ΚΟΖΑΝΗ	Λ ₂₅	ΝΕΦΡΟΙ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Λ ₂₆	ΠΟΔΙ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Λ ₂₇	ΠΟΔΙ
ΤΡΙΚΑΛΑ	Λ ₂₈	ΠΟΔΙ
ΜΕΣΟΠΥΡΓΟΣ ΑΡΤΑΣ	Λ ₂₉	ΠΟΔΙ
ΚΕΡΚΥΡΑ	Λ ₃₀	ΠΟΔΙ
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	Λ ₃₁	ΠΟΔΙ
	Λ ₃₂	ΣΠΛΗΝΑΣ
ΛΕΧΑΙΝΑ ΗΛΕΙΑΣ	Λ ₃₃	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ ₃₄	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ ₃₅	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ ₃₆	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ ₃₇	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ ₃₈	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ ₃₉	ΠΟΔΙ

ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ40	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ41	ΠΟΔΙ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	Λ42	ΠΟΔΙ
ΒΟΛΟΣ	Λ43	ΝΕΦΡΟΙ
ΒΟΛΟΣ	Λ44	ΝΕΦΡΟΙ
ΑΓΡΙΝΙΟ	Λ45	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ46	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ47	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ48	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ49	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ50	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ51	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ52	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ53	ΠΟΔΙ
ΛΟΥΤΡΑΚΙ	Λ54	ΠΟΔΙ
ΚΑΣΤΟΡΙΑ	604	ΝΕΦΡΟΙ
ΚΙΛΚΙΣ	607	ΝΕΦΡΟΙ
ΑΜΦΙΣΣΑ	645	ΝΕΦΡΟΙ
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	594	ΝΕΦΡΟΙ
ΒΟΙΩΤΙΑ	741	ΝΕΦΡΟΙ
ΣΟΧΟΣ	A6047	ΝΕΦΡΟΙ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	A6228	ΝΕΦΡΟΙ

3. Απομόνωση ολικού DNA

Βασικό και πρωταρχικό βήμα για τη μελέτη του DNA αποτελεί η σωστή απομόνωσή του από τα κύτταρα των οργανισμών. Ο όρος σωστή απομόνωση περιλαμβάνει και ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτήρα. Ζητείται πάντα μια μέθοδος απομόνωσης DNA αποδοτική ποσοτικά, αλλά που να δίνει DNA σε καλή κατάσταση, χωρίς να είναι δηλαδή διασπασμένο σε πολύ μικρά κομμάτια και δεν μπορούν να αναλυθούν. Η

επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται πάντα από το είδος και την ποσότητα των διαθέσιμων κυττάρων, αλλά και από τη μοριακή κατάσταση στην οποία θα πρέπει να είναι το DNA.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την εξαγωγή και απομόνωση του ολικού DNA έγινε σύμφωνα με τους Bernatchez et al. (1988) με κάποια τροποποίηση και έχει ως εξής:

➤ Αρχικά τοποθετούμε τον ιστό, αρκετά τεμαχισμένο, σε σωλήνα erpendorf του 1,5 ml και προσθέτουμε 1 ml διαλύματος εξαγωγής (extraction buffer).

Το παραπάνω διάλυμα αποτελείται από 2ml Tris-HCl 2M pH: 8.5., 2ml EDTA 0,5 M, 4ml NaCl 5M, 92 ml d.d.H₂O.

Το Tris-HCl ρυθμίζει το pH και περιέχει οξύ και βάση.

Το EDTA δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα Ca⁺², Mg⁺², τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Επομένως, με το διάλυμα αυτό απενεργοποιούνται οι νουκλεάσες, οι οποίες πιθανό να διασπάσουν το DNA.

Το NaCl και το EDTA βοηθούν στην ομογενοποίηση του ιστού διασπώντας τους συνδετικούς ιστούς και τα κύτταρα από τα οποία θα απομονωθεί το DNA.

➤ Στη συνέχεια αναδεύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας φυγόκεντρο erpendorf στις 10.000 στροφές για 2 λεπτά.

➤ Κατόπιν αδειάζουμε το υπερκείμενο προσεκτικά, προσθέτουμε ξανά 1 ml (extraction buffer) και ακολουθούμε το προηγούμενο στάδιο ξανά.

➤ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και προσθέτουμε 400 μl διαλύματος πέψης (digestion buffer), το οποίο προηγουμένως έχουμε ανακινήσει αρκετά.

Το digestion buffer αποτελείται από 18 ml extraction buffer, 2 ml SDS 10% και 100μl διαλύματος proteinase K (100 mg/ml).

Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό που συμμετέχει στη διάσπαση της μεμβράνης του πυρήνα, στην αποδιάταξη της χρωματίνης, καθώς και στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών γεγονός που προστατεύει το DNA από τη δράση των νουκλεασών.

Η πρωτεϊνάση K προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών.

- Αναδεύουμε έντονα ώστε να αναμιχθεί ο ιστός-ίζημα με το διάλυμα.
- Τοποθετούμε στη συνέχεια τα δείγματα σε υδατόλουτρο με τη βοήθεια λεπτού φενιζόλ, ώστε το υγρό τμήμα των δειγμάτων να είναι βυθισμένο στους 37 °C για 2 ώρες.
- Κάθε μισή ώρα ανακινούμε τα δείγματα ώστε να επαναιωρηθεί το ίζημα.
- Κατόπιν προσθέτουμε 150μl οξικού νατρίου, αναδεύουμε έντονα και τοποθετούμε τα δείγματα στους -20 °C για 15 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf όπου προσθέτουμε 1 ml εξισορροπημένης φαινόλης.

Η φαινόλη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών και διαχωρίζει τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες από τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA. Το διάλυμα της φαινόλης πρέπει να έχει pH μεγαλύτερο του 7, γιατί σε όξινο περιβάλλον το DNA κατανέμεται κυρίως στη μεσόφαση.

- Αναδεύουμε έντονα σε Vortex και φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 20 λεπτά στους 4 °C.
- Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθέτουμε 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης. Ακολουθεί μικρή ανάδευση σε Vortex.

Το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας, συμμετέχει στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο.

- Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 5 λεπτά στους 4⁰C και μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προσθέτουμε κατόπιν 1 ml χλωροφόρμιο-ισοαμυλική και κάνουμε μικρή ανάδευση σε Vortex.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά στους 4⁰C.
- Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προσθέτουμε 1 ml παγωμένη αιθανόλη 100% και τα τοποθετούμε στους -20⁰C για όλο το βράδυ. Η παγωμένη αιθανόλη αφυδατώνει το DNA και προκαλεί την κατακρήμνισή του.
- Μετά την κατάψυξη τοποθετούμε τα δείγματα στη φυγόκεντρο για 20 λεπτά στους 4⁰C. Η φυγοκέντρωση αυτή μας δίνει το ίζημα.
- Κατόπιν μεταφέρουμε τα δείγματα στο φούρνο στους 37⁰C για 1 ώρα για να στεγνώσουν και στη συνέχεια προσθέτουμε 100 μl νερό.

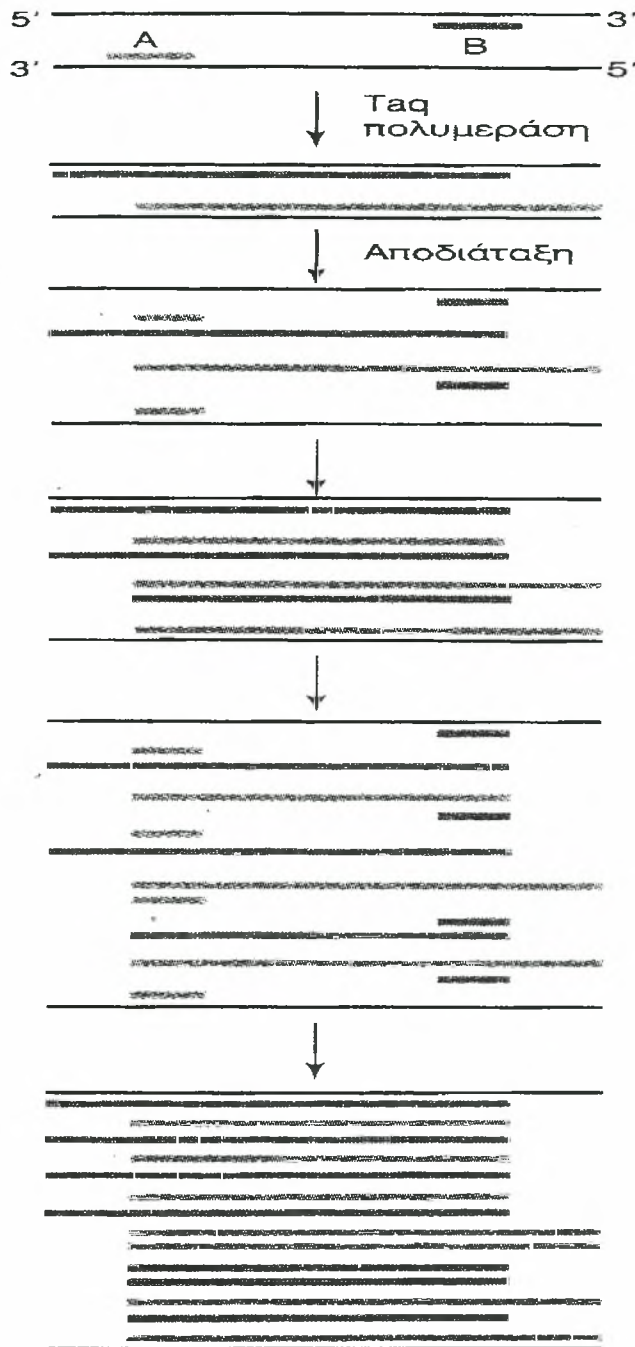
4. Πολλαπλασιασμός τμημάτων του mtDNA με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος (Saiki et al., 1988).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου (Mullis et al., 1987) στηρίζεται στη χρήση:

- Ειδικής DNA πολυμεράσης, για παράδειγμα Taq polymerase, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή, αντέχει επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94-95 °C.
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, συνήθως 15-30 βάσεων, τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers).
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂.
- Ειδικού διαλύματος (buffer) για την Taq πολυμεράση.
- Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.

Αρχικά, το DNA θερμαίνεται και αποδιατάσσεται, οπότε από δίκλωνο μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Κατόπιν, οι εκκινητές θα βρουν τη συμπληρωματική τους αλληλουχία στο συνολικό μίγμα του DNA και θα υβριδοποιηθούν εκεί. Προστίθεται στη συνέχεια η Taq πολυμεράση και λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA. Η σύνθεση γίνεται πάντα προς την κατεύθυνση 5' → 3'. Έπειτα το μίγμα αποδιατάσσεται πάλι, περισσότεροι εκκινητές ενώνονται και η αντίδραση της πολυμεράσης επαναλαμβάνεται. Όλη αυτή η διαδικασία μπορεί να γίνει κυκλικά με κάθε κύκλο να διαρκεί λίγα μόνο λεπτά και 30-40 κύκλοι μπορεί να πραγματοποιηθούν χωρίς να χρειαστεί να προστεθούν καινούργιο ένζυμο ή εκκινητές.



Εικόνα 3. Διάγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι σύνθεσης DNA χρησιμοποιώντας τους εκκινητές A και B έχουν σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση ενός εκθετικού ποσού από το DNA, που βρίσκεται μεταξύ των δύο αυτών εκκινητών.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα στάδια της PCR:

α) Η ενζυμική αντίδραση

Η σημαντικότερη βελτίωση στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR έγινε με την ανακάλυψη DNA πολυμερασών που, όπως αναφέραμε, είναι θερμοσταθερές και επιπλέον δε χρειάζεται προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο πολυμερισμού.

Η Taq πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94 kDa, βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού 75-80 °C και ταχύτητα σύνθεσης 150 νουκλεοτιδίων ανά μόριο ενζύμου το δευτερόλεπτο. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA από το τέλος του εκκινητή χρησιμοποιώντας το αρχικό DNA ως μήτρα.

β) Αποδιάταξη (Denaturation)

Για να πετύχει η αντίδραση PCR είναι πολύ σημαντικό να γίνεται ολική αποδιάταξη του DNA στόχου και του προϊόντος σε κάθε κύκλο. Είναι απαραίτητη μια αρχική αποδιάταξη και κατόπιν ακολουθεί η αποδιάταξη. Τόσο η αρχική αποδιάταξη όσο και η αποδιάταξη πραγματοποιούνται στους 92-95 °C.

Παρόλο που η υψηλή θερμοκρασία είναι τελείως απαραίτητο βήμα για την αποδιάταξη, χρειάζεται προσοχή ώστε να μη διαρκεί περισσότερο του αναγκαίου γιατί ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.

γ) Συγκόλληση εκκινητών (Annealing)

Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων ή εκκινητών (primers), εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία υβριδοποίησης, αυξάνεται η ειδικότητα του τελικού προϊόντος και έτσι περιορίζεται η υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων σε μη ειδικές περιοχές. Ο υβριδισμός πραγματοποιείται στους 50- 65 °C.

Οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (T_m).

δ) Επέκταση των ολιγονουκλεοτιδίων (Extension)

Ο χρόνος για την επέκταση εξαρτάται από το μήκος, τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Η επέκταση συνήθως γίνεται στους 70-78°C. Στη θερμοκρασία αυτή η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο, ανάλογα με το pH, τη συγκέντρωση ιόντων και το ρυθμιστικό διάλυμα. Συνήθως, ακολουθεί και μια τελική επέκταση στους 70-78 °C.

ε) Αριθμός κύκλων

Ο αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον ιδανικό συνεπάγεται αύξηση των μη ειδικών προϊόντων

της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αριθμός αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη ανίχνευση του DNA στόχου.

5. Περιοχές του mtDNA που ενισχύθηκαν και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τριών περιοχών του μιτοχονδριακού γονιδιώματος:

- i) της περιοχής ελέγχου (D-loop) 1800 περίπου βάσεων,
- ii) την περιοχή COI 1300 περίπου βάσεων,
- iii) την περιοχή 12s-16s rRNA 2000 περίπου βάσεων.

Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος της Control region χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζευγάρι εκκινητών (Palumbi et al., 1991):

L 14841 5' AAAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3'

H 16498 5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3'

Για τον πολλαπλασιασμό της πρώτης υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος C χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές (Palumbi et al., 1991):

L 5950 5' ACAATCACAAAGAYATYGG 3'

H 7196 5' AGAAAATGTTGWGGGAARAA 3'

Για τον πολλαπλασιασμό του ριβοσωμικού RNA χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών (Palumbi et al., 1991):

L 1091 5' AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT 3'

H 3080 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός των τριών τμημάτων του mtDNA πραγματοποιήθηκε σε συσκευή eppendorf.

Αρχικά γινόταν αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95 °C για 4 min. Κατόπιν, ακολούθησαν τρία στάδια με διαφορετικές θερμοκρασίες και συνθήκες για κάθε περιοχή που παρουσιάζονται παρακάτω :

i) Για την περιοχή D-loop:

Αποδιάταξη: 95 °C για 40 sec

Συγκόλληση Primer: 52 °C για 55 sec

Επέκταση: 72 °C για 1min και 4 sec

ii) Για την περιοχή COI:

Αποδιάταξη : 95 °C για 35 sec

Συγκόλληση Primer: 53 °C για 50 sec

Επέκταση : 72 °C για 1 min και 30 sec

iii) Για την περιοχή 12s-16s rRNA:

Αποδιάταξη : 95 °C για 40 sec

Συγκόλληση Primer: 50 °C για 1 min

Επέκταση : 72 °C για 2 min

Το πρόγραμμα περιελάμβανε 34 επαναλαμβανόμενους κύκλους.

Ολοκληρωνόταν με ένα στάδιο τελικής επέκτασης στους 72 °C για 10 min.

6. Διαδικασία που ακολουθήθηκε για PCR

Θα αναφερθούμε σε μια κλασική διαδικασία που ακολουθήσαμε. Αρχικά αριθμούμε τόσα σωληνάκια όσος και ο αριθμός των δειγμάτων που θέλουμε να αναλύσουμε. Προσθέτουμε στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα DNA. Προετοιμάζουμε το μίγμα, το οποίο για την περιοχή D-loop για παράδειγμα, περιέχει 50 μl PCR buffer με αρχική συγκέντρωση 10x, 50μl MgCl₂ 25mM, 10 μl dNTP's 10 mM το καθένα, 350μl dH₂O και 0,5μl από τον κάθε primer.

Στο τέλος βάζουμε στο μίγμα και 3μl Taq πολυμεράσης 5U/μl. Η συνολική ποσότητα της αντίδρασης είναι 50 μl και για να βρούμε την ποσότητα από το μίγμα που θα προσθέσουμε στα σωληνάκια αφαιρούμε από την ποσότητα της αντίδρασης την ποσότητα DNA που προσθέσαμε.

Την ίδια διαδικασία ακολουθήσαμε και για την ενίσχυση τμημάτων της COI και της περιοχής 12-16S rRNA, χρησιμοποιώντας τις ίδιες ποσότητες αντιδραστηρίων εκτός από μεμονωμένες περιπτώσεις που αλλάξαμε την ποσότητα του DNA ή την ποσότητα των εκκινητών.

7. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των μακρομορίων με βάση το φορτίο και το μοριακό τους βάρος. Είναι η μετακίνηση ενός φορτισμένου μορίου υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου.

Από τους διάφορους τύπους πηκτής που υπάρχουν χρησιμοποιήσαμε δύο, τις πηκτές αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης.

Οι πηκτές παρέχουν ένα μέσο διαχωρισμού των μακρομορίων (νουκλειικών οξέων και πρωτεϊνών) με βάση το μέγεθός τους. Μπορούν,

επομένως, να διαχωριστούν δύο ή περισσότερα τμήματα διαφορετικού μεγέθους.

α) Πηκτή Αγαρόζης

Η αγαρόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης. Η πηκτή αγαρόζης συνίσταται από γαλακτόζη και 3,6- ανυδρογαλακτόζη που συνδέονται με 1 → 4 γλυκοζιτικό δεσμό. Ο σχηματισμός των πόρων είναι μια φυσική διαδικασία που προκύπτει από αναδιάταξη των μορίων που την αποτελούν. Μειονέκτημα της συγκεκριμένης πηκτής αποτελεί το ανομοιόμορφο μέγεθος των πόρων που έχει σαν αποτέλεσμα μικρή ικανότητα διαχωρισμού των μορίων με μικρή διαφορά στο μοριακό τους βάρος.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρασκευάσαμε πηκτή αγαρόζης 2% χρησιμοποιώντας τα παρακάτω:

- 30 ml TAE 1x
- 0,6 gr αγαρόζη
- 2,5 ml βρωμιούχο αιθίδιο

Το TAE, όπως και το TBE, που χρησιμοποιείται στην παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι δύο διαλύματα που χρησιμοποιούνται εκτενώς στην ηλεκτροφόρηση. Το σύμβολο T αντιστοιχεί στο Tris, ένα χημικό διάλυμα που βοηθά στη ρύθμιση του pH, το E στο EDTA, το οποίο δημιουργεί χημικά σύμπλοκα με κατιόντα, όπως το μαγνήσιο, εμποδίζοντας έτσι τη δράση των νουκλεασών. Τέλος, το A και το B

συμβολίζουν το Οξικό και Βορικό οξύ αντίστοιχα και παρέχουν την κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων στο διάλυμα.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Αρχικά, ζυγίσαμε 0,6 gr αγαρόζης και τα προσθέσαμε σε μία κωνική φιάλη στην οποία προηγουμένως είχαμε προσθέσει 30 ml TAE. Τοποθετήσαμε, κατόπιν τη φιάλη στο φούρνο μικροκυμάτων έως ότου αρχίσει να βράζει. Την αφήσαμε για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προσθέσαμε 2,5 μl βρωμιούχο αιθίδιο. Έγινε έγχυση του διαλύματος σε ειδικό πιάτο που χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση και αφού τοποθετήσαμε και τις ειδικές χτένες για τη δημιουργία πηγαδιών, το αφήσαμε να σταθεροποιηθεί. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε το gel που δημιουργήθηκε στην ειδική συσκευή και φορτώσαμε στα πηγάδια τα δείγματα από την PCR, βάζοντας 8 λ DNA και 2,5 λ χρωστική (loading buffer). Στη συσκευή εφαρμόζεται τάση 200 Volt.

Μετά τον πολλαπλασιασμό στην πηκτή αγαρόζης γινόταν ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR. Στα άτομα που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα ακολούθησαν πέψεις με ένζυμα περιορισμού και κατόπιν ηλεκτροφόρηση στην πηκτή πολυακρυλαμίδης.

β) Πηκτή πολυακρυλαμίδης

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης είναι πολύ σταθερή και χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και μικρών νουκλεϊκών οξέων. Σχηματίζεται από τον πολυμερισμό δύο συστατικών, ακρυλαμίδιο και N,N'-μεθυλεν-bis-ακρυλαμίδιο (Bis). Στην αντίδραση αυτή πολυμερισμού είναι απαραίτητο το υπερθειικό αμμώνιο

(Ammonium Persulfate) που παράγει ελεύθερες ρίζες, απαραίτητες για τον πολυμερισμό. Η αντίδραση καταλύεται από το TEMED. Πρόκειται για τον καταλύτη N,N,-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη που καταλύει τη διάδοση ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης της πηκτής ακρυλαμίδης είναι το οργανωμένο και ομοιόμορφο μέγεθος των πόρων και η μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού των μορίων με μικρή διαφορά μεγέθους.

Το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι όταν το πολυακρυλαμίδιο αποπολυμερίζεται δρα σα νευροτοξίνη και μπορεί να προκαλέσει σημαντική νευρολογική βλάβη.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή 50 ml πηκτής πολυακρυλαμίδης 6% χρησιμοποιήσαμε:

- 4,8 gr. ουρίας
- 10 ml από το μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%
- 2,5 ml TBE 20x ή 10 ml TBE 5X
- το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται με dH₂O

Κατόπιν προσθέτουμε στο προηγούμενο διάλυμα

- 50 ml TEMED
- 300 ml διαλύματος APS (Ammonium Persulfate) 20%

Για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης αμέσως το διάλυμα χύνεται στη συσκευή πηκτής και τοποθετείται η χτένα δημιουργίας πηγαδιών.

8. Πένψη με ένζυμα περιορισμού.

Ετοιμάζαμε κάθε φορά δύο σειρές από 14 σωληνάκια erpendorf στα οποία, ανάλογα με το αν παρατηρήσαμε καλά εμφανείς ή αχνές μπάντες στο gel αγαρόζης, προσθέσαμε 2 και 3 μ l DNA αντίστοιχα.

Προετοιμάσαμε, ακόμη, ένα μίγμα που για κάθε άτομο αναλογούσαν οι παρακάτω ποσότητες:

- 0,5 λ buffer του κάθε ενζύμου,
- 2 Unit ενζύμου (π.χ όταν το ένζυμο έχει συγκέντρωση 10U/ λ , απαιτούνται 0,2 λ ενζύμου),
- 0,1 λ BSA ενζύμου όταν υπάρχει,
- 5 λ H₂O.

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήσαμε είναι της εταιρείας New England Biolabs :

Για τη D-loop: Alu I, Ase I, Ava II, Dde I, Hae III, HinF I, Mbo I, Mse I, Msp I, Taq I, Xba I, BstI, Aci I, Hha I.

Για τη COI: Alu I, Hae III, Hha I, HinF I, BstI , Mbo I, Ava II, Aci I, Ase I, Dde I, Mse I, Msp I, Taq I.

Για τη 12s-16s rRNA : Aci I, Alu I, Ase I , BstI, Dde I, EcoRI, Hae III, Hha I, Hinc II, HinF I, Hpa I, Mbo I, Taq I, Xba I, MseI .

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η αλληλουχία αναγνώρισης των παραπάνω ενζύμων.

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης
Aci I	C ↓ CGC
Alu I	AG ↓ CT
Ase I	AT ↓ TAAT
Ava II	G ↓ G(AT) CC
BstI	CG ↓ CG
Dde I	C ↓ TNAG
EcoRI	G ↓ AATTC
Hae III	GG ↓ CC
Hha I	GCG ↓ C
Hinc II	GTP _y ↓ P _u AC
HinF I	G ↓ ANTC
Hpa I	GTT ↓ AAC
Mbo I	↓ GATC
Mse I	T ↓ TAA
Msp I	C ↓ CGG
Taq I	T ↓ CGA
Xba I	T ↓ CTAGA

Κατόπιν, τοποθετήσαμε τα σωληνάκια στο φούρνο για επώαση στους 37 °C (εκτός από το Taq στους 65 °C), ολόκληρη τη νύχτα.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Την επόμενη τοποθετήσαμε τα δείγματα στο gel πολυακρυλαμίδης, προσθέτοντας σε κάθε σωληνάκι 3λ χρωστική. Επίσης, στο πηγάδι που βρίσκεται στο κέντρο της πηκτής προσθέσαμε 2λ μάρτυρα (ladder 100 bp). Στο τέλος της πηκτής προσθέσαμε 1 λ άκοπου τμήματος (PCR προϊόν χωρίς περιοριστικό ένζυμο). Στη συσκευή εφαρμόστηκε τάση 100V.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα πρότυπα που δείχνουν τις θέσεις κοπής του κάθε περιοριστικού ενζύμου στις τρεις περιοχές του μιτοχονδριακού DNA που μελετήσαμε περιγράφονται με ένα συγκεκριμένο λατινικό χαρακτήρα (A,B,C κλπ.). Η σύνδεση όλων των χαρακτήρων όλων των ενζύμων περιορισμού και από τις τρεις περιοχές που μελετήσαμε μας δίνει τον απλότυπο του κάθε ατόμου. Έτσι, το κάθε άτομο χαρακτηρίστηκε από έναν κωδικό που περιέγραφε τον σύνθετο mtDNA γενότυπο (απλότυπο). Πολλοί από τους απλότυπους είχαν διαφορετικούς κωδικούς που οφείλονται στις διαφορές στις θέσεις κοπής των ενζύμων που προέκυψαν από την προσθήκη ή απώλεια μιας βάσης στο mtDNA. Τα πρότυπα των θέσεων κοπής των περιοριστικών ενζύμων αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τα στατιστικά πακέτα REAP (McElroy et al., 1991) και PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993). Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων.

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι απόστασης, UPGMA και Neighbor-Joining.

Η UPGMA μέθοδος περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Sneath και Sokal (1973). Απαραίτητη προϋπόθεση της μεθόδου είναι οι διάφορες φυλογενετικές γραμμές να εξελίσσονται με τον ίδιο ρυθμό. Πρόκειται για <<ολομετρική>> μέθοδο όπου οι ταξινομικές ομάδες ισαπέχουν από τη ρίζα του δέντρου και επιπλέον η απόσταση ανάμεσα σε δύο τάξα είναι ίση με το άθροισμα των μηκών των οριζόντιων κλάδων που ενώνουν αυτά τα τάξα.

Η μέθοδος Neighbor-Joining περιγράφηκε από τους Saitou και Nei (1987) και δεν προϋποθέτει οι διάφορες φυλογενετικές γραμμές να εξελίσσονται με τον ίδιο ρυθμό. Στηρίζεται στην κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με βάση τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των εξεταζόμενων δεδομένων.

Τα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν, αναπαριστούν τις αποστάσεις ανάμεσα στους διάφορους απλότυπους (εικ.6) και ανάμεσα στους πληθυσμούς (εικ.7). Στα φυλογενετικά δέντρα παρατηρούμε ότι, εκτός από τους λαγούς που μελετάμε, οι οποίοι προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, υπάρχουν και δύο δείγματα λαγού ανατολικού τύπου από την Τουρκία (*Anatolian, An*) που ανήκουν στο είδος *Lepus europaeus*, καθώς και ο ορεινός λαγός (mountain hare) (*Lepus timidus, Lt*), των οποίων οι απλότυποι διαφέρουν κατά πολύ από τους απλότυπους του είδους που μελετάμε (Stamatis, 2004 αδημοσίευτα άρθρα). Ο λαγός του είδους *Lepus timidus* με τον απλότυπο No. 30 χρησιμοποιήθηκε σαν εξωομάδα (outgroup) στα έριζα φυλογενετικά δέντρα. Σαν outgroup στα έριζα φυλογενετικά δέντρα χρησιμοποιείται το άτομο με τον περισσότερο ποικιλόμορφο απλότυπο (Halanych et al., 1999; Pierpaoli et al., 1999).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ενισχυμένα κομμάτια της D-loop - cyt_b, της COI και του 12S/16S rRNA έχουν ένα μέγεθος περίπου 1.8kb, 1.3kb και 2.05kb αντίστοιχα, που αντιστοιχεί σε 30% περίπου του μιτοχονδριακού γενώματος στα λαγόμορφα (Gissi et al., 1998).

Από τα 17 ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, 14 παρουσίασαν θέση αναγνώρισης για τη D-loop, 13 για τη COI και 15 για

τη 12S/16S rRNA. Από αυτά, όλα τα τετραμερή δημιούργησαν κατά μέσο όρο 125 θέσεις κοπής και επομένως από τα 5000 περίπου ζεύγη βάσεων του μιτοχονδριακού DNA αναλύθηκαν έμμεσα κατά μέσο όρο 498 ζεύγη βάσεων. Τα πενταμερή δημιούργησαν κατά μέσο όρο 32 θέσεις κοπής και συνεπώς αναλύθηκαν 162 ζεύγη βάσεων κατά μέσο όρο. Τέλος, τα εξαμερή δημιούργησαν 16 θέσεις κοπής κατά μέσο όρο και επομένως αναλύθηκαν περίπου 99 ζεύγη βάσεων. Συνολικά, αναλύθηκαν 759 ζεύγη βάσεων.

Η D-loop εμφανίζεται να είναι η πιο πολυμορφική με 14 περιοριστικά ένζυμα να εμφανίζουν θέση κοπής δημιουργώντας 22 απλότυπους, ενώ η περιοχή 12S/16S rRNA είναι η λιγότερο πολυμορφική, με μόλις 2 απλότυπους, καθώς όλα σχεδόν τα άτομα έχουν το ίδιο πρότυπο A. Η COI είναι πιο πολυμορφική από τη 12S/16S rRNA δημιουργώντας 8 απλότυπους (Πίνακας 2). Συνολικά βρέθηκαν 28 απλότυποι που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Μεγέθη σε ζεύγη βάσεων των περιοριστικών τμημάτων για όλα τα περιοριστικά ένζυμα που παρατηρήθηκαν στο mtDNA για την περιοχή: i) D-loop-cytb, ii) COI, iii) 12S/16S rRNA στους πληθυσμούς που μελετήσαμε.

D-loop-cytb

AluI	A _{Le}	B _{Le}	C _{Le}	G _{Le(An)}	S _{Lt}
740	-	-	-	-	
660					-
560					-
470				-	
430	-	-			
310	-	-	-	-	-
270			-		
220		-			
200	-		-	-	
160			-		-
120	-	-	-		
80				-	-
50					-
20	-			-	

AseI	A _{Lt, Le}	B _{An, Le}
1800	-	
1350		-
450		-

AvaII	A _{Le}	C _{Lt, An}
1750		-
1000	-	
750	-	

DdeI	A _{Le}	G _{Le}	D _{An}	I _{Lt}
1410			-	-
1060	-			
820		-		
360				-
350	-	-		
250	-	-	-	
240		-		
150				-
120	-	-	-	
90	-	-	-	
50	-	-	-	

HaeIII	A _{Le}	B _{Le}	D _{An}	G _{LA}
1140				-
950	-	-	-	
640				-
500	-			
370		-		
310			-	
250	-	-	-	
190			-	
130		-		
80	-	-	-	
60	-	-	-	-

HinfI	A _{Le}	B _{Le}	C _{Le}	F _{An}	S _{LA}
870				-	
730					-
660	-	-	-		
555		-			
370	-		-	-	-
250	-			-	-
240					-
200	-	-	-		
185			-		
180	-	-	-	-	
170	-	-	-		
160				-	
150					-
65		-	-		
50					-
40					-

MboI	A _{Le}	B _{Le}	C _{Le}	D _{Le}	I _{Le}	G _{An}	Q _{LA}
1110							-
910			-		-		
730	-	-	-	-	-		
690						-	
640		-					
590						-	
480							-
470	-	-		-		-	
440	-						
410							
200	-		-	-			-
120					-		-
90						-	
80					-		
70	-	-	-	-	-	-	
30				-			

MseI	A _{Le(An)}	B _{Le}	C _{Le}	G _{Le}	L _{Lt.}
700	-	-	-	-	-
620	-	-	-	-	-
550	-	-	-	-	-
490	-	-	-	-	-
455	-	-	-	-	-
190	-	-	-	-	-
130	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

MspI	A _{Le(An)}	D _{Lt.}
1800	-	-
1750	-	-
50	-	-

TaqI	A _{Le}	B _{Le(An)}	F _{Lt.}
1320	-	-	-
670	-	-	-
650	-	-	-
470	-	-	-
450	-	-	-
200	-	-	-

XbaI	A _{Lt. Le}	B _{An.}
1800	-	-
1570	-	-
230	-	-

Bstul	A _{Le(An)}	B _{Lt.}
1800	-	-
1050	-	-
750	-	-

AccI	A _{Le(An)}	B _{Lt.}
1850	-	-
1000	-	-
750	-	-
100	-	-

HhaI	A _{Le(An)}	B _{Lt}
1800		-
1100	-	
700	-	

COI

AluI	A _{Le(An)}	C _{Le}	D _{Le}	B _{Le}	H _{Lt}
440	-		-	-	
430		-			
230					-
220	-	-	-	-	-
200				-	
190					-
170	-	-			
160	-	-	-	-	-
125			-		
90					-
85					-
80	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-
45			-		-

HaeIII	A _{Le(An)}	B _{Le}	D _{Le}	G _{Lt}
960				-
870			-	
720	-			
600		-		
470	-		-	
300				-
120		-		
80	-	-		-
70	-	-		

HhaI	A _{Le(An)}	B _{Le}	C _{Lt}
1300			-
950	-	-	
350	-		
190		-	
160		-	

HinfI	A _{Le(An)}	B _{Le}	E _{Lt}
720	-		
600			
510			-
500	-	-	
470		-	
430			-
280			-
250		-	
120			
110	-	-	-
120			
110	-	-	-

Bstul	A _{Le(An),Lt}	B _{Le}
1300	-	
1140		-
160		-

MboI	A _{Le(An)}	C _{Lt}
1180	-	
570		-
430		-
110		-
80	-	-
70		-
40	-	-

AvaII	A _{Le(An)}	C _{Lt}
1310		-
660	-	
540	-	
110	-	

Acil	A _{Le(An)}	B _{Lt}
1150	-	
500		-
370		-
250		-
150	-	-
30		-

AseI	A _{Le(An),Lt}
820	-
480	-

DdeI	A _{Le(An)}	B _{Lt.}
640	-	-
560	-	-
320	-	-
190	-	-
80	-	-
70	-	-
50	-	-
40	-	-

MseI	A _{Le(An),Lt.}
500	-
400	-
280	-
120	-

MspI	A _{Le(An)}	B _{Lt.}
730	-	-
450	-	-
350	-	-
150	-	-
100	-	-

TaqI	A _{Le(An)}	B _{Lt.}
1300	-	-
655	-	-
645	-	-

(12-16)S rRNA

AccI	A _{Le(An),Lt}
940	-
340	-
240	-
130	-
120	-
110	-
80	-
70	-

Alu I	A_{Le(An), Lt}
550	-
340	-
330	-
280	-
270	-
170	-
90	-

AseI	A_{Le(An)}	B_{Lt}
1290	-	-
680	-	-
610	-	-
500	-	-
310	-	-

BstI	A_{Le(An), Lt}
1500	-
500	-

DdeI	A_{Le(An)}	B_{Lt}
1300	-	-
1190	-	-
450	-	-
170	-	-
110	-	-
100	-	-

EcoRI	A_{Le(An), Lt}
1280	-
770	-

HaeIII	A_{Le(An), Lt}
720	-
500	-
420	-
410	-

HhaI	A_{Le(An), Lt}
1150	-
750	-
140	-

HincII	A_{Le(An), Lt}
1350	-
680	-

Hinf I	A _{Le(An)}	B _{Lt}
1930	-	
1820		-
230		-
120	-	

Hpa I	A _{Le(An), Lt}
1330	-
720	-

Mbo I	A _{Le(An), Lt}
1350	-
580	-
90	-

Taq I	A _{Le(An)}	B _{Lt}
1800	-	
950		-
850		-
170	-	-
90	-	-

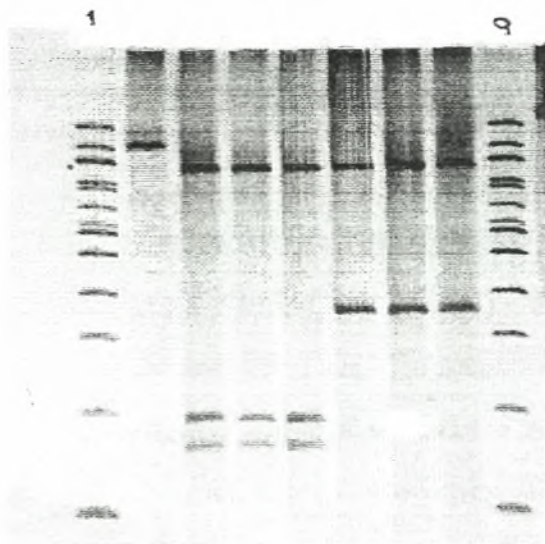
Xba I	A _{Le, Lt}
1900	-
130	-

MseI	A _{Le}	B _{Le(An)}	C _{Lt}
300			-
250		-	
190			-
170	-	-	-
165	-		
150	-	-	
140	-	-	-
120	-	-	-
110	-	-	
105	-	-	-
97	-	-	-
95	-	-	-
85	-		-
83	-	-	
81			-
80	-	-	
78			-
75	-	-	-
70	-	-	-
65	-	-	
60	-	-	-
57			-
55	-	-	
52			-
50	-	-	
45	-	-	-
40	-	-	-
35	-	-	-
30	-	-	-
25	-	-	-
20	-	-	-
15	-	-	-
10	-	-	-
5	-	-	-

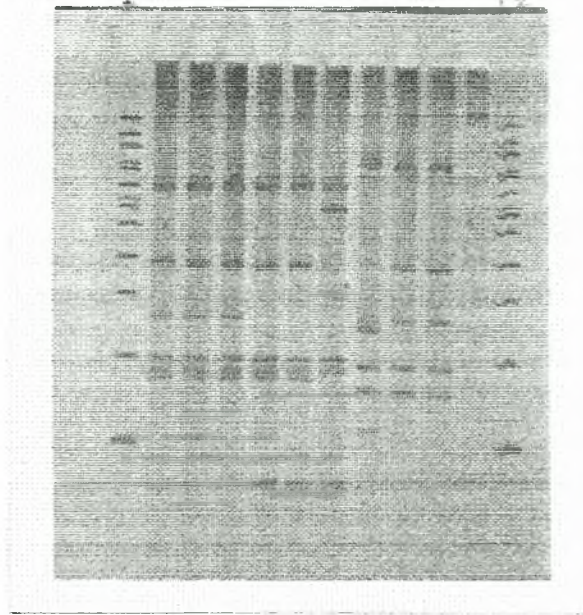
Ποικιλομορφία μεταξύ απλοτύπων

Πολλοί από τους απλότυπους που βρήκαμε ήταν μοναδικοί (15 από 28), που σημαίνει ότι παρατηρήθηκαν σε ένα μόνο πληθυσμό. Όπως αναφέρθηκε οι θέσεις όπου έκοψε το κάθε ένζυμο περιορισμού τις τρεις περιοχές που μελετήσαμε περιγράφονται με ένα συγκεκριμένο γράμμα. Αν εξετάσουμε τους απλότυπους θα παρατηρήσουμε ότι τέσσερις

(No.17, No.24, No. 25, No. 28) έδειξαν το ίδιο πρότυπο σε όλα τα άτομα για τρία ένζυμα [B ή C (HinfI)], C (MboI) και B (MseI) στη D-loop και το πρότυπο B (HhaI) στη COI. Τα πρότυπα των θέσεων κοπής του ενζύμου HhaI στην περιοχή COI φαίνονται στην εικόνα 4. Στα άτομα 3, 4 και 5 παρατηρούμε τρεις ζώνες (πρότυπο B), ενώ αντίθετα στα άτομα 6, 7 και 8 παρατηρούμε δύο ζώνες (πρότυπο A). Στην εικόνα 5 παριστάνονται τα πρότυπα των θέσεων κοπής του ενζύμου HinfI στην περιοχή D-loop- cyt**b**. Παρατηρούμε τα άτομα 2, 3 και 4 εμφανίζουν το πρότυπο A, τα άτομα 6, 7 το πρότυπο C και το άτομο 8 το πρότυπο B (τα μεγέθη των τμημάτων που προκύπτουν από τις θέσεις κοπής παρουσιάζονται στον πίνακα 2).



Εικόνα 4. Εμφάνιση διαφορών μεταξύ των προτύπων που προκύπτουν από τις θέσεις κοπής του ενζύμου HhaI στην περιοχή COI.



Εικόνα 5. Εμφάνιση διαφορών μεταξύ των προτύπων που προκύπτουν από τις θέσεις κοπής του ενζύμου HinFI στην περιοχή D-loop-cytb

Υπήρχαν, επίσης, κάποια άτομα που είχαν το παραπάνω πρότυπο, αλλά εμφάνισαν το πρότυπο I στο ένζυμο (MboI) στη D-loop. Τα άτομα αυτά ανήκουν στον απλότυπο No. 18. Σύμφωνα με τη μελέτη των Mamuris et. al 2001 άτομα που εμφάνιζαν απλότυπους σαν αυτούς που αναφέρθηκαν ήταν εκτρεφόμενα άτομα από δύο διαφορετικές φάρμες που οι ιστοί τους συλλέχθηκαν πριν απελευθερωθούν. Στο άρθρο τους αναφέρεται ότι τα τελευταία 10 χρόνια, σύμφωνα με τους κυνηγητικούς συλλόγους, λαγοί του είδους *Lepus europaeus* εισήχθηκαν από την Ιταλία, Βουλγαρία και Γιουγκοσλαβία, ήταν εκτρεφόμενοι σε ελληνικές φάρμες και απελευθερώθηκαν σε περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας. Μπορούμε, λοιπόν να υποθέσουμε ότι τα άτομα αυτά είναι ευρωπαϊκού τύπου.

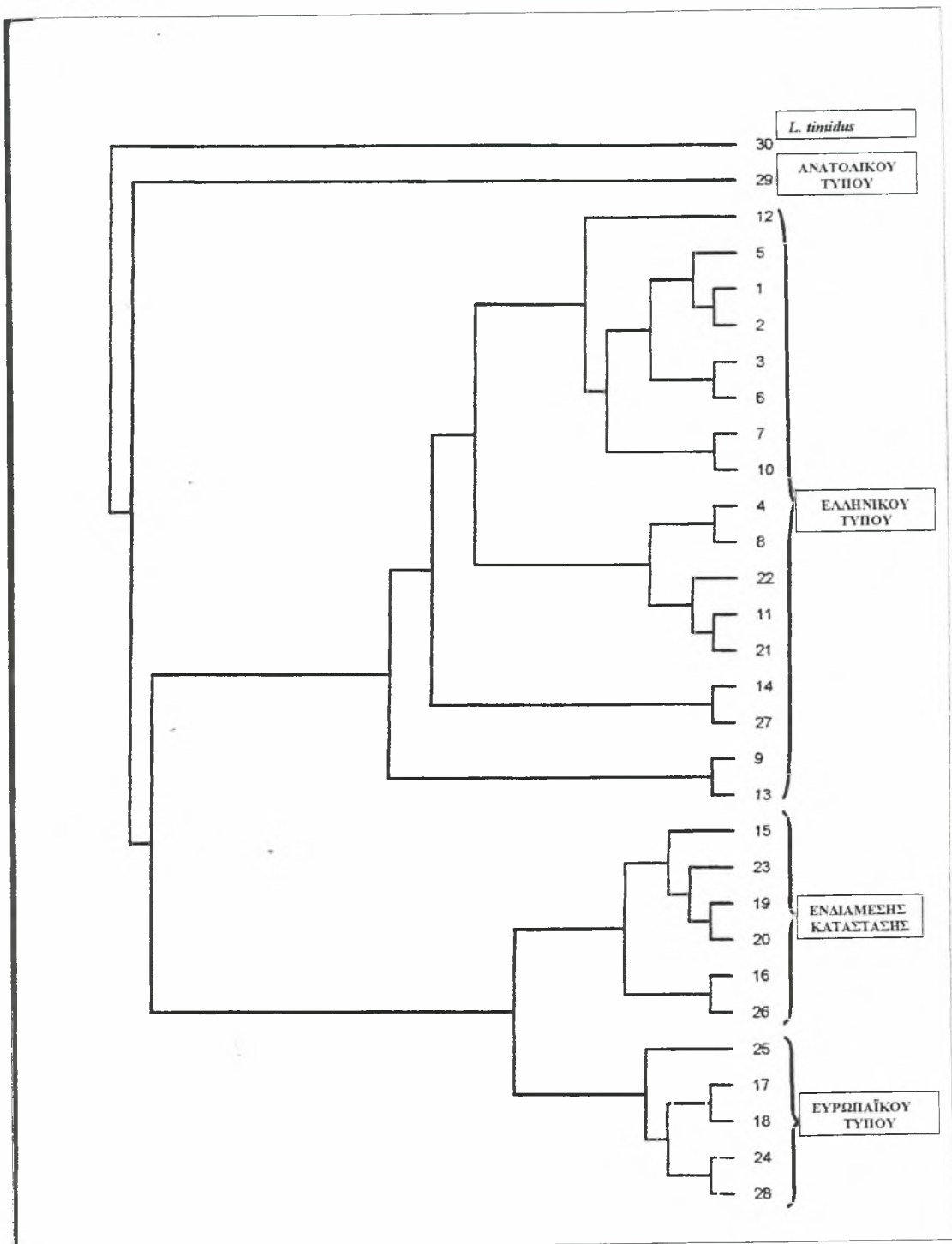
Τα συγκεκριμένα πρότυπα παρατηρήθηκαν, επίσης, σε 10 ακόμη άγρια άτομα, αλλά όχι το πρότυπο Β του ενζύμου (HhaI) στη COI. Όπως φαίνεται από το φυλογενετικό διάγραμμα (εικ. 6) οι απλότυποι αυτοί αντιστοιχούν στα Νο. 15, Νο. 16, Νο. 19, Νο. 20, Νο. 23 και Νο. 26.

Ακόμη στο ίδιο φυλογενετικό διάγραμμα βλέπουμε ότι οι λαγοί με το παραπάνω πρότυπο διαχωρίστηκαν από τους άγριους λαγούς και ομαδοποιήθηκαν σε μια νέα ομάδα μαζί με τους ευρωπαϊκού τύπου λαγούς.

Ο αριθμός των παρατηρούμενων απλοτύπων ποικίλλει από δύο (Πελοπόννησος) μέχρι 11 (Μακεδονία). Από τα Επτάνησα είχαμε ένα μόνο δείγμα κι επομένως παρατηρήθηκε ένας απλότυπος. Η αναλογία των διαφορετικών απλοτύπων στους άγριους λαγούς ποικίλλει από 1 (Μακεδονία, Στ. Ελλάδα, Επτάνησα) μέχρι 5 (Πελοπόννησος). Πρέπει, ωστόσο, να λάβουμε υπόψη ότι τα δείγματα από τη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο και γενικά ο συνολικός αριθμός δειγμάτων ήταν σχετικά μικρός και δε μας επιτρέπει να γενικεύσουμε τα αποτελέσματα.

Τα ποσοστά των μοναδικών απλοτύπων, επίσης ποικίλλουν μεταξύ των περιοχών από 46,7% (Μακεδονία) μέχρι 100% (Στ. Ελλάδα). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα από τον πίνακα 4 παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ποικιλομορφίας απλοτύπων εμφανίζεται στη Στερεά Ελλάδα, που περιέχει όμως δύο άτομα με δύο διαφορετικούς απλοτύπους.

Οι πιο κοινοί απλότυποι, αυτοί δηλαδή που εμφανίστηκαν με τη μεγαλύτερη συχνότητα στους περισσότερους πληθυσμούς, ήταν οι Νο. 14 με 9 άτομα από την Πελοπόννησο, οι Νο.6, Νο. 7 και Νο. 18 με 4 άτομα από Ήπειρο, Μακεδονία και Θεσσαλία, αντίστοιχα.



Εικόνα 6. Το φυλογενετικό διάγραμμα παριστάνει ομαδοποιημένους τους 28 απλότυπους που περιγράφηκαν στον πίνακα 2. Ο απλότυπος 30 αποτελεί το outgroup.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Αριθμός συνολικών απλοτύπων και μοναδικών απλοτύπων που βρέθηκαν μέσα σε κάθε πληθυσμό, ποσοστά αριθμού μοναδικών απλοτύπων/συνολικό αριθμό ατόμων(S) και αριθμού μοναδικών απλοτύπων/συνολικό αριθμό απλοτύπων(R), αναλογία αριθμού ατόμων/συνολικό αριθμό απλοτύπων (T) και ποσοστά ποικιλομορφίας απλοτύπων και νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας.

Πληθυσμός	Μέγεθος δείγ.	Συνολ. Απλότ.	Μοναδ. Απλότ.	S	R	T	% Haplot. diversity	%Nucleot. diversity
ΜΑΚ.	15	11	7	46.70	63.63	1.36	94.17	0.85
ΘΕΣ.	14	7	1	7.10	14.28	2.00	89.01	1.25
ΣΤ. ΕΛΛΑΔΑ	2	2	2	100.00	100.00	1.00	100.00	1.57
ΠΕΛ.	10	2	1	10.00	50.00	5.00	20.00	0.21
ΗΠ.	16	9	4	25.00	44.44	1.78	90.83	0.65
ΕΠΤΑΝ.	1	1	0	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00

Ποικιλομορφία μεταξύ πληθυσμών

Ο πίνακας 5 που απεικονίζει τις αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών με βάση τη μέση νουκλεοτιδική διαφοροποίηση (nucleotide divergence) χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου που συσχετίζει τους οκτώ πληθυσμούς που μελετήθηκαν (εικ.7). Στο διάγραμμα αυτό παρατηρούμε ότι οι πληθυσμοί της Θεσσαλίας και της Στερεάς Ελλάδας τοποθετούνται στην ίδια ομάδα, καθώς και από τον πίνακα 5 φαίνεται ότι και η απόσταση μεταξύ τους είναι πολύ μικρή. Μεταξύ Στερεάς Ελλάδας και Θεσσαλίας δεν υπάρχουν φυσικά εμπόδια, όπως για παράδειγμα μεταξύ Ηπείρου και Θεσσαλίας υπάρχει η οροσειρά της Πίνδου. Δεν έχουν, επομένως, παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στα πρότυπα των θέσεων κοπής των περιοριστικών ενζύμων ώστε να

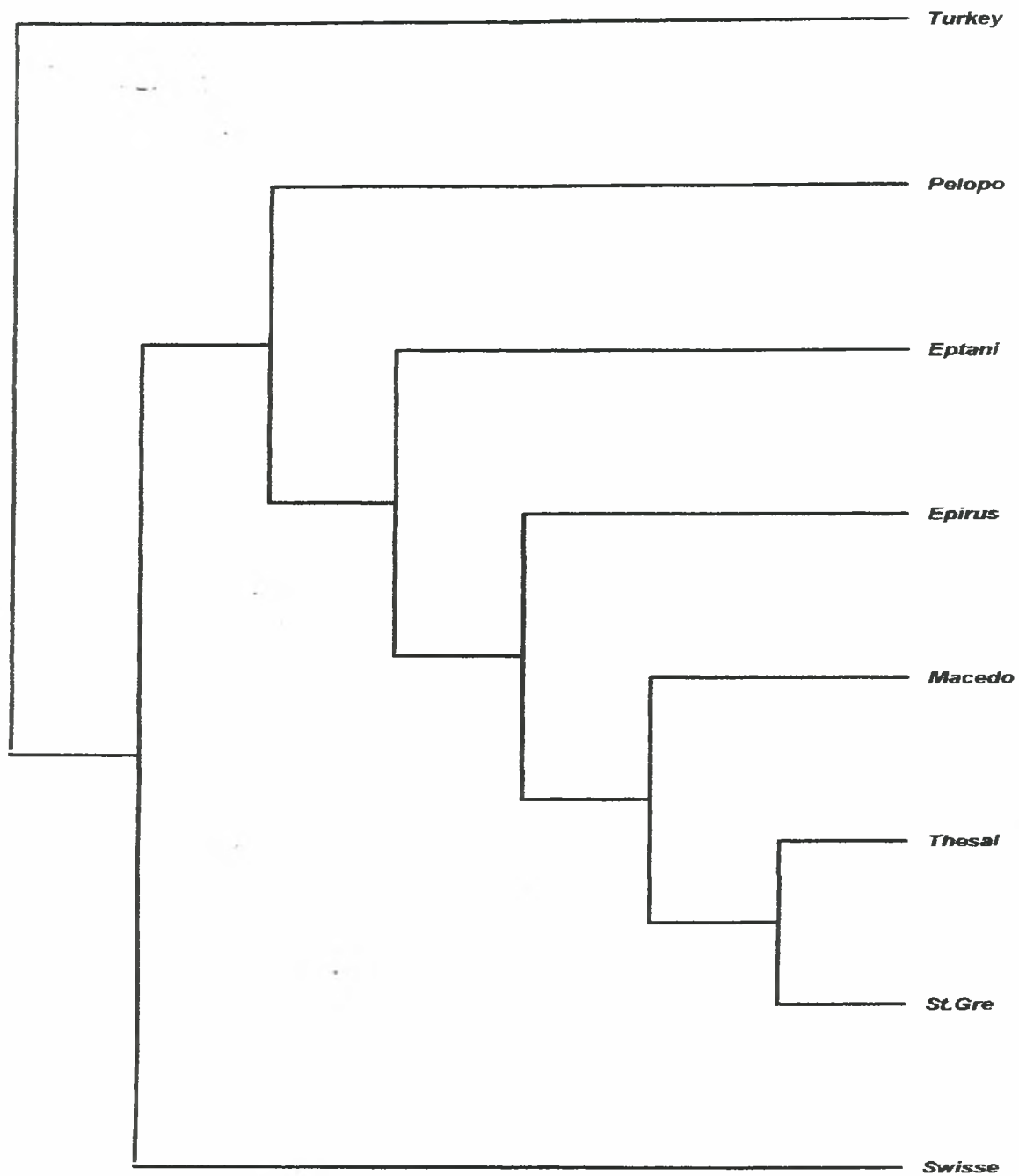
δημιουργούν σημαντικές διαφορές στους απλότυπους των ατόμων από τις περιοχές αυτές, γιατί υφίσταται γονιδιακή ροή των ατόμων μεταξύ των περιοχών αυτών. Στις περιοχές αυτές ενώνεται κατόπιν η Μακεδονία, ακολουθεί η Ήπειρος, τα Επτάνησα και η Πελοπόννησος. Φαίνεται, επίσης, από το φυλογενετικό διάγραμμα ότι η γενετική ποικιλομορφία δε σχετίζεται με τις γεωγραφικές αποστάσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Νουκλεοτιδική ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών που μελετάμε.

Πληθυσμοί	Μακ ¹	Θεσ ²	Στ. Ελλ ³	Πελ ⁴	Επτ ⁵	Ήπειρ ⁶	Τουρ ⁷	Ελβετ ⁸
Μακ.	-							
Θεσ.	0.00095	-						
Στ. Ελλ.	0.00001	0.00004	-					
Πελ.	0.00735	0.00789	0.00102	-				
Επτ.	0.00322	0.00412	0.00257	0.00861	-			
Ήπειρ.	0.00138	0.00250	0.00037	0.00464	0.00549	-		
Τουρ.	0.02675	0.02696	0.02181	0.02076	0.02845	0.02329	-	
Ελβετ.	0.13233	0.13299	0.13383	0.13734	0.13934	0.13308	0.13094	-

¹Μακεδονία, ²Θεσσαλία, ³Στερεά Ελλάδα, ⁴Πελοπόννησος, ⁵Επτάνησα, ⁶Ήπειρος,

⁷Τουρκία, ⁸Ελβετία.



Εικόνα 7. UPGMA έριζο φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τους οκτώ πληθυσμούς ομαδοποιημένους σύμφωνα με τις αποστάσεις που προκύπτουν από την εκτίμηση του μέσου όρου του αριθμού των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση μεταξύ των πληθυσμών (nucleotide divergence), που παριστάνεται στον πίνακα 5.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε μια μοριακή μέθοδος βασισμένη στο μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιώντας πολυμορφισμούς μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLPs) προκειμένου να προσδιοριστούν μοριακοί δείκτες που θα μας βοηθήσουν στην αναγνώριση και ταυτοποίηση φυσικών πληθυσμών λαγού, καθώς και στην κατανόηση της φυλογενετικής κατάστασης των λαγών του είδους *Lepus Europaeus* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Ακόμη, με τη βοήθεια της παραπάνω μεθόδου εκτιμήθηκε το επίπεδο της γενετικής ποικιλομορφίας ενδοπληθυσμιακά και διαπληθυσμιακά.

Γενετική ποικιλομορφία του είδους

Σε φυσικούς πληθυσμούς μια παράμετρος της γενετικής ευρωστίας ενός είδους αποτελεί ο βαθμός της ενδοπληθυσμιακής γενετικής διαφοροποίησης. Όσο περισσότερους γενότυπους περιλαμβάνει ένας συγκεκριμένος πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερες πιθανότητες έχει να ανταποκριθεί σε απότομες περιβαλλοντικές αλλαγές και να αποφύγει την εξαφάνισή του. Συνεπώς, η έλλειψη γενετικής ποικιλομορφίας αποτελεί μια σημαντική απειλή για την επιβίωση του κάθε είδους (Lesica and Allendorf, 1995).

Στη συγκεκριμένη μελέτη από τα 58 δείγματα που είχαμε βρέθηκαν 28 απλότυποι. Εμφανίστηκε, δηλαδή, ένας απλότυπος ανά δύο άτομα περίπου και ακόμη επειδή το ποσοστό της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας είναι κατά μέσο όρο περίπου 0,006, οι πληθυσμοί των

λαγών που μελετάμε εμφανίζονται υψηλά πολυμορφικοί. Θεωρητικά, η υψηλή ποικιλομορφία του mtDNA που παρατηρείται στην παρούσα μελέτη στους πληθυσμούς των ελληνικών λαγών θα μπορούσε να διατηρηθεί εάν οι πληθυσμοί είναι αρκετά μεγάλοι και σταθεροί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Όπως παρατηρούμε από τον πίνακα 4, ο μέσος όρος της ποικιλομορφίας των απλοτύπων είναι περίπου 0,657, μια τιμή αρκετά υψηλή, καθώς οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει σε φυσικούς πληθυσμούς θηλαστικών αποκαλύπτουν ένα χαμηλότερο επίπεδο ποικιλομορφίας απλοτύπων από αυτό που παρατηρήσαμε. Σαν παράδειγμα αναφέρονται οι τάξεις Rodentia (Plante et al. 1989, Riddle et al. 1993, Fedorov et al. 1999), Carnivora (Lehman and Wayne 1991, Cronin et al., 1996) και η τάξη Artiodactyla (Ramey II 1995).

Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με τη μελέτη της γενετικής δομής πληθυσμών λαγού του είδους που μελετάμε των Mamuris et al. 2001, όπου εμφανίστηκε ένας απλότυπος ανά δύο άτομα και το ποσοστό της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ήταν 0,015.

Είναι, επίσης, σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες στους Ιβηρικούς (Perez-Suarez et al., 1994), τους Σκανδιναβικούς (Thulin et al., 1997) και τους Ιταλικούς (Pierpaoli et al., 1999) λαγούς του είδους, αλλά έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Hartl et al. (1993), στην οποία σε 131 λαγούς από 18 διαφορετικές περιοχές της Αυστρίας αποκαλύφθηκαν μόνο 6 απλότυποι.

Παρατηρήσαμε ακόμη σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των απλοτύπων ανάμεσα σε όλους τους πληθυσμούς. Ωστόσο, το ποσοστό των μοναδικών απλοτύπων μέσα σε κάθε περιοχή ήταν υψηλό, όπως φαίνεται στον πίνακα 4, δείχνοντας ότι οι πληθυσμοί είναι απομονωμένοι. Η απομόνωση αυτή πιθανώς οφείλεται σε κοινωνικο-οικολογική συμπεριφορά των λαγών παρά σε φυσικά εμπόδια που θα

μπορούσαν να εμποδίσουν τη διασπορά τους, μιας και δεν υπάρχουν τέτοια εμπόδια στις περιοχές που μελετάμε.

Παρατηρήθηκαν, επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, απλότυποι με χαρακτηριστικό το πρότυπο B ή C στο ένζυμο HinFI, το πρότυπο C στο ένζυμο MboI και το πρότυπο B στο MseI στην Control region και το πρότυπο B στο HhaI στην περιοχή COI.

Τα άτομα που εμφανίζουν απλότυπους με τα συγκεκριμένα πρότυπα δεν ανήκουν σε φυσικούς ελληνικούς πληθυσμούς, αλλά σε πληθυσμούς που έχουν προέλθει από άλλες ευρωπαϊκές χώρες μέσω προγραμμάτων εμπλουτισμού σύμφωνα με τη μελέτη των Mamuris et al. 2001.

Παρατηρήσαμε, επίσης, άτομα με απλότυπους με τα παραπάνω χαρακτηριστικά πρότυπα χωρίς όμως να εμφανίζουν το πρότυπο B στο ένζυμο HhaI στην περιοχή COI.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν ότι οι απλότυποι με τα παραπάνω χαρακτηριστικά πρότυπα μπορεί να αποτελέσουν μοριακό δείκτη για την ταυτοποίηση φυσικών πληθυσμών του είδους *Lepus europaeus*.

Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό οι απλότυποι No. 2, No. 6, No. 7, No. 9, No. 10, No. 14, να αντιπροσωπεύουν ενδογενείς φυλετικές ομάδες, καθώς εμφανίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα στα άτομα που μελετάμε.

Η ανίχνευση μοναδικών απλοτύπων σε κάποιες περιοχές, όπως Ιωάννινα, Αγρίνιο, Κιλκίς, είναι ενδεικτική της προσαρμογής του πληθυσμού σε κάθε βióτοπο και της έλλειψης μετανάστευσης σε μακρινές αποστάσεις.

Ακόμη, στην Ελλάδα, η κατανομή των πληθυσμών που μελετήσαμε δεν ακολουθεί καμία γεωγραφική τάση, επειδή η γενετική ποικιλομορφία φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τις γεωγραφικές αποστάσεις.

Τα θηλυκά σχεδόν αποκλειστικά κληρονομούν το mtDNA (Awise, 1994). Ωστόσο, το γεγονός ότι τα αρσενικά διασπείρονται, ενώ τα θηλυκά παραμένουν στον τόπο γέννησής τους (Reitz and Leonard, 1994; Hulbert et al., 1996) μπορεί να καταλήξει σε μείωση της γονιδιακής ροής. Επομένως, εξαιτίας της φύλο ειδικευόμενης διασποράς, είναι πιθανό η ενδοπληθυσμιακή ποικιλομορφία να υπερεκτιμάται από τους μιτοχονδριακούς δείκτες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Αν και το είδος *Lepus Euroraeus* δε συγκαταλέγεται στα είδη που απειλούνται με εξαφάνιση, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι οι γονιδιακές δεξαμενές βρίσκονται σε κίνδυνο, καθώς υπάρχει ανιχνεύσιμη αλλαγή στη γενετική δομή των πληθυσμών λαγού του παραπάνω είδους στην Ελλάδα. Η αλλαγή εξηγείται από την ύπαρξη απλοτύπων στους πληθυσμούς που μελετάμε με πρότυπα διαφορετικά από αυτά που συνήθως παρατηρούνται στους ελληνικούς λαγούς του είδους *Lepus euroraeus*. Τα συγκεκριμένα πρότυπα, τα οποία παρουσιάστηκαν στα αποτελέσματα, βρέθηκαν στα εκτρεφόμενα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της γενετικής δομής πληθυσμών λαγού της Κεντρικής Ελλάδας από τους Mamuris et al. 2001. Συνεπώς, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα άτομα που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα πρότυπα στη δική μας μελέτη ίσως έχουν προκύψει από προγράμματα εμπλουτισμού.

Τα προγράμματα αυτά συμβάλλουν στην αύξηση της γενετικής ποικιλομορφίας των πληθυσμών σύμφωνα με τους Thulin και Tegelstrom (2001), οι οποίοι μελέτησαν την ποικιλομορφία ανάμεσα σε εισαγόμενους Σουηδικούς λαγούς *Lepus europaeus* και διαπίστωσαν ότι οι εισαγωγές ατόμων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές είναι πιθανό να προκαλέσουν ανάμειξη των γονιδιακών δεξαμενών που καταλήγει σε ένα υψηλό επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας.

Ωστόσο, πρέπει να πραγματοποιούνται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες προκειμένου να μην αλλοιωθεί η γενετική δομή του είδους. Οι μη ελεγχόμενες προσαρμογές και απελευθερώσεις λαγών σε περιόδους όπου οι φυσικοί πληθυσμοί περνούν από φάσεις μείωσης των πληθυσμιακών μεγεθών (στενωπό) θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τη γενετική δομή μειώνοντας τη γενετική ποικιλομορφία. τις τελευταίες δεκαετίες προγράμματα εμπλουτισμού με την εισαγωγή αλλόχθονων ατόμων πρέπει να έχουν επηρεάσει την ιστορική κατανομή και γενετική ολοκλήρωση του ενδογενούς είδους (Flux, 1983; Thulin et al., 1997; Fickel et al., 1999). Μία τέτοια περίπτωση παρατηρήθηκε στη Γαλλία όταν οι ενδογενείς λαγοί αντικαταστάθηκαν πλήρως από λαγούς της ανατολικής Ευρώπης (Flux, 1983).

Επίσης, τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί η θνησιμότητά τους εξαιτίας ενός συνδρόμου που προσβάλλει το συγκεκριμένο είδος. Το σύνδρομο αυτό περιλαμβάνει ασθένειες του εντέρου, των νεφρών και αιμορραγία των εσωτερικών οργάνων και αποκαλείται "Σύνδρομο Ευρωπαϊκού Καφέ Λαγού" (Poli et al., 1991).

Συμπερασματικά, για να καθοριστούν οι γενότυποι και το τωρινό επίπεδο πολυμορφισμού είναι απαραίτητο να διεξαχθεί μια πλήρης μελέτη των πληθυσμών του είδους *Lepus europaeus* σε ολόκληρη την Ελλάδα και ιδιαίτερα στις περιοχές όπου δεν έχουν σημειωθεί απελευθερώσεις. Πρέπει ακόμη να υπάρχει αντιπροσωπευτικός αριθμός

δειγμάτων προκειμένου να είναι ακριβή τα αποτελέσματα. Για την αποφυγή περαιτέρω μείωσης του μεγέθους πληθυσμού είναι απαραίτητο να περιοριστεί το κυνήγι στις επιτρεπόμενες χρονικές περιόδους.

Επιπλέον, η μελέτη του επιπέδου της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ ελληνικών και ευρωπαϊκών λαών μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο στον καθορισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ των απελευθερωμένων και των ενδογενών ατόμων.

Τέλος, δεδομένου ότι το μιτοχονδριακό DNA περιγράφει ένα περιορισμένο ποσοστό γενετικής ποικιλομορφίας συγκρινόμενο με το πυρηνικό γονιδίωμα, είναι απαραίτητο να αρχίσει η χρήση διαφορετικών μοριακών μεθόδων, όπως οι μικροδορυφορικοί δείκτες και οι VNTRs.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Angermann, R., Flux, J., Chapman, J. and Smith, A. (1990). Lagomorph classification. In Chapman, J., and Flux, J.(eds.), Rabbits, Hares and Pikas, Status Survey and Conservation Action Plan, UICN, Switzerland, p.7.

Alves, P. C., Branco, M., Matias, O. and Ferrand, N. (2000). New Genetic Variation in European Hares, *Lepus granatensis* and *L. europaeus*. Biochemical genetics , Vol. 38, Nos. 3/4,2000.

Alves, P. C., Ferrand, N., Suchentrunk, F. and Harris, D. J. (2002). Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. Molecular Phylogenetics and Evolution 27: 70-80.

Avise, J. C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 312:325.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. and Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 489-522.

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

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

Biju-Duval, C., Enafaa, H., Denedouy, N., Monnerot, M., Mignotte, F., Soriguer, R.C., El Gaaïed, A., El Hili, A. and Mounolou, J.-C. (1991). Mitochondrial DNA evolution in Lagomorphs: origin of systematic heteroplasmy and organisation of diversity in European rabbits. J. Mol. Evol.33:92.

Birky, C. W. J., Maruyama, T. and Fuerst, P. (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. Genetics. 103: 513-527.

Black, W. C., Du Teau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R. and Pettorini, J. M. (1992). Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera:Aphididae). Bulletin of Entomological Research. 82:151-159.

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

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

Brown, G. G. and Simpson, M. V. (1982). Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 3246-3250.

Brown, W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. In. Molecular Evolutionary Genetics, R.J. Macintyre (eds), Plenum Press, New York, 95-130.

Burger, G., Gray M. W., Lang Franz B. (2003). Mitochondrial genomes : anything goes. Trends in Genetics Vol. 19, No. 12.

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

Caughley, G., Gunn, A. (1996). Conservation Biology in Theory and Practice. Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts.

Chaworth-Musters, J. L. (1932). A contribution to our knowledge of the mammals of Macedonia and Thessaly. Ann. Mag. Nat. Hist. Ser. 10(9):169.

Cognato, A. I., Rogers, S. O. and Teale, S. A. (1995). Species diagnosis and phylogeny of the *Ips grandicollis* group (Coleoptera: Scotylidae) using random amplified polymorphic DNA. Ann. Entomol. Soc. Am. 88:397.

Corbet, G. B. (1986). Relationships and origins of the European lagomorphs. Mammal Rev. 16, 105-110.

Cronin, M. A., Bodkin, J., Ballachey, B., Estes, J. and Patton, J. C. (1996). Mitochondrial- DNA variation among subspecies and populations of sea otters (*Enhydra lutra*). Journal of Mammalogy 77:546-557.

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

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

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

Ellermann, J. R., Morrison-Scott, T. C. (1951). Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758-1946. Brit. Mus.(Nat. Hist.), London.

Ennafaa, H., Monnerot, M., El Gaaied, A. and Mounolou J. C. (1987). Rabbit mitochondrial DNA: preliminary comparison between some domestic and wild animals. Genetics Selection Evolution 19:279-288.

Fedorov, V. B., Fredga, K. and Jarrel, G. H. (1999). Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of chromosome races of collared lemmings (*Dicrostonyx*) in the Eurasian arctic. Journal of Evolutionary Biology 12: 134-145.

Felsenstein, J., PHYLIP (Phylogeny inference package), version 3.5c. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993.

Fickel, J., Lieckfeld, D. and Pitra, C. (1999). Analyse der genetischen Diversität und Struktur in benachbarten Populationen des Feldhasen (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). Z. Jagdwiss. 45:230.

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

Flux, J. E., Angermann, R. (1990). The hares and jackrabbits. In: Chapman, J.A., Flux, J.E.C.(Eds.), Rabbits, Hares and Pikas. Status Survey and Conservation Action plan. IUCN, Switzerland, pp. 61-94.

Fraguglione, D. (1966). L'hybridation du lièvre commun et du lièvre variable, *Lepus europaeus* x *L. timidus varronis* (Pallas, 1878). Saugetierkunde. Mitt. 14, 92-100.

Frankel, O. H. and Soule, M. E. (1981). Conservation and Evolution, Cambridge University Press, Cambridge.

Gissi, C., Gullberg, A., Arnason, U. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. Genomics 50, 161-169.

Gyllensten, U. B., Wilson, A. C. (1987). Interspecific mitochondrial DNA transfers and the colonization of Scandinavia by mice. Genet. Res.Camb. 49, 25-29.

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

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

Hartl, G. B., Markowski, J., Swiatecki, A., Janiszewski, T. and Willing, R. (1992). Genetic diversity in the Polish brown hare *Lepus europaeus* Pallas, 1778: Implications for conservation and management. Acta Theriol. 37: 15-25.

Hartl, G. B., Suchentrunk, F., Nadlinger, K. and Willing, R. (1993). An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. Acta Theriologica 38, Suppl. 2:33-57.

Hartl, G. B. and Ferrand, N. (1993). Genetic polymorphism of transferrin (TF) and the haemoglobin alpha chain (HBA) in the brown hare (*Lepus europaeus*). Anim. Genet. 24: 439.

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

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

Hulbert, I. A. R., Iason, G. R., Elston, D. A., Racey, P. A. (1996). Home-range sizes in a stratified upland landscape of two lagomorphs with different feeding strategies. *Journal of Applied Ecology* 33, 1479-1488.

Johns, G. C., Avise, J. C. (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial Cytochrome b gene. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1481-1490.

Kattinger, E. (1972). Beiträge zur Säugetierkunde der südlichen Balkaninsel und des Vorderen Orients (Syrien und Unterägypten). *Ber. d. Naturf. Ges. Bamberg* 46:11-32.

Kocher, T., Thomas, W., Meyer, A., Edwards, S., Paabo, S., Villablanca, F. and Wilson, A. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS, USA.* 86: 6196-6200.

Lafranco, L., Wyss, P., Marzachi, C. and Bontante, P. (1995). Generation of RAPD- PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhiza fungus. *Molec.Ecol.* 4: 61-68.

Lang, G. (1994). Quartäre Vegetations Geschichte Europas. Methoden und Ergebnisse. G. Fisher, Jena, 62pp.

Lehman, N. and Wayne, R. K. (1991). Analysis of coyote mitochondrial DNA genotype frequencies: estimation of the effective number of alleles. *Genetics* 128: 405-416.

Lesica, P., Allendorf, F. W. (1995). When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* 9, 753-760.

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

Lynch, M. and Milligan, B. G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology.* 3:91-99.

McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E., Kornfield, J. REAP: the restriction enzyme analysis package, Version, 4.0. Department of Zoology, Orono, ME: University of Maine, 1991.

Mailer, R. J., Scarth, R. and Fristensky, B. (1994). Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus L.*) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 697-704.

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

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

Mamuris, Z., Sfougaris, 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.

Markert, C. L. and Whitt, G. S. (1968). Molecular varieties of isozymes. Experientia. 24: 977-991.

Markert, C. L., Shaklee, J. B. and Whitt, G. S. (1975). Evolution of a gene. Science. 189: 102-114.

Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fish. In. Biochemistry and Molecular Biology of Fish, Vol. 2, Hochachka, P.W. & T.P. Mommsen (eds.) Elsevier Press, 1-38.

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

Moritz, C., Dowling, T. E. and Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics. 18: 269-292.

Mullis, K.B and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalysed chain reaction. Methods in Enzymology. 155: 335-350.

Nei, M., Maruyama T. and Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution 29: 1-10.

Ondrias, J. C. (1965). Die Saugetiere Griechenlands. Saugetierk. Mitt. 13:109-127.

Palacios, F. (1976). Descripcion de una nueva especie de liebre (*Lepus castroviejoi*) endemica de la cordillera Cantabrica. Don. Acta Vert.3, 205-223.

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

Palumbi, S. R., Martin , A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L. and Grabowski, G. (1991). The simplest fool's guide to PCR . Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu , Hawaii, 23 pp.

Perez-Suarez, G., Palacios, F., and Boursot, P. (1994). Speciation and Paraphyly in Western Mediterranean Hares (*Lepus castroviejoi*, *L. europaeus*, *L. granatensis*, and

L. capensis) Revealed by Mitochondrial DNA Phylogeny. Biochemical genetics, Vol.32, Nos. 11/12.

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

Petter, F. (1959). Elements d'une revision des Lievres africains du sousgenre *Lepus*. Mammalia 23,41.

Pierpaoli, M., Riga, F., Trocchi, V. and 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.

Plante, Y., Boag, P.T. and White, B.N. (1989). Macrogeographic variation in mitochondrial DNA of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). Canadian Journal of Zoology 67: 158-167.

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

Ramey II R.R. (1995). Mitochondrial- DNA variation, population structure , and evolution of mountain sheep in the south-western United States and Mexico. Molecular Ecology 4:429-439.

Reitz, F., Leonard, Y. (1994). Characteristics of European hare *Lepus europaeus* use of space in a French agricultural region of intensive farming. Acta Theriologica 39, 143-157.

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

Riga, F., Trocchi, V., Randi, E., Toso, S. (2001). Morphometric differentiation between the Italian hare (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898) and the European Brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778. J. Zool. Lond. 253, 241-252.

Saccone, C., Gissi, C., Lavane, C., Larizza, A., Pesole, G., Reyes, A. (2000). Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. Gene 261, 153-159.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erich, H. A. (1988). Primer detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase . Science. 239: 487-491.

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

Shaklee, J. B., Allendorf, F. W., Morizot, D. C and Whitt, G. S. (1990). Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. Trans.Am.Fish. Soc. 119:2-15.

Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman, San Francisco.

Suchentrunk, F., Mamuris, Z., Sfougaris, A. I., and Stamatis, C. (2002). Biochemical Genetic Variability in Brown Hares (*Lepus europaeus*) From Greece. Biochemical Genetics, Vol.41, Nos.5/6.

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

Suchentrunk, F., Polster, K., Giacometti, M., Thulin, C.-G., Ruchle, C., Vasilev, A.G., Slotta-Bachmayr, L. (1999). Spatial partitioning of allozyme variability in European mountain hares (*Lepus timidus*): gene pool divergence across a disjunct distributional range. Zeitschrift für Säugetierkunde 64, 308-318.

Thulin, C.-G., Isaksson, M., Tegelstrom, H. (1997). The origin of Scandinavian mountain hares (*Lepus timidus*). Gibier Faune Sauvage, Game Wildl. Vol. 14. p. 463-475.

Thulin, C.-G., Jaarola, M. and Tegelstrom, H. (1997). The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares. Molecular Ecology 6, 463-467.

Thulin, C.-G. and Tegelstrom, H. (2001). High mtDNA haplotype diversity among introduced Swedish brown hares *Lepus europaeus*. Acta Theriologica 46 (4): 375-384.

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

Waples, R. S. (1995). Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. American Fisheries Society Symposium 17, 8-27.

Welsh, J. and Mc Clelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. 18: 7213-7218.

Welsh, J., Peterson, C. and Mc Clelland, M. (1991). Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acids Res. 19: 303-306.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.

Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol.J. Linn.Soc.26:375-400.

Wilson, D. E., Reeder, D. A. M. (1993). Mammal Species of the World a Taxonomical and Geographic Reference, second ed. Smithsonian Inst. Press. Washington, London.

De Winton, W. E. (1898). On the hares of western Europe and north Africa. Ann. Mag.Hist. Lond. 1, 158-1489.

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

Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA : structure and evolution. International Review of Cytology. 141: 173-216.

Wu, C.-H., Li, H.-P., Wang, Y.-X. and Zhang, Y.-P. (2000). Low Genetic Variation of the Yunnan Hare(*Lepus comus* G. Allen 1927) as Revealed by Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences. Biochemical Genetics, Vol. 38, Nos. 5/6.

Zimmermann, K., von Wettstein, O., and Pohle, O. (1953). Die Wildsauger von Kreta. Z. Säugetierk. 17:1-72.