

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ & ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Φυλογεωγραφία της άποδης σαύρας *Anguis* (Reptilia:
Anguinae) στη Νότια Ελλάδα

ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Βούλγαρη – Κόκοτα Άννα (Α.Μ. 495)

ΠΑΤΡΑ, 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ & ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Φυλογεωγραφία της άποδης σαύρας *Anguis* (Reptilia:
Anguinae) στη Νότια Ελλάδα

ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Βούλγαρη – Κόκοτα Άννα (Α.Μ. 495)

ΠΑΤΡΑ, 2014

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Γκιώκας Σίνος, Επίκουρος Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Πατρών)

Κλώσσα – Κίλια Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια (Πανεπιστήμιο Πατρών)

Χονδρόπουλος Βασίλειος, Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Πατρών)

Επιβλέπων: Γκιώκας Σίνος

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	6
A. Εισαγωγή	10
1. Ο οργανισμός μελέτης: η άποδη σαύρα <i>Anguis</i>.....	11
1.1 Η ερπετοπανίδα της Ελλάδας	11
1.1.1 Ενδημισμός, απειλές και καθεστώς προστασίας	12
1.2 Το γένος <i>Anguis</i> ως σύμπλεγμα ειδών.....	13
1.2.1 Εξάπλωση	14
1.2.2 Μορφολογία	16
1.2.3 Μοριακά δεδομένα.....	18
1.3 Παλαιοβιολογία των <i>Anguinae</i>	20
1.4 Το γένος <i>Anguis</i> στον ελλαδικό χώρο.....	22
1.5 Η περίπτωση του <i>A. cephallonica</i>.....	24
2. Περιοχή μελέτης: Πελοπόννησος και Ιόνιο Πέλαγος	27
2.1 Γεωγραφία.....	27
2.2 Παλαιογεωγραφία	28
2.3 Τύποι οικοσυστημάτων.....	32
3. Η φυλογεωγραφία ως ερευνητικό πεδίο	34
3.1 Η φυλογεωγραφία στη μελέτη της εξέλιξης	34

3.2.1 Μοριακοί δείκτες.....	36
3.2.2 Το μιτοχονδριακό DNA ως εργαλείο	37
3.3 Απεικόνιση της εξέλιξης.....	38
3.3.1 Η υπόθεση του μοριακού ρολογιού.....	39
3.4 Μέθοδοι ανάλυσης μοριακών δεδομένων.....	40
3.5 Εφαρμοσμένη φυλογεωγραφία στη διαχείριση περιβάλλοντος	43
B. Υλικά και Μέθοδοι.....	44
4. Το υλικό της μελέτης.....	45
4.1 Επιλογή δειγμάτων	45
4.2 Περιγραφή των δειγμάτων	49
5. Πειραματική πορεία.....	51
5.1 Εξαγωγή ολικού γονιδιωματικού DNA.....	51
5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον μοριακό δείκτη	53
5.3. Καθαρισμός του προϊόντος της PCR και αλληλούχηση	56
6. Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων και φυλογενετική ανάλυση.....	58
6.1 Στοίχιση των αλληλουχιών και εκτίμηση γενετικών αποστάσεων	58
6.2 Φυλογενετικές αναλύσεις.....	59
Γ. Αποτελέσματα.....	62
7. Στατιστικά στοιχεία και γενετικές αποστάσεις	63
7.1 Στατιστικά στοιχεία.....	63
7.2 Γενετικές αποστάσεις	68
8. Φυλογενετικά δέντρα	71

Δ. Συζήτηση	78
9. Γενετικές σχέσεις.....	79
9.1 Γενετικές σχέσεις εντός του <i>Anguis</i> στον ελλαδικό χώρο	79
9.2 Ενδοειδική γενετική απόσταση	80
10. Τοπολογία δενδρογραμμάτων.....	82
10.1 Ο κλάδος για το ελληνικό κονάκι <i>A. graeca</i>	82
10.2 Ο κλάδος για το κεφαλλονίτικο κονάκι <i>A. cephalonica</i>	83
11. Μορφολογικά και μοριακά δεδομένα	87
12. Γενικά συμπεράσματα.....	89
Βιβλιογραφία	94

Περίληψη

Η γεωμορφολογία της Ελλάδας και η ποικιλία των βιοτόπων της την καθιστούν ιδιαίτερη περιοχή μελέτης ως προς την ερπετοπανίδα της. Σήμερα, εκτιμάται ότι στην Ελλάδα υπάρχουν 64 είδη ερπετών, με τα εννέα από αυτά να είναι ενδημικά. Το κεφαλονίτικο κονάκι *Anguis cephallonica* πρόκειται για μια περίπτωση άποδης σαύρας με κρυπτική οικολογία, που εντοπίζεται στην Πελοπόννησο και τα νησιά Κεφαλονιά, Ζάκυνθος και Ιθάκη του Ιονίου Πελάγους.

Έως πρόσφατα, αναγνωρίζονταν δύο είδη στο γένος *Anguis* (Reptilla: Anguillidae): το *A. cephallonica* Werner, 1894 και το *A. fragilis* Linnaeus, 1758 με το δεύτερο να θεωρείται ότι εξαπλώνεται σε ολόκληρη τη δυτική περιοχή της Παλαιαρκτικής. Σήμερα, οι εξελικτικές γραμμές του γένους έχουν μερικώς αποκαλυφθεί. Εκτός από τα δύο προαναφερόμενα, θεωρούνται αποδεκτά τα είδη *A. colchica* (Nordmann 1840) και *A. graeca* Bedriaga, 1881, ενώ πρόσφατα προτάθηκε και η ύπαρξη ενός νέου είδους, του *A. veronensis* Pollini, 1818. Από αυτά, εκτός του *A. cephallonica*, εντοπίζονται στην Ελλάδα το ευρωπαϊκό κονάκι *A. fragilis*, που απαντάται στη Βόρεια Ελλάδα και το ελληνικό κονάκι *A. graeca*, που απαντάται στην ηπειρωτική Ελλάδα δυτικά της κεντρικής Μακεδονίας, στην Εύβοια, στη Βόρεια Πελοπόννησο και στα νησιά Κέρκυρα και Λευκάδα.

Στην παρούσα εργασία, σκοπός είναι η διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων και η ταξινόμηση των γενεαλογικών γραμμών τόσο εντός του είδους *A. cephallonica*, όσο και σε σχέση με τα συγγενικά με αυτό είδη- ιδιαίτερα με το μερικώς συμπάτριο *A. graeca*, έτσι ώστε να προσεγγισθούν βασικά ερωτήματα που αφορούν στις διεργασίες που καθόρισαν ή επηρέασαν την εξελικτική και βιογεωγραφική ιστορία του είδους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα εκτεταμένο δίκτυο πληθυσμών από τοποθεσίες της Πελοποννήσου, της Κεφαλονιάς και της δυτικής ηπειρωτικής Ελλάδας.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε αρχίζει με την εξαγωγή ολικού γονιδιωματικού DNA από κάθε χρησιμοποιούμενο δείγμα και συνεχίζεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον μοριακό δείκτη που

χρησιμοποιήθηκε, τον καθαρισμό του προϊόντος της PCR και την αλληλούχηση. Ο μοριακός δείκτης που επιλέχθηκε για την προσέγγιση των φυλογενετικών σχέσεων και τη διερεύνηση των γενεαλογικών γραμμών τόσο εντός του *A. cephallonica*, όσο και μεταξύ αυτού και των συγγενών με αυτό ειδών, είναι το τμήμα του μιτοχονδριακού DNA που περιέχει το κωδικό γονίδιο ND2 και πέντε αλληλουχίες tRNA και επιλέχθηκε κυρίως γιατί έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα και με επιτυχία σε άλλες φυλογενετικές αναλύσεις ερπετών και αμφιβίων, ενώ φέρει όλα τα πλεονεκτήματα του μιτοχονδριακού DNA.

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας είχαν προσδιορισθεί 22 νέες αλληλουχίες για τον μοριακό δείκτη, που αντιστοιχούν σε 14 απλοτύπους. Πιο συγκεκριμένα, για το *A. cephallonica* προσδιορίστηκαν 17 αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε εννέα απλοτύπους και για το είδος *A. graeca* προσδιορίστηκαν πέντε αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε πέντε διαφορετικούς απλοτύπους. Στην ανάλυση συμπεριελήφθησαν ακόμα 19 αλληλουχίες, που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικής Πληροφορίας των ΗΠΑ NCBI (National Center for Biotechnology Information), έτσι ώστε συνολικά, για το είδος *A. cephallonica* στην ανάλυση να έχουν συμπεριληφθεί 19 αλληλουχίες που ισοδυναμούν με εννέα απλοτύπους, για το είδος *A. graeca* 19 αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε 16 διαφορετικούς απλοτύπους και για το είδος *A. fragilis* δύο αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικούς απλοτύπους.

Μετά την ανάγνωση των αλληλουχιών σειρά είχε η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων με βάση το μοντέλο Tamura-Nei και η φυλογενετική ανάλυση. Εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι αναλύσεων: η μέθοδος Σύνδεσης Γειτόνων, Μέγιστης Πιθανοφάνειας και Μπεϋεσιανής Συμπερασματολογίας. Ως εξωομάδα, χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αναλύσεις ένας απλότυπος *Pseudopus apodus*. Η χρήση του κρίθηκε κατάλληλη εφόσον τα γένη *Pseudopus* και *Anguis* είναι αδελφά taxa, με το είδος *Pseudopus apodus* να εντοπίζεται στην Ελλάδα. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όσον αφορά τόσο στις γενετικές αποστάσεις όσο και στις φυλογενετικές αναλύσεις, τα διαθέσιμα δεδομένα για τον μοριακό δείκτη που επιλέχθηκε κατατάχθηκαν ευκρινώς σε τρία διαφορετικά taxa που αντιστοιχούν στα είδη *A. cephallonica*, *A. graeca* και *A. fragilis*.

Στην τοπολογία των φυλογενετικών δέντρων διακρίνονται τρεις κλάδοι, με απόλυτη στατιστική υποστήριξη, που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τα τρία προαναφερόμενα είδη *Anguis*. Η τοπολογία των δέντρων δείχνει ότι το ελληνικό κονάκι *A. graeca* φαίνεται να ακολουθεί ένα γενικό γεωγραφικό πρότυπο με κατεύθυνση από τον βορρά προς τον νότο. Στην ανάλυση με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, το ελληνικό κονάκι *A. graeca* ομαδοποιείται εγγύτερα στο κεφαλλονίτικο κονάκι *A. cephallonica*, από ό, τι στο *A. fragilis*, ωστόσο με πολύ χαμηλή στατιστική υποστήριξη. Από άποψη γενετικής απόστασης, βρίσκεται εγγύτερα στο είδος *A. fragilis*, κάτι που συμφωνεί και με το γεωγραφικό πρότυπο εξέλιξης του κάθε είδους. Τα φυλογενετικά δέντρα συμφωνούν για το είδος *A. cephallonica*, όσον αφορά στη σχέση των κύριων κλάδων με τα γεωγραφικά δεδομένα. Το κεφαλλονίτικο κονάκι *A. cephallonica* φαίνεται να ακολουθεί ένα σαφές γενικό γεωγραφικό πρότυπο εξέλιξης στην Πελοπόννησο και το Ιόνιο, από τα νότια προς τα βόρεια ή τα βορειοδυτικά. Η ανάλυση με τις μεθόδους μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας, μέγιστης πιθανοφάνειας και σύνδεσης γειτόνων συμφωνούν μεταξύ τους και αποκαλύπτουν διακριτές και γεωγραφικά εντοπισμένες επιμέρους γενεαλογικές γραμμές.

Πλέον, μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι το είδος *A. fragilis*, που θεωρείτο ότι καλύπτει την μεγαλύτερη περιοχή της ηπειρωτικής Ελλάδας, έχει το νότιο όριό του στην Βόρεια Ελλάδα. Επίσης, το είδος *A. colchica* δεν θεωρείται πλέον ότι εξαπλώνεται ως τα νότια Βαλκάνια. Η μορφή που συναντούμε νοτιότερα στην ηπειρωτική Ελλάδα, μέχρι και την Πελοπόννησο, χωρίς ωστόσο το όριο της εξάπλωσής της στην Πελοπόννησο να μπορεί να ορισθεί με βεβαιότητα, γνωρίζουμε, πλέον, ότι είναι διαφορετικό είδος, το ελληνικό κονάκι *A. graeca*. Τα διαφορετικά εξελικτικά πρότυπα, οι γενετικές αποστάσεις και τοπολογίες των ειδών *A. graeca* και *A. cephallonica* αποκλείουν μία κοινή γενεαλογική γραμμή στον ελλαδικό χώρο, που μπορεί να οδήγησε στην σημερινή εξάπλωση του γένους σε αυτόν. Σε συνδυασμό με το στοιχείο της μικρότερης γενετικής απόστασης που συνδέει το *A. graeca* με το *A. fragilis*, φαίνεται να επαληθεύεται η υπόθεση πως το κεφαλλονίτικο κονάκι ανήκει σε διαφορετικό εξελικτικό κλάδο από αυτόν που ανήκουν τα δύο άλλα είδη. Οι δύο εξελικτικές γραμμές

φαίνεται ότι συναντήθηκαν γεωγραφικά, με αποτέλεσμα τη μερικώς συμπάτρια εξάπλωσή τους στη Βόρεια Πελοπόννησο.

Η παρούσα εργασία επιχειρεί να διαλευκάνει τμήμα της εξελικτικής διαφοροποίησης εντός του γένους *Anguis*. Μπορεί να συμβάλει σε μελλοντικές προσπάθειες περαιτέρω διερεύνησής της, όπως και σε μελέτες που θα ασχοληθούν με τη διαχείριση των πληθυσμών του.

A. Εισαγωγή

1. Ο οργανισμός μελέτης: η άποδη σαύρα *Anguis*

1.1 Η ερπετοπανίδα της Ελλάδας

Παρότι η Ελλάδα είναι χώρα μικρής έκτασης, το γεωιστορικό παρελθόν της, η γεωγραφική της θέση, η μεγάλη ποικιλία στο οριζόντιο και κατακόρυφο ανάγλυφο και στο κλίμα, καθώς και η μεγάλη ποικιλία των διαφορετικών βιοτόπων της, έχει συμβάλει στην παρουσία πολλών ειδών ερπετών συγκριτικά με τις άλλες χώρες της Ευρώπης. Ο αριθμός ειδών των ερπετών της Ελλάδας ανά $\log \text{ km}^2$ ($11,9/\log \text{ km}^2$) είναι ο μεγαλύτερος στην Ευρώπη (Λεγάκις κ.ά. 2010). Η Ελλάδα αποτελεί το όριο εξάπλωσης πολλών ειδών, όπως και τον βίοτοπο για πολλά ενδημικά είδη. Συνολικά, η ερπετοπανίδα της περιλαμβάνει 64 είδη που ανήκουν σε 15 οικογένειες (Λεγάκις & Μαραγκού 2009).

Τα ερπετά αποτελούν συχνά υλικό φυλογεωγραφικών μελετών. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται από την περιορισμένη ικανότητα διασποράς και τη θερμοκρασιακή «εξάρτησή» τους, που τα καθιστούν ευαίσθητους δείκτες παλαιοκλιματικών, παλαιοοικολογικών και παλαιογεωγραφικών γεγονότων (π.χ. Lenk *et al.* 1999). Τα τελευταία χρόνια, λόγω της ανάπτυξης ειδικών επιστημονικών μεθόδων, όπως, για παράδειγμα, η ανάλυση DNA, διενεργούνται όλο και περισσότερες μελέτες με αντικείμενο την ποικιλότητα της ερπετοπανίδας και τις διεργασίες διαμόρφωσής της (π.χ. στην Ελλάδα: Πουλακάκης 2005, Κυριαζή 2008, Κορνήλιος 2012), ενώ έχουν γίνει πολλές αλλαγές σχετικά με τη συστηματική κατάταξη των ερπετών. Όλα τα παραπάνω είχαν ως αποτέλεσμα ο θεωρούμενος αριθμός των ερπετών της Ελλάδας να έχει αλλάξει και από 58 είδη που αναφέρονταν στην έκδοση του Κόκκινου Βιβλίου των Απειλούμενων Σπονδυλοζώων της Ελλάδας του 1992, στην έκδοση του 2009 να αναφέρονται συνολικά 64 είδη (Λεγάκις & Μαραγκού 2009, Valakos *et al.* 2008).

1.1.1 Ενδημισμός, απειλές και καθεστώς προστασίας

Η γεωμορφολογία, η γεωιστορία και η γεωγραφική θέση της Ελλάδας συμβάλλει στην ύπαρξη πολλών ενδημικών ειδών και υποειδών. Μερικά από αυτά μπορεί να μην αντιμετωπίζουν άμεσο κίνδυνο, αλλά η περιορισμένη γεωγραφική τους εξάπλωση τα καθιστά ευάλωτα. Εννιά ενδημικά είδη ερπετών συναντώνται στην Ελλάδα (Λεγάκις & Μαραγκού 2009), μεταξύ των οποίων και το κονάκι της Κεφαλονιάς *Anguis cephallonica*, που θα μας απασχολήσει στην παρούσα εργασία.

Στην έκδοση του Κόκκινου Βιβλίου των Απειλούμενων Σπονδυλοζώων της Ελλάδας του 2009 (Λεγάκις & Μαραγκού 2009), το ενδημικό κονάκι *Anguis cephallonica*, συμπεριλαμβάνεται μαζί με άλλα πέντε είδη ερπετών στην κατηγορία Σχεδόν Απειλούμενα (NT) είδη. Χαρακτηρίστηκε έτσι, επειδή στις περιοχές όπου εξαπλώνεται διατηρεί καλούς πληθυσμούς που δεν αντιμετωπίζουν άμεσες απειλές, ωστόσο λόγω της περιορισμένης έκτασης παρουσίας τους, της ακόμη μικρότερης έκτασης κατοίκησης και του χαμηλού αριθμού υποπληθυσμών είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στις αλλαγές χρήσεων γης και στην υποβάθμιση ή και απώλεια του ενδιαιτήματός τους.

Τα περισσότερα είδη ερπετών της Ελλάδας προστατεύονται από το Προεδρικό Διάταγμα 67/1981 (ΦΕΚ 23/Α/30-1-81) για την "αυτοφυή χλωρίδα και πανίδα της χώρας". Εκεί, ωστόσο, δεν περιλαμβάνονται τα νέα είδη που έχουν αναγνωριστεί στα σχεδόν 30 χρόνια που έχουν μεσολαβήσει, ενώ και η εφαρμογή του είναι ασαφής. Είδη ερπετών κοινοτικού ενδιαφέροντος περιλαμβάνονται στα παραρτήματα της κοινοτικής Οδηγίας 92/43/ΕΟΚ για τη διατήρηση των φυσικών οικοτόπων, καθώς και της άγριας πανίδας και χλωρίδας. Στο παράρτημα IV και ως "είδη κοινοτικού ενδιαφέροντος που απαιτούν αυστηρή προστασία" περιλαμβάνονται πολλά είδη της ελληνικής ερπετοπανίδας και όλα τα ενδημικά είδη, εκτός από το *A. cephallonica*, παρά την ανεπαρκή καταγραφή των πληθυσμών του.

Σημειώνεται ότι οι πληθυσμοί από όλα τα είδη ερπετών που εντάσσονται σε κατηγορία κινδύνου και σχεδόν από όλα τα ερπετά της Ελλάδας

εξαπλώνονται σε προστατευόμενες περιοχές (περιοχές Natura 2000), χωρίς ωστόσο αυτό να συνδέεται με εφαρμογή ειδικών προγραμμάτων προστασίας και διατήρησης. Όσον αφορά διεθνείς συμβάσεις, όλα σχεδόν τα είδη ερπετών της Ελλάδας περιλαμβάνονται στη Σύμβαση της Βέρνης για τη διατήρηση της άγριας ζωής και του φυσικού περιβάλλοντος της Ευρώπης.

1.2 Το γένος *Anguis* ως σύμπλεγμα ειδών

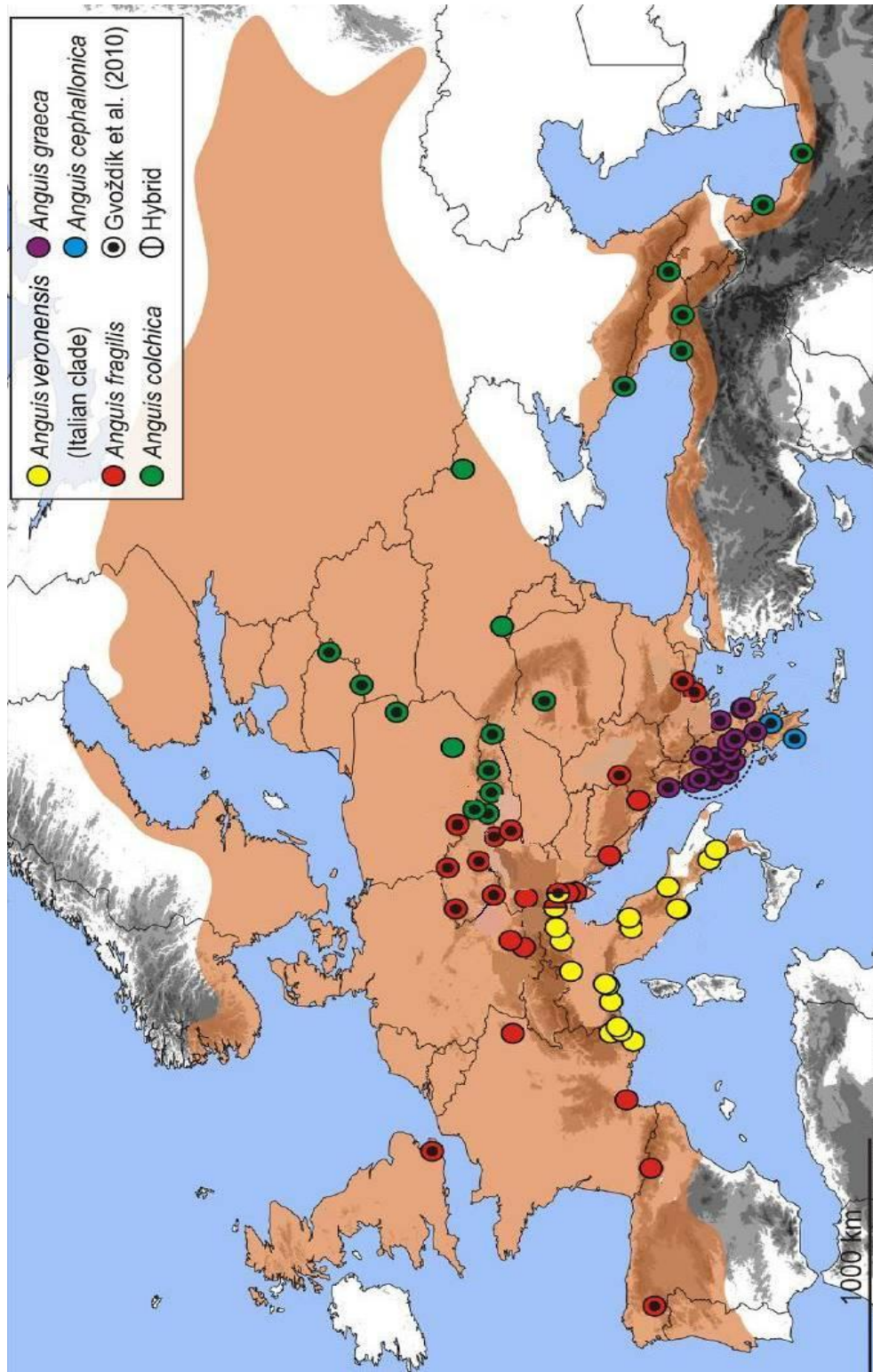
Η άποδη σαύρα του γένους *Anguis*, το επονομαζόμενο κονάκι ή ακονάκι (στην αγγλική βιβλιογραφία ‘slow worm’, ενώ στη γερμανική ‘Blindschleiche’), έως πρόσφατα (Gvoždík *et al.* 2010, Gvoždík *et al.* 2013) δεν είχε διερευνηθεί φυλογενετικά ως προς τα διαφορετικά είδη που διαμορφώνονται κατά μήκος της εξάπλωσής του. Ωστόσο, από τις αρχές τις δεκαετίας του ’90, μορφομετρικές μελέτες αποπειράθηκαν να επιλύσουν το σύμπλεγμα των διαφορετικών μορφοτύπων του (Cabela & Grillitsch 1989, Grillitsch & Cabela 1990).

Έως πρόσφατα, αναγνωρίζονταν δύο είδη στο γένος *Anguis* (Reptilia: Anguillidae): το *A. cephallonica* Werner, 1894 και το *A. fragilis* Linnaeus, 1758 (Arnold 2002, Völkl & Alfermann 2007). Ενώ το πρώτο είδος περιορίζεται σε ένα μικρό τμήμα του ελλαδικού χώρου, το δεύτερο φερόταν να έχει εξάπλωση που καλύπτει ολόκληρη τη δυτική περιοχή της Παλαιαρκτικής. Παραδοσιακά, είχαν διακριθεί εντός του *A. fragilis* δύο μορφές, που θεωρούνταν υποείδη από διάφορους συγγραφείς (π.χ. Arnold 2002, Musters & in den Bosch 1982): το δυτικό *A. f. fragilis* και το ανατολικό *A. f. colchica* (Nordmann 1840). Στη συνέχεια, η παρατήρηση μορφοτύπων από την Ελλάδα, μη συμβατών με κανένα ως τότε αναγνωρισμένο τύπο, οδήγησε στην υπόθεση της ύπαρξης ενός υποείδους *A. f. graeca*, το οποίο σήμερα έχει αναγνωρισθεί ως είδος *A. graeca* Bedriaga, 1881. Σήμερα, οι εξελικτικές γραμμές του γένους έχουν μερικώς αποκαλυφθεί. Θεωρούνται αποδεκτά τα είδη *A. fragilis*, *A. colchica*, *A. graeca* και *A. cephallonica*, ενώ προτείνεται και η ύπαρξη ενός νέου είδους, του *A. veronensis* Pollini, 1818.

1.2.1 Εξάπλωση

Η μορφολογική διαφοροποίηση (για παράδειγμα, η παρουσία ή η απουσία ακουστικών ανοιγμάτων, ο αριθμός των φολίδων στο μέσο του σώματος, η παρουσία ή η απουσία μπλε κηλίδων, ο χρωματισμός κ.λπ.) στο γένος *Anguis* έχει υπάρξει αντικείμενο βιογεωγραφικών ερευνών με στόχο την αποσαφήνιση της εξάπλωσης των διαφορετικών μορφοτύπων (ενδεικτικά, βλέπε Voïrio 1962, Beshkov 1966, Lác 1967, Musters & in den Bosch 1982). Για παράδειγμα, είχε προταθεί μία μακρά ζώνη επαφής μεταξύ των δύο μορφών που τότε αναγνωρίζονταν ως υποείδη *A. f. fragilis* και *A. f. colchica*, η οποία εκτείνεται από τη δυτική Φινλανδία και τη Βαλτική δια μέσου της κεντρικής Ευρώπης (κατά μήκος των συνόρων μεταξύ Τσεχίας και Σλοβακίας) ως τα βορειοδυτικά Βαλκάνια (Völkl & Alfermann 2007). Ένα εξαιρετικά περίπλοκο γεωγραφικό πρότυπο των διαφορετικών μορφοτύπων και των ενδιάμεσων τους στους βαλκανικούς φαινοτύπους, εξηγήθηκε ως συμπάτρια εξάπλωση των δύο μορφών (Beshkov 1966, Musters & in den Bosch 1982, Cabela & Grillitsch 1989, Grillitsch & Cabela 1990, Stojanov 2001, Arnold 2002), ή ως απόδειξη ύπαρξης μιας ενδιάμεσης μορφής (Mayer *et al.* 1991). Εντούτοις, η εξωτερική μορφολογία δεν συμβάδιζε με μία υπόθεση ενδοειδικής υποδιαίρεσης, κάτι που καθιστούσε απαραίτητη τη γενετική διερεύνηση των σχέσεων των διαφορετικών μορφών.

Σήμερα είναι αποδεκτό, με βάση αποτελέσματα ερευνών που βασίστηκαν σε μοριακά δεδομένα (Gvoždík *et al.* 2010, Gvoždík *et al.* 2013), ότι τα διαφορετικά είδη κατανέμονται γεωγραφικά ως εξής (Εικόνα 1): το *A. fragilis* εντοπίζεται στη δυτική και κεντρική Ευρώπη, στα βορειοδυτικά και ανατολικά Βαλκάνια και στη δυτική Σκανδιναβία και Ιταλία, το *A. colchica* στην περιοχή από την ανατολική Τσεχία και την περιοχή της Βαλτικής προς τα ανατολικά ως το βόρειο Ιράν, στην ανατολική Σκανδιναβία και τα βορειοανατολικά Βαλκάνια, το *A. graeca* περιορίζεται στα νότια Βαλκάνια και η εξάπλωσή του εμφανίζεται μερικώς συμπάτρια με αυτήν του *A. cephalonica* στη βόρεια Πελοπόννησο, ενώ το τελευταίο εκτός από την Πελοπόννησο απαντάται και στα νησιά του Ιονίου Ζάκυνθος, Κεφαλονιά και Ιθάκη. Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, πρόσφατα προτάθηκε ένα νέο είδος, το *A. veronensis*, με εξάπλωση στην ιταλική χερσόνησο.



Εικόνα 1. Η σκιασμένη περιοχή αποτελεί την προτεινόμενη εξάπλωση του γένους *Anguis* από τους Völkl & Alfermann (2007). Οι τοποθεσίες εντοπισμού ατόμων διαφορετικών ειδών του γένους σημειώνεται με διαφορετικό χρωματισμό στον χάρτη και αντιστοιχούν στις εργασίες των Gvoždík *et al.* του 2010 και του 2013. Τροποποίηση από Gvoždík *et al.* 2013

1.2.2 Μορφολογία

Το γένος *Anguis* περιλαμβάνει άποδες σαύρες, που μοιάζουν με φίδια. Διαφέρουν, ωστόσο, καθώς μπορεί να φέρουν ακουστικά ανοίγματα, έχουν πάντα κινητά βλέφαρα, ενιαία κάτω σιαγόνα και δεν διαθέτουν πλατιές κοιλιακές φολίδες, σε αντίθεση με τα φίδια. Επίσης, η αναλογία μήκους κεφαλοκορμού-ουράς είναι χαρακτηριστική στις άποδες σαύρες, με την ουρά να είναι ίση ή και μακρύτερη από τον κυρίως υαλώδη κεφαλοκορμό τους. Τα μέλη του γένους έχουν τη χαρακτηριστική ικανότητα να αποκόπτουν την ουρά τους κατά βούληση όταν χρειαστεί. Ο μηχανισμός αυτός (αυτοτομία) έχει αμυντικό χαρακτήρα και δίνει τη δυνατότητα απόδρασης. Το ολικό μήκος του σώματος των *Anguis* μπορεί να φτάσει και τα 50 cm, αλλά συνήθως είναι αρκετά μικρότερο (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Το κεφαλλονίτικο κονάκι (από Ilias Strachinis www.herpetofauna.gr)

Κάποια ενδιαφέροντα μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους έχουν υπάρξει αντικείμενο εργασιών. Παραδείγματα είναι η μορφολογική και κινηματική μελέτη της γλώσσας και της στοματικής κοιλότητάς του (Toubeau *et*

al. 1994), με πολύ ενδιαφέροντα ευρήματα σχετικά με τον μηχανισμό και την ικανότητα ανίχνευσης χημικών ουσιών και η μελέτη της δομής και της ανάπτυξης του οστεοδέρματος (Zylberberg & Castanet 1985).

Η μορφολογική διαφοροποίηση εντός του γένους αφορά στην παρουσία ή απουσία ακουστικών ανοιγμάτων, στον διαφορετικό αριθμό φολίδων περιμετρικά στο μέσο του σώματος, στην παρουσία ή απουσία μπλε κηλίδων και σε διαφορές στον βασικό χρωματισμό του σώματος. Κάποια από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που φαίνεται να διαχωρίζουν τους μορφοτύπους στις μορφομετρικές εργασίες του 1989 και 1990 παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Το *A. cephallonica* χαρακτηρίζεται από μακρύτερο κεφάλι στα ενήλικα άτομα και μακρύτερη ουρά, όπως επίσης και από γενικότερα μεγαλύτερο μέγεθος. Δεν παρουσιάζει εξωτερικά ακουστικά ανοίγματα, εμφανίζει αυξημένο αριθμό φολίδων περιμετρικά στο μέσον του σώματος (από 30 έως 34, σπανιότερα έως 36) και χαρακτηριστικό χρωματισμό με σκουρότερη κοιλιακή επιφάνεια και ίσως πλευρική επιφάνεια, με πιο ανοιχτό χρωματισμό στη ραχιαία πλευρά, όπου μπορεί να υπάρχουν καφέ διαμήκεις γραμμές ή σειρές στιγμάτων.

Πίνακας 1. Μορφολογικός διαχωρισμός των μορφοτύπων *fragilis* και *colchicus* (Cabela & Grillitsch 1989, Cabela & Grillitsch 1990)

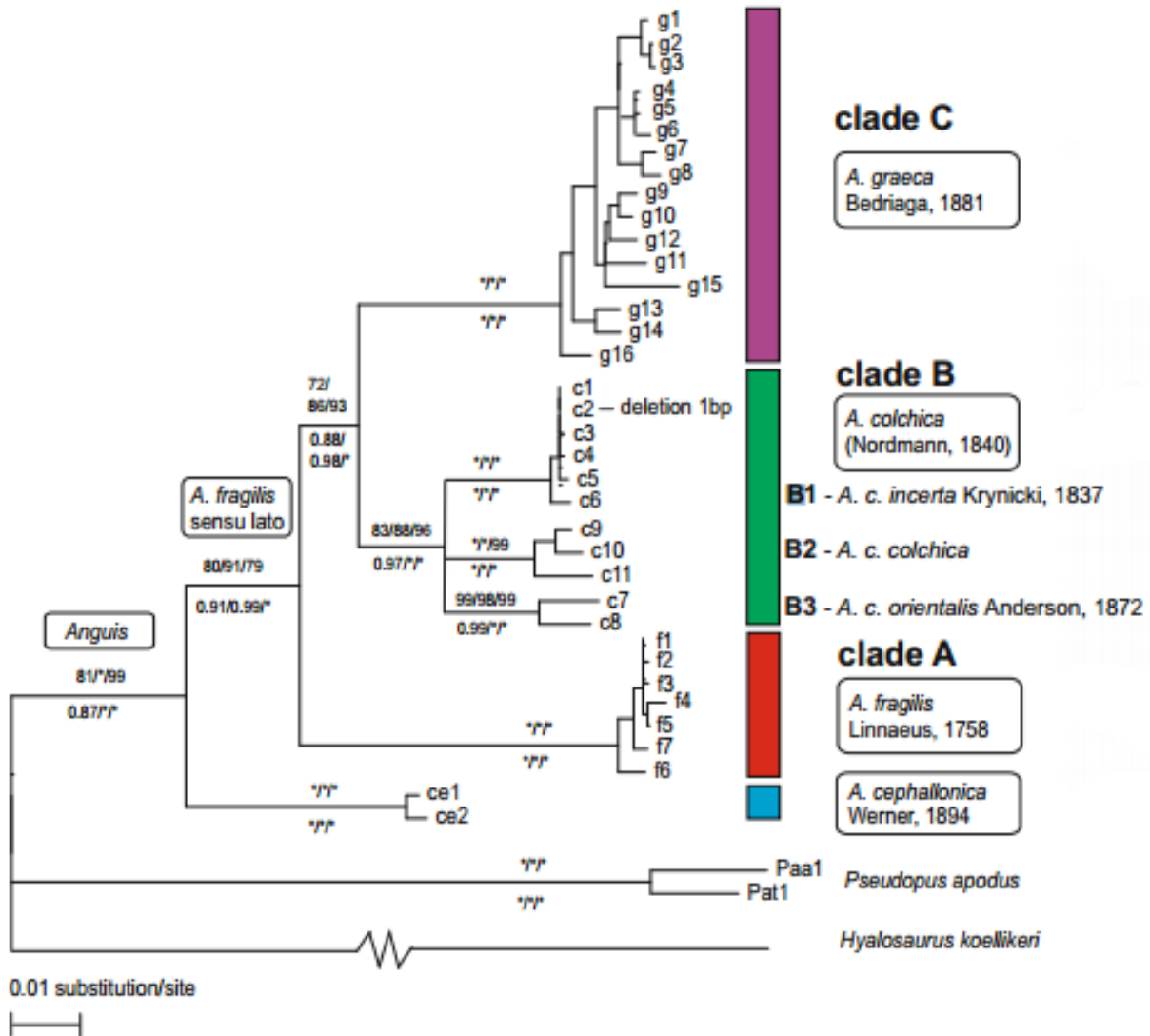
Μορφολογικό χαρακτηριστικό	<i>A. cephallonica</i>	<i>A. f. fragilis</i>	<i>A. f. colchicus</i>
Παρουσία / Απουσία εξωτερικού ακουστικού ανοίγματος	Απουσία	Απουσία	Συνήθης παρουσία
Αριθμός φολίδων περιμετρικά στο μέσον του σώματος	30-34(-36)	24-26	26-30
Παρουσία / Απουσία μπλε κηλίδων	Απουσία	Απουσία	Συχνή παρουσία
Σχετικό μήκος από το κεφάλι έως την ουρά, ενήλικου ατόμου	Μεγαλύτερο του συμπλέγματος <i>fragilis-colchica</i>	Βραχύτερο όλων	Μακρύτερο από το <i>A. f. fragilis</i>

1.2.3 Μοριακά δεδομένα

Το 1991, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά μελέτη με σκοπό τη διερεύνηση των σχέσεων των διαφορετικών μορφοτύπων του *Anguis*, η οποία δεν στηριζόταν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά. Επρόκειτο για μια μελέτη ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πρωτεϊνών (Mayer *et al.* 1991), της ίδιας ερευνητικής ομάδας, που χρησιμοποίησε το αρχειακό υλικό του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Βιέννης το 1989 και το 1990. Η εργασία αυτή επιβεβαίωσε ότι το μέχρι τότε αναφερόμενο υποείδος *A. f. peloponnesiacus* πρόκειται για διαφορετικό είδος και συμπίπτει με το *A. f. cephallonica*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι ηλεκτρομορφές s (slow=αργό), m (medium=μέσο), f (fast=ταχύ), για τα ένζυμα GPI, GOT-1, CPK, PGM-1 των οργανισμών. Για άλλα 11 ένζυμα δεν προέκυψε σημαντική διαφορά.

Οι φυλογενετικές σχέσεις του γένους διερευνήθηκαν με βάση ένα τμήμα μιτοχονδριακού DNA και δύο τμήματα πυρηνικών κωδικών τόπων, το 2010 (Gvoždík *et al.* 2010). Το είδος *A. cephallonica* φέρεται να αποτελεί αδελφό τάxon ενός κλάδου που συμπεριλαμβάνει όλες τις άλλες εξελικτικές γραμμές, οι οποίες αντιστοιχούν σε τρία διαφορετικά είδη (Εικόνα 3).

Τα τρία αυτά είδη, των οποίων οι εξελικτικές σχέσεις διερευνήθηκαν είναι τα *A. fragilis*, *A. colchica* και *A. graeca*. Σύμφωνα με τον πιο ποικιλόμορφο μιτοχονδριακό δείκτη, το γονίδιο ND2, το *A. graeca* εμφανίζεται ως αδελφό τάxon του είδους *A. colchica*, ενώ και τα δύο είδη μαζί διαμορφώνουν αδελφό τάxon του *A. fragilis*. Οι λιγότερο ποικιλόμορφοι πυρηνικοί δείκτες δείχνουν το *A. colchica* να εμφανίζεται εγγύτερα στο *A. fragilis*. Το γονίδιο *C-mos* δεν εμφάνισε ουσιώδη διαφοροποίηση εντός του συμπλέγματος των ειδών, ενώ το γονίδιο *PRLP*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε φυλογεωγραφική μελέτη σε ερπετό, διαχώρισε απλώς τα είδη. Υπό συζήτηση βρίσκεται η ενδοειδική γενετική απόσταση στο *A. colchica* και προτείνεται η διάκριση δύο πληθυσμών, ενός στην περιοχή του Καυκάσου και ενός στην περιοχή της Κασπίας.



Εικόνα 3. Φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας με μοριακό δείκτη το μιτοχονδριακό γονίδιο ND2 και πέντε μιτοχονδριακά tRNA (Gvoždík *et al.* 2010). Το μοντέλο υποκατάστασης είναι το TrN+I+G. Οι αριθμοί πάνω από τους κλάδους δείχνουν τη στατιστική υποστήριξη με βάση τον έλεγχο bootstrap για τις αναλύσεις Μέγιστης Πιθανοφάνειας, Μέγιστης Φειδωλότητας και Σύνδεσης Γειτόνων. Ο αστερίσκος συμβολίζει πλήρη υποστήριξη.

Το 2013, η ίδια ερευνητική ομάδα με παρόμοια μεθοδολογία, πρότεινε την αναγνώριση ενός νέου είδους με εξάπλωση στην ιταλική χερσόνησο (Gvoždík *et al.* 2013). Ως όνομα του νέου είδους προτάθηκε το *A. veronensis*, Pollini 1818, ενώ ενδιαφέρον έχει η εμφανιζόμενη στενή του συγγένεια με το είδος *A. fragilis* και η πιθανή ύπαρξη ζώνης υβριδισμού μεταξύ τους.

Οι αποκαλυπτόμενες γενετικές διαφορές είναι λογικό να παίξουν ρόλο τόσο σε μεταγενέστερες βιογεωγραφικές μελέτες, όσο και σε μορφολογικές. Ο σαφέστερος καθορισμός της εξάπλωσης του κάθε είδους και των οικοσυστημάτων στα οποία διαβιά, δίνει νέα ώθηση για τη μελέτη της οικολογίας, αλλά και για τον σχεδιασμό των πολιτικών προστασίας και διατήρησης των πληθυσμών.

1.3 Παλαιοβιολογία των *Anguinae*

Το γένος *Anguis* εντάσσεται ταξινομικά στην υποοικογένεια *Anguinae* της οικογένειας *Anguidae*. Πρόκειται για μια οικογένεια, τα είδη της οποίας ζουν στο βόρειο ημισφαίριο. Εντός της υποοικογένειας *Anguinae*, εκτός του γένους *Anguis*, περιλαμβάνονται και τα γένη *Pseudopus* και *Ophisaurus*. Σημειώνεται, ότι μέχρι το 1999 το γένος *Pseudopus* κατατασσόταν και αυτό στην ομάδα *Ophisaurus*. Τα γένη *Ophisaurus* εντοπίζεται στη Βόρεια Αμερική, την ανατολική Ασία, τη δυτική Ασία και στην περιοχή του Μαρόκο, ενώ το πρόσφατα διαχωρισμένο από το γένος *Ophisaurus*, *Pseudopus*, εντοπίζεται στα νότια Βαλκάνια, στην Τουρκία, στην περιοχή του Καυκάσου, δυτικά και ανατολικά της Κασπίας θάλασσας ενώ εξαπλώνεται προς τα ανατολικά ως το νοτιοανατολικό Καζακστάν.

Σε μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των σαυρών της οικογένειας *Anguidae* (Macey *et al.* 1999) επιβεβαιώθηκε η μονοφυλετικότητά της ως εξελικτικού κλάδου. Η οικογένεια εμφανίζεται να προέρχεται από τη Βόρεια Λαυρασία. Οι σαύρες της οικογένειας που σήμερα παρουσιάζουν εξάπλωση σε περιοχές προερχόμενες από την Γκοντβάννα, έφθασαν εκεί μέσω δύο χωριστών γεγονότων διασποράς: από τη λαυρασιακή πλάκα προς το Μαρόκο και από τις Δυτικές Ινδίες προς τη Νότιο Αμερική.

Τα παλαιότερα διαθέσιμα απολιθώματα σαυρών από το μέσο Ηώκαινο (40-50 εκατομμύρια χρόνια πριν) φαίνεται να συνδέονται με όλα τα σύγχρονα *Anguinae* (Gauthier 1982). Εάν ισχύει αυτή η υπόθεση, οι νεότερες γενεαλογικές γραμμές της υποοικογένειας τοποθετούνται στην Ευρώπη στο Ηώκαινο, πριν

την ξήρανση της Τηθύος Θάλασσας που έλαβε χώρα κατά το Ολιγόκαινο. Τα γένη που εντοπίζονται στην Ευρώπη και στη δυτική Ασία αποχωρίστηκαν πολύ γρήγορα από αυτά που σήμερα εντοπίζονται στην Ανατολή και τη Βόρεια Αμερική με ορόσημο την ανύψωση του Θιβέτ κατά το Ολιγόκαινο-Μειόκαινο. Απολιθώματα που συγγενεύουν με τον κλάδο των γενών *Anguis* και *Pseudopus* εμφανίζονται το ύστερο Ολιγόκαινο (25-30 εκατομμύρια χρόνια πριν) (Gauthier 1982). Ο χρόνος αυτός συμπίπτει με την ένωση της Ευρώπης με την Ασία και μέσω αυτής με την Αμερική (Briggs 1987). Την ίδια περίοδο άρχισε η πρώτη φάση ανύψωσης του Θιβέτ σε ένα μέσο ύψος 3000m (Dewey *et al.* 1989). Μια δεύτερη φάση, που φθάνει τα 10 εκατομμύρια χρόνια πριν, διατήρησε αυτό το ύψος (Shackleton & Chang 1988), ώσπου μία τρίτη οδήγησε έως περίπου τα 5000m ύψος (Dewey *et al.* 1989). Μέχρι το ύστερο Ολιγόκαινο προς το Μειόκαινο, οι πληθυσμοί στην Ευρώπη και τη δυτική Ασία ήταν πλήρως απομονωμένοι.

Η αρχαία γενεαλογική γραμμή των σαυρών *Anguinae* ίσως να εισήλθε στην Ευρώπη από τη Βόρεια Αμερική κατά το Ηώκαινο (50 εκατομμύρια χρόνια πριν), πριν τον σχηματισμό του Βόρειου Ατλαντικού και στη συνέχεια να επεκτάθηκε νότια προς τη Βόρεια Αφρική και προς τα ανατολικά προς τη Δυτική Ασία. Η ξήρανση της Τηθύος στο Ολιγόκαινο θα μπορούσε να έχει επιτρέψει την μετανάστευση προς την ανατολική Ασία και στη συνέχεια την επιστροφή στη Βόρεια Αμερική μέσω της Βεριγγείας. Η ανύψωση του Θιβέτ θα σχημάτιζε εμπόδιο στη μετανάστευση μεταξύ ανατολικής και δυτικής Ευρασίας. Αυτή η υπόθεση είναι συμβατή τόσο φυλογενετικά, αλλά και με την υπόθεση ότι τα ευρωπαϊκά απολιθώματα του Ηωκαίνου συνδέονται είτε με τη σύγχρονη γενεαλογική γραμμή της Βόρειας Αφρικής, είτε με αυτή της Ευρώπης ή της Δυτικής Ασίας (Meszoely & Haubold 1975). Οι σαύρες της υποοικογένειας που σήμερα εμφανίζονται στη Βόρεια Αμερική, μπορεί να έφθασαν εκεί αργότερα και να απομονώθηκαν με τη διαμόρφωση του Ατλαντικού κατά το ύστερο Ηώκαινο.

Τα ευρωπαϊκά απολιθώματα των *Anguinae* του ύστερου Ολιγόκαινου-Μειόκαινου συνδέονται με τον κλάδο των *Anguis-Pseudopus apodus* (Gauthier, 1982). Η πρώτη εμφάνιση απολιθωμάτων *Ophisaurus* στη Βόρεια Αμερική

συμβαίνει στο ύστερο Μειόκαινο (Holman 1970). Αυτή η παρατήρηση συνάδει με την μετά το Ολιγόκαινο άφιξη των *Ophisaurus* στη Βόρειο Αμερική μέσω του Βερίγγειου Πορθμού στη σημερινή εξάπλωσή τους. Το αρχείο απολιθωμάτων είναι δύσκολο να μεταφρασθεί, διότι πολλά δείγματα προκαλούν μορφολογική σύγχυση (Gauthier 1982). Σημειώνεται, ότι η διαφοροποίηση μεταξύ αυτών και του *Ophisaurus koellikeri* του Μαρόκο είναι αρχαιότερη από 10 εκατομμύρια χρόνια. Το γεγονός του διαχωρισμού του *Pseudopus apodus* από τα *Anguis* εμφανίζεται κατά προσέγγιση 9 εκατομμύρια χρόνια πριν.

1.4 Το γένος *Anguis* στον ελλαδικό χώρο

Η πρώτη απόπειρα αναθεώρησης της συστηματικής των μορφοτύπων του γένους *Anguis* στον ελλαδικό χώρο έγινε το 1989 και το 1990 από τους Cabela και Grillitsch (Cabela & Grillitsch 1989, Grillitsch & Cabela 1990). Το 1989, αντικείμενο μελέτης είναι υλικό προερχόμενο από την Αλβανία και τη Βόρεια Ελλάδα, που αναγνωρίζεται ως *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758 του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Βιέννης. Στη μελέτη αυτή, τα άτομα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, οι οποίες γεωγραφικά αντιστοιχούν στην Αλβανία, την Κέρκυρα και την Βόρεια ηπειρωτική Ελλάδα.

Αναφέρεται ότι στα δείγματα κυριαρχεί ο φαινότυπος *A. fragilis colchicus*, ενώ ο φαινότυπος *fragilis* φαίνεται να μειώνεται από τον Βορρά προς τον Νότο. Από τα δείγματα της Αλβανίας, περίπου το $\frac{1}{4}$ αναγνωρίστηκε ως *A. f. fragilis*, ενώ περίπου το $\frac{1}{2}$ ως *A. f. colchicus*. Από αυτά της Κέρκυρας το $\frac{1}{5}$ θεωρήθηκε *A. f. fragilis* και περί των $\frac{3}{5}$ *A. f. colchicus*, ενώ από αυτά της ηπειρωτικής Ελλάδας το $\frac{1}{6}$ κατατάχθηκε ως *A. f. fragilis* και τα $\frac{2}{3}$ ως *A. f. colchicus*. Σημειώνεται ότι το 1989 ισχύουσα ήταν η αντίληψη που ήθελε το είδος *A. fragilis* να εμφανίζει τρεις μορφές-υποείδη κατά μήκος του εύρους εξάπλωσής του. Αυτές ήταν η *A. f. fragilis* Linnaeus, 1758, στη Δυτική και Κεντρική Ευρώπη, η *A. f. colchicus* (NORDMANN, 1840), από την Ανατολική Ευρώπη ως τα ασιατικά όρια εξάπλωσης του είδους και η *A. f. peloponnesiacus* Stepanek, 1937, στην Πελοπόννησο και τα τρία Ιόνια νησιά του Ιονίου Πελάγους Ζάκυνθος, Κεφαλονιά

και Ιθάκη. Σχετικά με το *A. f. peloponnesiacus*, που αργότερα καθιερώθηκε ως είδος *A. cephallonica*, οι Cabela και Grillitsch αναφέρουν ότι διαφαίνεται μεγάλη ποικιλομορφία εντός του.

Ένα χρόνο αργότερα, δημοσιεύεται η εργασία πάνω στη συστηματική κατάσταση του γένους *Anguis* στην Πελοπόννησο και τα νησιά του Ιονίου Πελάγους (Grillitsch & Cabela 1990). Η ανάλυση χαρακτήρων στη εργασία αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το υποείδος *Anguis fragilis peloponnesiacus* και ο μορφότυπος *Anguis fragilis var. cephallonica* μπορεί να θεωρηθεί ότι περιγράφουν το ίδιο τάξον, το οποίο διαφοροποιείται εμφανώς από την ομάδα των μορφοτύπων *fragilis-colchicus*. Προτείνεται η υιοθέτηση του ονόματος *Anguis cephallonicus* Werner 1894 ως έγκυρου για αυτό. Παράλληλα, θεωρείται ότι τα δείγματα που προέρχονται από την Πελοπόννησο και δεν μπορούν να ταξινομηθούν ως *A. cephallonicus* ανήκουν είτε στην ομάδα *fragilis-colchicus*, όπως ονομάζεται, είτε σε ενδιάμεσους φαινοτύπους.

Πιο συγκεκριμένα, στην προαναφερόμενη εργασία τα δείγματα διαιρούνται σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη ομάδα «*peloponnesiacus*» αντιστοιχεί σε ζώα που προέρχονται από την Πελοπόννησο και η δεύτερη «*var. cephallonica*» αντιστοιχεί σε ζώα από την Κεφαλονιά και τη Ζάκυνθο, που μοιράζονται τα ίδια χαρακτηριστικά με την ομάδα 1. Η τρίτη ομάδα απαρτίζεται από ζώα που προέρχονται από την Πελοπόννησο, αλλά δεν έχουν τα χαρακτηριστικά του μορφοτύπου *peloponnesiacus*. Τέλος, η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει ζώα της ηπειρωτικής Ελλάδας, που είτε αναγνωρίζονται ως *fragilis*, είτε ως *colchicus*, είτε ως ενδιάμεσα. Το *A. cephallonicus* δεν παρουσιάζει εξωτερικά ακουστικά ανοίγματα, εμφανίζει αυξημένο αριθμό φολίδων, από 30 έως 34 (σπανιότερα έως 36), συγκριτικά μεγαλύτερο μέγεθος ουράς και χαρακτηριστικό χρωματισμό.

Μετά την υιοθέτηση της άποψης για ύπαρξη διαφορετικού μορφοτύπου, ο οποίος ονομάστηκε *A. f. peloponnesiacus* και στη συνέχεια *A. cephallonica*, παρά τις παρατηρήσεις του Wermuth (Wermuth 1950), αναγνωρίστηκαν μερικά δείγματα από την Ελαία της Πελοποννήσου τα οποία δεν είχαν τα χαρακτηριστικά αυτού του υποείδους. Έτσι, έγινε αποδεκτό ότι υπάρχει ακόμα

μία μορφή στην Πελοπόννησο, που με επιφύλαξη προτάθηκε ότι είναι η μορφή *A. f. colchicus* (Bringsoe 1985). Επρόκειτο για τη μη αναγνωρισμένη μορφή του σήμερα γνωστού μας είδους *A. graeca*, που πρωτοπαρατηρήθηκε στην περιοχή του όρους Παρνασσού στη Στερεά Ελλάδα. Με την αναγνώριση του *A. graeca*, με χρήση μοριακών δεδομένων (Gvoždík *et al.* 2010), ως ξεχωριστό είδος, αναθεωρήθηκε η αντίληψη που κατέτασσε τους ενδιάμεσους μορφοτύπους στον τύπο *colchica*. Το *A. colchica* δεν θεωρείται πλέον ότι εξαπλώνεται ως τα νότια Βαλκάνια, ενώ το νοτιότερο όριο εξάπλωσης του *A. fragilis* θεωρείται η Βόρεια Ελλάδα.

Συμπερασματικά, τα είδη που εμφανίζονται στην Ελλάδα είναι τα εξής:

- το ευρωπαϊκό κονάκι *A. fragilis*, που απαντάται στη Βόρεια Ελλάδα,
- το ελληνικό κονάκι *A. graeca*, που απαντάται στην ηπειρωτική Ελλάδα (από την κεντρική Μακεδονία μέχρι τη Στερεά Ελλάδα), στην Εύβοια, στη βόρεια Πελοπόννησο, στην Κέρκυρα, στην Λευκάδα και στη Νότια Αλβανία και
- το κεφαλλονίτικο κονάκι, *A. cephallonica*, με εξάπλωση στην Πελοπόννησο και στα νησιά Ζάκυνθος, Κεφαλονιά και Ιθάκη.

1.5 Η περίπτωση του *A. cephallonica*

Η ιδέα της ταξινομικής διαίρεσης των πληθυσμών του *A. fragilis* της ευρωπαϊκής ηπείρου είχε τεθεί υπό αμφιβολία πολλές φορές στο παρελθόν (π.χ. Cyren 1941, Musters & in den Bosch 1982). Εντούτοις, η ιδέα της αυτονόμησης ως διαφορετικού υποείδους των πληθυσμών της Πελοποννήσου βρήκε, εκτός ελάχιστων εξαιρέσεων (Mertens & Müller 1940), καθολική αποδοχή. Τα όρια εξάπλωσης του νέου τάξου *A. f. peloponnesiacus* περιελάμβαναν αρχικά μόνο την Πελοπόννησο. Η άποψη αυτή επαναλαμβάνεται και αργότερα στη βιβλιογραφία (Mertens & Wermuth 1960, Ondrias 1968, Chondropoulos 1986), παρά το γεγονός ότι μόλις λίγα χρόνια μετά την πρώτη περιγραφή του ως υποείδους, το 1937, αναγνωρίστηκε τόσο στη Ζάκυνθο όσο και στην Κεφαλονιά (Kuehnelt 1941, Werner 1938, Stepanek 1944). Η εξάπλωση του είδους φαίνεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4. Η εξάπλωση του *A. cephallonica*. (Τροποποίηση από www.iucn.com).

Η αναγνώρισή του στην Κεφαλονιά και τη Ζάκυνθο χρονολογείται στο έτος 1894 (Werner 1894). Ο Werner περιέγραψε τα πέντε δείγματά του από τα νησιά αυτά ως εξής: «... μία ποικιλία, η οποία έχει βαθύ σκούρο χρωματισμό στην κάτω πλευρά και στα πλευρικά και ανοιχτό κίτρινο η λευκωπό χρωματισμό στην πάνω πλευρά, όπου μπορεί να υπάρχουν οκτώ καφέ γραμμές ή κουκκίδες. Την ποικιλία αυτή θα ήθελα να ονομάσω ως *var. cephallonica*.» Ο ίδιος θα υποστήριζε αργότερα ότι η ποικιλία αυτή είναι παρεμφερής με το υποείδος *peloponnesiacus* (Werner 1938). Ο Mahnert (Mahnert 1973), τέλος, αναγνώρισε στην Ιθάκη έναν μορφότυπο, που όπως αναφέρει «ο χρωματισμός του ταιριάζει με το υποείδος *peloponnesiacus*...».

Το 1990 δημοσιεύτηκε η εργασία για τη συστηματική κατάσταση του γένους *Anguis* σχετικά με την Πελοπόννησο και το Ιόνιο (Grilitsch & Cabela

1990), με μελέτη δειγμάτων του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Βιέννης. Η ανάλυση χαρακτήρων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το υποείδος *A. f. peloponnesiacus* και ο μορφότυπος *A. f. var. cephallonica* μπορεί να θεωρηθεί ότι περιγράφουν το ίδιο τάξον, το οποίο διαφοροποιείται εμφανώς από την ομάδα *fragilis-colchicus*. Έτσι, προτάθηκε η υιοθέτηση του ονόματος *Anguis cephallonicus* Werner 1894 ως έγκυρου για αυτό.

Ως είδος, το *A. cephallonica* από την Πελοπόννησο επιβεβαιώθηκε με μοριακά δεδομένα, όπως είδαμε, το 2010 (Gvoždík *et al.* 2010). Σε αυτήν την εργασία αποκαλύπτεται ότι το είδος αυτό αποτελεί αδελφό taxon ενός κλάδου που συμπεριλαμβάνει όλες τις άλλες εξελικτικές γραμμές, οι οποίες αντιστοιχούν σε τρία διαφορετικά είδη: το *A. fragilis*, το *A. colchica* και το *A. graeca*, του οποίου η εξάπλωση εμφανίζεται μερικώς συμπάτρια με αυτήν του *A. cephallonica*.

Το κεφαλονίτικο κονάκι συνήθως συναντάται κάτω από πέτρες, κούτσουρα ή φύλλα. Απαντά σε υγρές περιοχές, σε λιβάδια, θαμνότοπους, ανοικτά δάση, δενδροστοιχίες, κοντά σε ρεύματα, όπως επίσης και σε αγροτικές περιοχές. Κινείται αργά και κρύβεται μόλις αντιληφθεί κάποια ανεπιθύμητη παρουσία. Το σώμα του είναι κυλινδρικό με λείο και γυαλιστερό δέρμα. Το χειμώνα πέφτει σε χειμέρια νάρκη μέσα σε στοές του εδάφους. Τρέφεται με γαστερόποδα και σκουλήκια. Δεν επιδίδεται σε έντονη δραστηριότητα, ιδιαίτερα σε ακραίες θερμοκρασίες. Στον κατάλογο της ερπετοπανίδας της Κεφαλονιάς και της Ζακύνθου, ο Wilson (2006) αναφέρει χαρακτηριστικά ότι παρά τη δυνατότητα που είχε να παρατηρήσει το είδος και στα δύο νησιά, όλα βρέθηκαν νεκρά στο δρόμο. Γενικότερα, αναφέρει ότι το είδος είναι κρυπτικό και πολύ δύσκολα εντοπιζόμενο, ιδιαίτερα σε ζεστές περιόδους. Και τα τρία άτομα που παρατηρήθηκαν στην Κεφαλονιά βρέθηκαν μετά από μια πολύ βροχερή νύχτα χωρίς το απόγευμα της επομένης. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και στη Ζάκυνθο, όπου βρέθηκαν δύο νεκρά ενήλικα άτομα.

2. Περιοχή μελέτης: Πελοπόννησος και Ιόνιο Πέλαγος

2.1 Γεωγραφία

Η περιοχή μελέτης συμπίπτει με το νότιο άκρο της Βαλκανικής Χερσονήσου. Πρόκειται για το γεωγραφικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου και για τα γειτονικά με αυτό νησιά του Ιονίου Πελάγους, κυρίως την Κεφαλονιά. Σημειώνεται ότι στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν και δείγματα από την ευρύτερη ελληνική επικράτεια.

Η Πελοπόννησος, με έκταση 21.439 km², είναι η μεγαλύτερη και νοτιότερη χερσόνησος της ηπειρωτικής Ελλάδας. Η Πελοπόννησος σχηματίζει μεγάλους κόλπους που της δίνουν το χαρακτηριστικό σχήμα του πλατανόφυλλου. Είναι ορεινή περιοχή, αλλά σχηματίζει και πολλές πεδιάδες. Τα βουνά της Πελοποννήσου είναι συνέχεια των ορεινών όγκων της Στερεάς Ελλάδας και έχουν γενική κατεύθυνση από τα βορειοδυτικά προς τα νοτιοανατολικά. Το ψηλότερο βουνό της Πελοποννήσου είναι ο Ταΰγετος (2.407 m).

Το κύριο χαρακτηριστικό της μορφολογίας της Πελοποννήσου είναι οι μεγάλοι ορεινοί όγκοι. Οι ορεινοί όγκοι αποτελούν το 50% της συνολικής έκτασής της, ενώ μόνο το 20% αυτής είναι πεδινό και το 30% ημιορεινό (στοιχεία από τη Στρατηγική Μελέτη Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων Δυτικής Ελλάδας, Πελοποννήσου και Ιονίων Νήσων).

Το κλίμα της Πελοποννήσου είναι γενικά μεσογειακό. Στο δυτικό τμήμα της και ιδιαίτερα στις παράλιες περιοχές επικρατεί ο μεσογειακός τύπος, ενώ στο κεντρικό ορεινό συγκρότημα το κλίμα είναι ηπειρωτικό. Τα δυτικά τμήματα έχουν πολύ περισσότερες βροχές και θερμότερα καλοκαίρια, ενώ το ανατολικό τμήμα έχει χερσαίο μεσογειακό τύπο κλίματος με λίγες βροχές και φτωχή βλάστηση. Η μέση θερμοκρασία στην Πελοπόννησο κυμαίνεται γύρω από την τιμή των 18,7 βαθμών Κελσίου (Φαρμακάκη 2012).

Η μεγάλη γεωμορφολογική ποικιλία συνέβαλλε στη δημιουργία μιας εξαιρετικά πλούσιας χλωρίδας, αλλά και πανίδας, καθώς και υψηλού ενδημισμού. Χαρακτηριστικό είναι ότι η Πελοπόννησος μαζί με την Κρήτη αποτελούν ένα από τα 20 θερμά σημεία βιοποικιλότητας της Μεσογείου της Conservation International (www.conservation.org). Τα βουνά της Πελοποννήσου έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί αποτέλεσαν καταφύγιο για πολλά είδη κατά την τελευταία παγετώδη περίοδο και εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ενδημισμού.

Η Κεφαλονιά είναι το μεγαλύτερο και πιο ορεινό νησί των Επτανήσων. Βρίσκεται απέναντι από την είσοδο του Πατραϊκού Κόλπου, βόρεια της Ζακύνθου, νότια της Λευκάδας και δυτικά της Ιθάκης. Το νησί έχει έκταση περίπου 781km² και μεγάλο μέρος του καταλαμβάνει η οροσειρά Αίνος. Η υψηλότερη κορυφή της οροσειράς βρίσκεται στα 1.628m (Μέγας Σωρός), ενώ σημαντικότερες πεδιάδες είναι αυτές της Κραναίας, της Παλικής, του Αρακλείου και της Σάμης.

2.2 Παλαιογεωγραφία

Πριν 70-18 εκατομμύρια χρόνια (Ύστερο Κρητιδικό – Μέσο Μειόκαινο), ανυψώθηκε τμηματικά η Αιγής. Η Αιγής ήταν μια ενιαία στεριά, η οποία περιλάμβανε τη σημερινή νότια Βαλκανική χερσόνησο, την περιοχή του Αιγαίου πελάγους και τη δυτική Μικρά Ασία και εκτεινόταν από την Αδριατική θάλασσα ως και νότια της Κρήτης. Κατά την περίοδο του ύστερου Μειοκαίνου, η θάλασσα άρχισε να εισχωρεί στον χώρο μεταξύ της σημερινής Κρήτης και της περιοχής Κάσου - Καρπάθου προς τον βορρά, εξαιτίας της βύθισης της ελληνικής ζώνης (Le Pichon & Angelier 1981, Meulenkamp *et al.* 1985) (Εικόνα 5). Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε μέχρι τα τέλη του Μειοκαίνου και τις αρχές του Πλειοκαίνου.



Εικόνα 5. Η πρώτη διαμόρφωση της ξηράς του ελλαδικού χώρου (τροποποίηση από Meulenkamp *et al.* 1985)

Στο τέλος του Μειοκαίνου, τα στενά του Γιβραλτάρ έκλεισαν, εξαιτίας μιας τεκτονικής ανύψωσης στα πλαίσια της μακροχρόνης διαδικασίας σύγκρουσης της Αφρικανικής πλάκας με την Ευρασιατική. Αυτό το κλείσιμο, σε συνδυασμό με κλιματικά γεγονότα, προκάλεσε την ονομαζόμενη κρίση αλατότητας της Μεσογείου (Hsü *et al.* 1977). Αυτό το γεωλογικό γεγονός, περίπου πριν από 5.5 εκατομμύρια χρόνια, επηρέασε την εξελικτική και βιογεωγραφική ιστορία πολλών οργανισμών της περιοχής γύρω από τη Μεσόγειο. Επίσης την ίδια περίοδο, η Απούλια μικροπλάκα συγκρούστηκε με την πλάκα της Ανατολίας, η οποία άρχισε να κινείται προς τα δυτικά (Doglioni *et al.* 2002). Με τη σειρά της, η πλάκα της Ανατολίας άρχισε να ωθεί την αιγαιακή μικροπλάκα, η οποία περιλαμβάνει την κεντρική Ελλάδα, την Πελοπόννησο και το αρχιπέλαγος του Αιγαίου, προς τα νοτιοδυτικά.

Αποτέλεσμα της νοτιοδυτικής κίνησης της αιγαιακής πλάκας είναι η σύγκρουσή της με την αφρικανική, η οποία κινείται προς τα βόρεια και βυθίζεται κάτω από την αιγαιακή. Προϊόν της σύγκρουσης αυτής είναι η δημιουργία του ελληνικού γεωτεκτονικού τόξου, το οποίο αποτελείται από τέσσερις παράλληλες φυσιογραφικές ενότητες (Λυκούσης κ.ά. 1994). Η νοτιότερη ενότητα είναι η ελληνική τάφρος, που εκτείνεται από το νοτιοδυτικό

άκρο της Κεφαλονιάς, περιβάλλει το νοτιοδυτικό άκρο της Πελοποννήσου και φθάνει μέχρι νότια της κεντρικής Κρήτης, ενώ στη βορειοδυτική της απόληξη τέμνεται από το ρηγματογενές μέτωπο Κεφαλονιάς-Λευκάδας. Βασικό στοιχείο αυτής της ενότητας είναι η ύπαρξη του δεξιόστροφου ρήγματος μετασχηματισμού της Κεφαλονιάς. Σ' αυτό το βορειοδυτικό τμήμα του ελληνικού τόξου παρατηρείται δυτική-βορειοδυτική μετακίνηση. Το ρήγμα αυτό διαχωρίζει τα νησιά που βρίσκονται στο νότιο Ιόνιο και την Πελοπόννησο από τα νησιά του βόρειου Ιονίου τα οποία παρουσιάζουν ασήμαντη κίνηση σε σχέση με την Ευρώπη.

Η έναρξη του Πλειοκαίνου σηματοδοτείται από την αποκατάσταση των θαλάσσιων συνθηκών σε ολόκληρη τη Μεσόγειο. Στο Πλειστόκαινο, οι βασικές αιτίες αλλαγής της γεωγραφίας της περιοχής εκτός του τεκτονισμού ήταν και ο ευστατισμός. Οι ευστατικές κινήσεις, που ήταν αποτέλεσμα των παγετωδών και μεσοπαγετωδών περιόδων, προκαλούσαν επέκταση ή συρρίκνωση των χερσαίων περιοχών και μεταβολή των μεταξύ τους χερσαίων συνδέσεων. Οκτώ τέτοιοι κύκλοι παρατηρήθηκαν σε όλη τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου (Beard *et al.* 1982). Η περίοδος των τελευταίων 150.000 χρόνων αποτελείται από δύο παγετώδεις και δύο μεσοπαγετώδεις περιόδους. Η τελευταία παγετώδης περίοδος, το Βούρμιο, έληξε πριν 18.000 χρόνια. Η μεσοπαγετώδης περίοδος που διανύουμε ταυτίζεται με το Ολόκαινο και καλύπτει τα τελευταία 10.000 χρόνια.

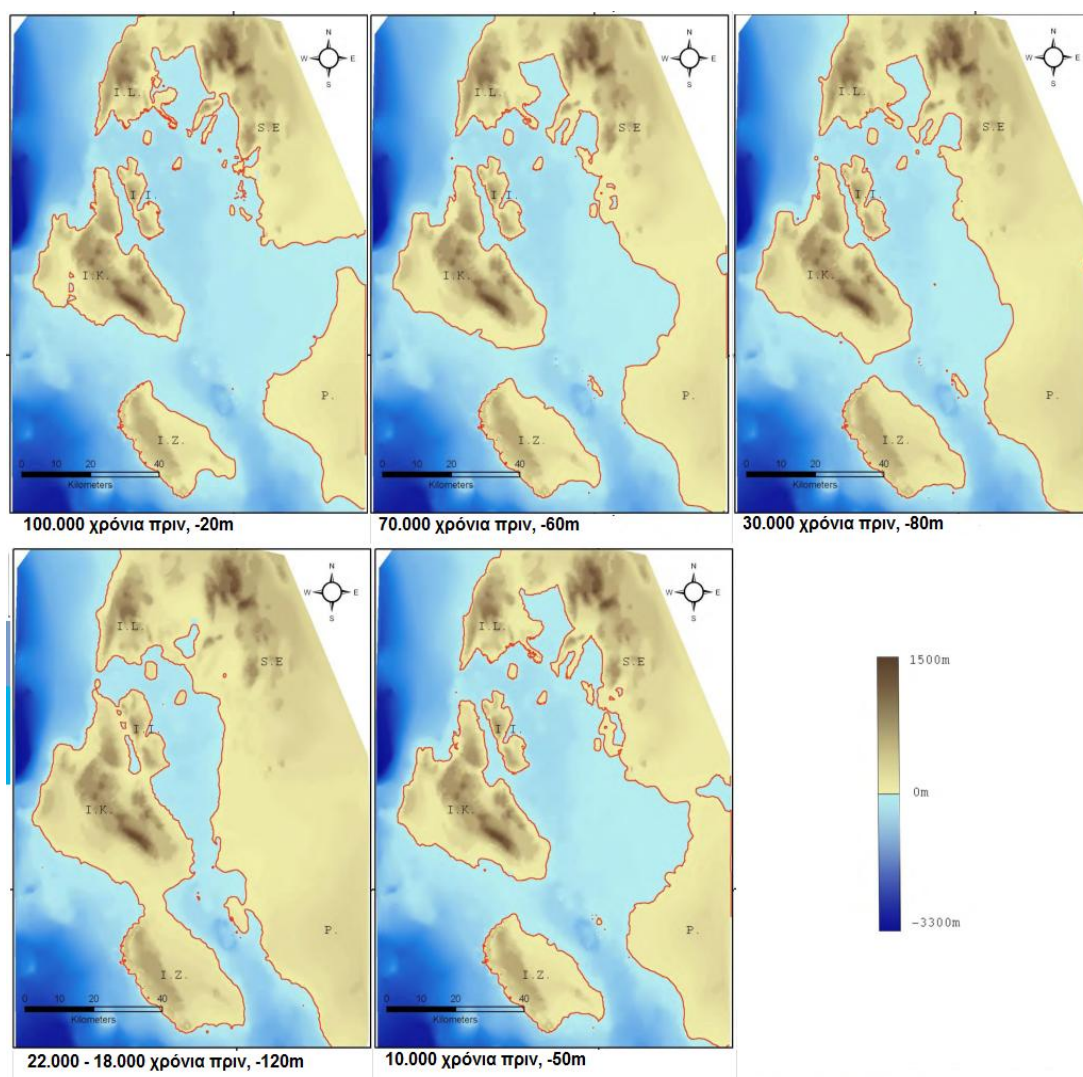
Στο Αιγαίο και το Ιόνιο Πέλαγος δεν υπάρχουν δεδομένα χρονολόγησης ^{14}C που να καθορίζουν τις προηγούμενες θέσεις της στάθμης της θάλασσας. Η κύρια πηγή δεδομένων για τις παρελθοντικές αλλαγές της στάθμης της θάλασσας προέρχεται από γεωλογικά και αρχαιολογικά στοιχεία. Τα στοιχεία αυτά, παρότι πολυάριθμα, είναι ακριβή μόνο για τα τελευταία 4.000 χρόνια (Perissoratis & Conispoliatis 2003).

Η καμπύλη θαλάσσιας στάθμης Lambeck (Lambeck 1996) λαμβάνει υπόψη, εκτός των παγκόσμιων δεδομένων για τη θαλάσσια στάθμη, την ισοστατική μετατόπιση της λιθόσφαιρας και έχει σχεδιαστεί για τον ελληνικό χώρο. Η καμπύλη μας δείχνει τις μεταβολές της στάθμης της θάλασσας για τα τελευταία 150.000 χρόνια. Σύμφωνα με αυτήν την καμπύλη, μπορεί να

απεικονισθεί η διαφορετική γεωγραφία που προκύπτει από το καθεστώς της θαλάσσιας στάθμης μεταξύ της Δυτικής Πελοποννήσου και του Ιονίου για τα τελευταία 100.000 χρόνια.

Πιο συγκεκριμένα (Εικόνα 6) (Χρονόπουλος 2010), πριν από 100.000 έως και 60.000 χρόνια η στάθμη της θάλασσας θεωρείται πως ήταν από 20 έως 60 m χαμηλότερη από τη σημερινή. Η Λευκάδα ήταν ενωμένη με την ηπειρωτική Ελλάδα, ενώ η Κεφαλονιά, η Ιθάκη και η Ζάκυνθος ήταν νησιά. Οι αποστάσεις μεταξύ της ηπειρωτικής Ελλάδας και των νησιών ήταν σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τις σημερινές. Επίσης, η Πελοπόννησος ήταν ενωμένη με την ηπειρωτική Ελλάδα. Πριν από 30.000 χρόνια η στάθμη ήταν μειωμένη κατά 80 m. Η Κεφαλονιά, η Ζάκυνθος και η Ιθάκη εξακολουθούσαν να είναι νησιά αλλά οι αποστάσεις μεταξύ τους και από την ηπειρωτική Ελλάδα ήταν πολύ μικρότερες. Πριν από 22.000 έως 18.000 χρόνια, η στάθμη της θάλασσας ήταν 120m χαμηλότερα από τη σημερινή. Τα νησιά Κεφαλονιά, Ιθάκη και Ζάκυνθος ήταν ενωμένα μεταξύ τους και αποτελούσαν ένα νησί. Η Λευκάδα αποτελούσε μέρος της ηπειρωτικής Ελλάδας, καθώς η Πελοπόννησος, η Στερεά Ελλάδα και η Λευκάδα ήταν ενωμένες. Οι αποστάσεις μεταξύ της νησιωτικής και ηπειρωτικής Ελλάδας ήταν πολύ μικρές. Πριν από 10.000 χρόνια, η στάθμη της θάλασσας ήταν 50 m χαμηλότερη από τη σημερινή. Η Λευκάδα ήταν ακόμα ενωμένη με τη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο, ενώ η Κεφαλονιά, η Ζάκυνθος και η Ιθάκη ήταν τρία χωριστά νησιά.

Η γεωγραφία της περιοχής πήρε σχεδόν τη σημερινή της μορφή, με τη Λευκάδα όμως να είναι ενωμένη με τη Στερεά Ελλάδα, πριν από 8.000 χρόνια. Η στάθμη της θάλασσας θεωρείται ότι ήταν 20 m χαμηλότερη από τη σημερινή, ενώ τότε φαίνεται πως άρχισαν να εμφανίζονται και άλλα νησιά. Παράλληλα, άρχισε να γίνεται αισθητή η μορφολογική διαφοροποίηση σε όλη την ηπειρωτική περιοχή. Η Κεφαλονιά, η Ζάκυνθος και η Ιθάκη εξακολουθούσαν να αποτελούν νησιά.



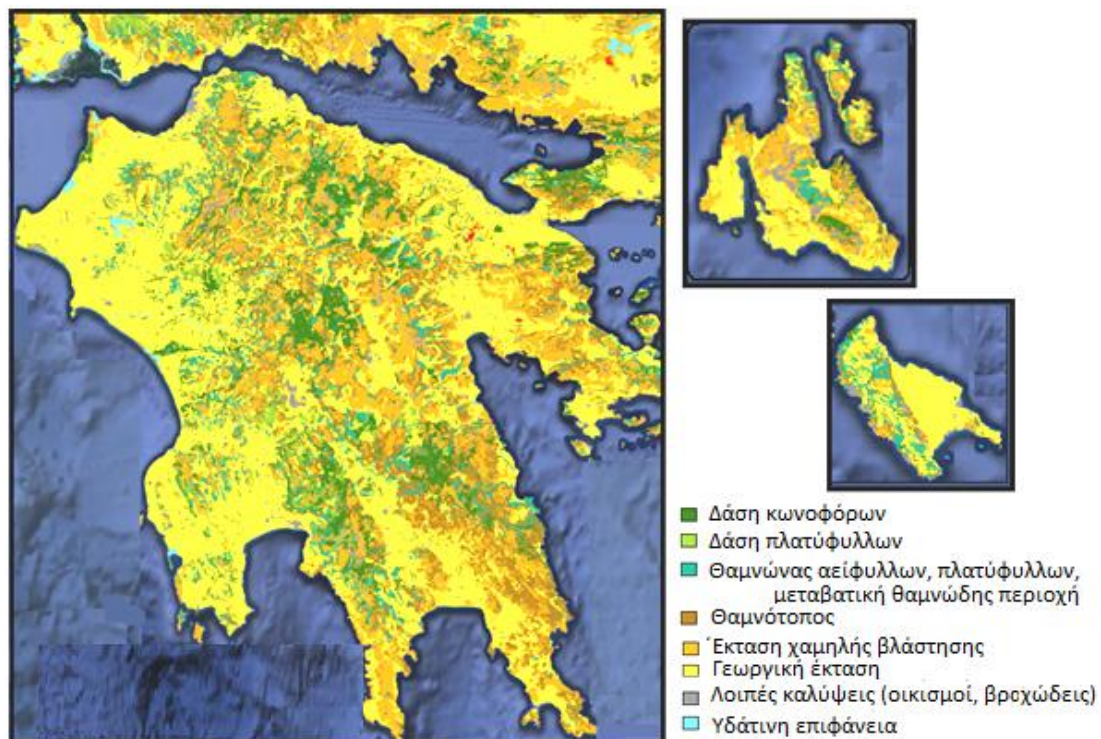
Εικόνα 6. Η περιοχή της βορειοδυτικής Πελοποννήσου και των νησιών του Ιονίου σε διαφορετικές φάσεις, κατά την περίοδο από 100.000 έως 10.000 χρόνια πριν (τροποποίηση από Χρονόπουλος, 2010)

2.3 Τύποι οικοσυστημάτων

Η βλάστηση της Πελοποννήσου χαρακτηρίζεται κυρίως από γεωργικές εκτάσεις στα πεδινά. Με υψομετρική σειρά από τα πεδινά προς τα ορεινά, η βλάστηση που συναντά κανείς μπορεί να περιγραφεί ως εξής (Τσαγκάρη & Καρέτσος 2010) (Εικόνα 7): φρύγανα, με κυρίαρχα είδη τα *Spartium junceum*, *Astragalus* sp., *Sarcopoterium spinosum* και *Asparangus acutifolius*, μακκία βλάστηση με κυρίαρχα είδη τα *Quercus coccifera*, *Brachypodium* sp., *Phillyrea latifolia*, *Cistus creticus*, φυλλοβόλα δάση, με κυρίαρχο είδος το *Quercus frainetto*,

μικτά δάση, πευκοδάση και ελατοδάση, με κυρίαρχα τα *Abies cephalonica* και *Pinus nigra* και αλπική βλάστηση με κυρίαρχα είδη τα *Juniperus communis*, *Astragalus* sp. και *Calycotome* sp..

Στα νησιά του Ιονίου εμφανίζεται η ευμεσογειακή ζώνη βλάστησης (Εικόνα 7). Στη ζώνη αυτή απαντώνται ιδιαίτερα αναπτυγμένες σκληρόφυλλες – αείφυλλες διαπλάσεις. Η θαμνώδης βλάστηση εκτείνεται σε όλα τα νησιά και αποτελεί τον κύριο τύπο βλάστησης. Στην Κεφαλονιά, η βλάστηση αποτελείται κυρίως από αείφυλλα πλατύφυλλα με κυρίαρχα είδη το πουρνάρι (*Quercus coccifera*), το σχίνο (*Pistacia lentiscus*) και την κουμαριά (*Arbutus unedo*). Στα μεγαλύτερα υψόμετρα μέχρι την κορυφή, υπάρχουν βραχώδη χορτολίβαδα με αραιές εμφανίσεις ατόμων *Quercus coccifera*. Επίσης, χαρακτηριστικό του όρους Αίνος είναι το πυκνό δάσος κεφαλληνιακής ελάτης (*Abies cephalonica*), το οποίο κυριαρχεί στα μεγαλύτερα υψόμετρα. Το δάσος ελάτης του Αίνου είναι το μοναδικό δάσος ελάτης στην περιοχή των νησιών του Ιονίου Πελάγους.



Εικόνα 7. Καλύψεις γης στην περιοχή μελέτης (Τροποποίηση από www.oikoskopio.gr)

3. Η φυλογεωγραφία ως ερευνητικό πεδίο

3.1 Η φυλογεωγραφία στη μελέτη της εξέλιξης

Η φυλογεωγραφία είναι εκείνο το ερευνητικό πεδίο που ως αντικείμενο έχει τις αρχές και τις διαδικασίες που καθορίζουν τα γεωγραφικά πρότυπα των γενεαλογικών γραμμών σε ενδοειδικό επίπεδο ή μεταξύ συγγενικών ειδών (Avisé *et al.* 1987). Το τελικό ζητούμενο είναι η γεωγραφική αποτύπωση, η εξελικτική προέλευση και η βιογεωγραφική ιστορία των μελετώμενων πληθυσμών, υποειδών ή ειδών (Hewitt 2001). Με άλλα λόγια, ο χώρος και ο χρόνος είναι δύο άξονες, στο επίπεδο των οποίων αντανακλούν, υπό συνθήκες, οι συγκεκριμένες γενεαλογίες των γονιδίων ή των ειδών. Η ανάλυση και η ερμηνεία των εξαπλώσεων αυτών των γενεαλογικών γραμμών συνήθως απαιτεί ευρέα δεδομένα (ηθολογία, δημογραφία, ιστορική γεωγραφία, παλαιοντολογία κ.λπ.) (Avisé 2000).

Ο όρος φυλογεωγραφία αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Avisé και τους συνεργάτες του το 1987, προκειμένου να ενοποιηθούν τα επιστημονικά πεδία της φυλογένεσης και της γενετικής πληθυσμών. Ο ορισμός που δίνει ο Avisé το 2000 για τη φυλογεωγραφία είναι ότι πρόκειται για τον επιστημονικό κλάδο της βιογεωγραφίας που επιχειρεί να μελετήσει και να ερμηνεύσει τη σύγχρονη γεωγραφική εξάπλωση ποικίλων εξελικτικών γραμμών οργανισμών και τον τρόπο που οι ιστορικές διαδικασίες έχουν επηρεάσει την εξάπλωση και την ανάπτυξη των οργανισμών.

Στη φυλογεωγραφία, έχουν αναπτυχθεί πολλά διαφορετικά αναλυτικά εργαλεία, έτσι ώστε να μπορούν να διερευνηθούν οι ιστορικές αλλαγές που συντελούνται στο φυσικό περιβάλλον των πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τη σημερινή γενετική τους πληροφορία (Beheregaray 2008). Για αυτούς τους λόγους, η φυλογεωγραφία έχει συνεισφέρει σημαντικά σε πολλά πεδία της βιολογίας και των γεωεπιστημών.

3.2 Η συμβολή της μοριακής βιολογίας στη φυλεογεωγραφία

Η συμβολή της μοριακής βιολογίας στην προσπάθεια της αποκάλυψης της εξελικτικής ιστορίας των ειδών είναι ένα από τα σημαντικότερα θέματα της Βιολογίας των Ειδών. Τα μακρομοριακά δεδομένα που βρίσκονται στη διάθεσή μας, εννοώντας τις γονιδιακές και πρωτεϊνικές αλληλουχίες, συσσωρεύονται με ταχύ ρυθμό. Για την εξελικτική βιολογία, αυτό είναι ένα μεγάλο πλεονέκτημα. Έως σχετικά πρόσφατα, η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών προσεγγιζόταν με βάση τις μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές των οργανισμών και την εξέταση απολιθωμάτων. Ωστόσο, οι φαινοτυπικοί χαρακτήρες δεν αντανακλούν πάντα επαρκώς την ιστορία πίσω από αυτούς, λόγω της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων που μπορεί να έχουν συντελέσει στη διαμόρφωσή τους. Ειδικά όσον αφορά στη βιοποικιλότητα σε ενδοειδικό επίπεδο, οι σχετικές μελέτες συνήθως περιορίζονταν στην ανάλυση μορφολογικών πολυμορφικών χαρακτήρων και στον καθορισμό υποειδών που καταλαμβάνουν διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Ο ορισμός του υποείδους το περιγράφει ως ένα ενδιάμεσο στάδιο στη διαδικασία γένεσης ενός νέου είδους. Εντούτοις, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη μορφολογία, είναι δύσκολη η σύνδεση αυτής της διαδικασίας με τον βαθμό γεωγραφικής συνύπαρξης ή τον βαθμό διαφοροποίησης (Graur & Li 2000).

Σύμφωνα με τους Graur & Li (2000), οι λόγοι για τους οποίους τα μοριακά δεδομένα είναι καταλληλότερα για εξελικτικές μελέτες σε σχέση με τα μορφολογικά είναι οι εξής: α) οι αλληλουχίες του DNA και των πρωτεϊνών είναι αυστηρά κληρονομούμενες οντότητες, κάτι που δεν ισχύει για πολλά χαρακτηριστικά της μορφολογίας, β) η περιγραφή των μοριακών δεδομένων δεν χαρακτηρίζεται από υποκειμενικούς όρους, γ) η εξέλιξη στο επίπεδο των μορίων χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη κανονικότητα, δ) τα μοριακά δεδομένα ενδείκνυνται για ποσοτικές αναλύσεις, ε) η εξαγωγή των απόμορφων καταστάσεων των χαρακτήρων είναι ευκολότερη στα μοριακά δεδομένα, στ) τα μοριακά δεδομένα επιτρέπουν τη μελέτη μεταξύ αρκετά απομακρυσμένων εξελικτικά οργανισμών και ζ) τα μοριακά δεδομένα είναι πιο άφθονα.

Η εισαγωγή των μοριακών τεχνικών στο πεδίο της εξελικτικής βιολογίας, το έθεσε σε στερεότερες βάσεις, προσφέροντας την ευκαιρία επιβεβαίωσης, συμπλήρωσης και διόρθωσης θεωριών. Ωστόσο, η χρήση τέτοιων τεχνικών εμφανίζει και μια σειρά προβλημάτων, όπως η επιλογή κατάλληλων δεικτών, η ανεπαρκής ή μη αντιπροσωπευτική δειγματοληψία και η ομοπλασία ή ο κορεσμός (Philippe *et al.* 2011).

Τα πρότυπα στις μεθόδους ανάλυσης της μοριακής φυλογενετικής κάνουν κάποιες υποθέσεις εξ'ορισμού: α) η αλληλουχία είναι σωστή και προέρχεται από τη συγκεκριμένη πηγή, β) οι αλληλουχίες είναι ομόλογες, όλες προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο, γ) κάθε θέση σε μια ευθυγράμμιση αλληλουχιών είναι ομόλογη με κάθε αντίστοιχη της σε αυτήν, δ) η δειγματοληψία είναι κατάλληλη για να λυθεί το υπό μελέτη πρόβλημα, ε) η ποικιλομορφία των αλληλουχιών μεταξύ των δειγμάτων είναι αντιπροσωπευτική της ευρύτερης ομάδας και στ) η γενετική ποικιλομορφία παρέχει αρκετό φυλογενετικό σήμα για να λυθεί το υπό μελέτη πρόβλημα. Πρέπει, επιπλέον, να σημειωθεί ότι είναι μόνο σε συνδυασμό με μορφολογικά, φυσιολογικά, δημογραφικά, ηθολογικά, ιστορικά και οικολογικά δεδομένα, που η μοριακή φυλογενετική μπορεί να χτίσει βιολογικές ερμηνείες (Moritz & Hillis 1996).

3.2.1 Μοριακοί δείκτες

Το γονίδιο που θα επιλεγεί ως μοριακός δείκτης, στην περίπτωση σύγκρισης αλληλουχιών DNA, πρέπει να είναι πρακτικό και να περιέχει εύχρηστη πληροφορία. Επίσης, σημαντική είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ανάπτυξη και χρήση γενικευμένων μοριακών δεικτών, έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η σύγκριση αποτελεσμάτων σε ένα ευρύ φάσμα βιβλιογραφίας.

Για να είναι πρακτικό ένα γονίδιο ως γενετικός δείκτης, πρέπει να ικανοποιεί τρία βασικά κριτήρια: α) να διαθέτει σημαντική γενετική ποικιλότητα σε επίπεδο είδους, β) να διαθέτει συντηρημένες θέσεις για την ανάπτυξη καθολικών εκκινητών για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR

primers), με σκοπό την ευρεία ταξινόμική εφαρμογή και γ) να έχει σχετικό σύντομο μήκος αλληλουχίας, για εύκολη απομόνωση και πολλαπλασιασμό. Τα προηγούμενα χρόνια, ο αριθμός των επιστημονικών εργασιών που σχετίζονται με φυλογεωγραφικά θέματα αυξήθηκε εκθετικά, με την πλειονότητα να επικεντρώνεται σε μιτοχονδριακό γενετικό υλικό (Avisé 2000).

3.2.2 Το μιτοχονδριακό DNA ως εργαλείο

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) διαθέτει μια σειρά χαρακτηριστικών που το κάνουν πολύ χρήσιμο εργαλείο στην αναζήτηση και την παρουσίαση γενετικών διαφορών μεταξύ ειδών ή σε ενδοειδικό επίπεδο. Είναι γνωστό για τον τρόπο κληρονόμησής του από τη μητρική μόνο πλευρά, για τον ταχύ εξελικτικό ρυθμό (5 με 10 φορές ταχύτερος του πυρηνικού DNA) (Brown *et al.* 1979), την έλλειψη ιντρονίων, την απουσία ανασυνδυαστικών γεγονότων και την απλοειδία. Η γενετική δομή του είναι αρκετά απλή και καλά χαρακτηρισμένη σε όλο το μήκος του. Κάθε κύτταρο φέρει εκατοντάδες χιλιάδες αντίγραφα (Nass & Nass 1963).

Κάθε μόριο mtDNA είναι μια μικρή διπλή κυκλική αλυσίδα, που υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα στα μιτοχόνδρια. Το μέγεθός της κυμαίνεται μεταξύ 16.000 και 20.000 ζευγών βάσεων. Στα ζώα το μιτοχονδριακό DNA περιέχει 13 κωδικές περιοχές, δύο ριβοσωμικές, μία μη κωδική ρυθμιστική περιοχή και αρκετά σημεία για μεταγραφή tRNA. Κάθε μιτοχόνδριο φέρει αρκετά μόρια και κάθε κύτταρο φέρει αρκετά μιτοχόνδρια (1-1000). Έτσι, χρειάζεται ελάχιστο δείγμα ιστού για την εξαγωγή αρκετού γενετικού υλικού. Οι μιτοχονδριακοί δείκτες, ωστόσο, ίσως δεν παρέχουν πάντα μια συνολική οπτική της εξελικτικής ιστορίας. Σ' αυτή την περίπτωση, η χρήση αλληλουχιών πυρηνικών γονιδίων μπορεί να συμπληρώσει τα κενά (Felsenstein 2006).

3.3 Απεικόνιση της εξέλιξης

Η ιστορία της ζωής δεν μπορεί να ανασυσταθεί πλήρως, απλώς αφήνει στοιχεία στο παρόν. Αυτά τα ίχνη χρησιμοποιούνται για τη διατύπωση υποθέσεων. Στις φυλογενετικές μελέτες, ο πιο παραστατικός τρόπος οπτικής παρουσίασης των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των μελών μιας ομάδας οργανισμών είναι μέσω των φυλογενετικών δέντρων ή δενδρογραμμάτων (Page 2011). Ένα φυλογενετικό δέντρο περιέχει: ένα σύνολο εσωτερικών και εξωτερικών κόμβων, ο καθένας από τους οποίους αντιπροσωπεύει μια ταξινομική μονάδα (είδη, πληθυσμοί, άτομα), ένα σύνολο κλάδων, που ορίζουν τη σχέση μεταξύ των ταξινομικών μονάδων με όρους απογόνου και προγόνου. Μόνο ένας κλάδος μπορεί να συνδέει δύο γειτονικούς κόμβους. Το πρότυπο σύνδεσης των κλάδων ονομάζεται τοπολογία και το μήκος του κλάδου μπορεί να ποικίλει και να αντιπροσωπεύει τον αριθμό των αλλαγών που έχουν συμβεί σ' αυτόν. Τα φυλογενετικά δέντρα μπορούν να έχουν ή όχι ρίζα. Στα δέντρα που έχουν ρίζα, υπάρχει ένας ιδιαίτερος κόμβος, που αντιπροσωπεύει έναν κοινό πρόγονο, από τον οποίο ένα μοναδικό μονοπάτι οδηγεί σε κάθε άλλο κόμβο. Όταν δεν υπάρχει ρίζα, το δέντρο απλώς δείχνει τη σχέση μεταξύ των ειδών.

Οι κλαδιστικές ομαδοποιήσεις πρέπει να έχουν κάποια χαρακτηριστικά: όλα τα είδη σε μια ομαδοποίηση πρέπει να μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο και όλα τα είδη που προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην ίδια ομαδοποίηση, στο ίδιο taxon. Η εφαρμογή αυτών των προαπαιτούμενων καταλήγει στους ακόλουθους όρους που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τους διαφορετικούς τρόπους που μπορεί να συγκροτηθεί μια ομαδοποίηση. Μια μονοφυλετική ομάδα προκύπτει όταν όλα τα μέλη της μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο και όλα όσα έχουν αυτόν τον κοινό πρόγονο συμπεριλαμβάνονται σε αυτή. Μία παραφυλετική ομάδα περιέχει μέλη που μοιράζονται όλα έναν κοινό πρόγονο, αλλά δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτή όλα τα μέλη που προέρχονται από αυτόν. Μια πολυφυλετική ομάδα δεν πληροί κανένα από τα δύο αυτά κριτήρια. Μόνο το πρώτο πρότυπο είναι αποδεκτό στην κλαδιστική.

3.3.1 Η υπόθεση του μοριακού ρολογιού

Για την αξιολόγηση των δέντρων έχει εισαχθεί η Υπόθεση του Μοριακού Ωρολογίου (Molecular Clock Hypothesis) (Zuckerkandl & Pauling 1965), που υποστηρίζει ότι οι νουκλεοτιδικές ή η πρωτεϊνικές αντικαταστάσεις, συμβαίνουν με σταθερό ρυθμό, δηλαδή ο βαθμός διαφοροποίησης μεταξύ δύο αλληλουχιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσεγγισθεί ο χρόνος κατά τον οποίο διαφοροποιήθηκαν από τον κοινό τους πρόγονο. Προϋπόθεση είναι ότι σε κάθε ομάδα οργανισμών τα μέλη της προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο και ότι η διαφοροποίηση των χαρακτήρων συμβαίνει σταδιακά με τον χρόνο.

Εάν το μοριακό ρολόι υπάρχει και ο ρυθμός εξέλιξης ενός γονιδίου μπορεί να υπολογιστεί, τότε είναι πιθανή η χρονολόγηση άγνωστων χρονικά αποσχίσεων δύο γενεαλογικών γραμμών μέσω σύγκρισης των πρωτεϊνικών ή των νουκλεοτιδικών τους αλληλουχιών. Αντιστρόφως, εάν ο χρόνος απόκλισης δύο ειδών είναι γνωστός, τότε μπορεί να συναχθεί και ο ρυθμός μοριακής εξέλιξης ενός γονιδίου, ενώ δεν πρέπει να αμφισβητείται ότι η ανασύσταση μιας φυλογένεσης είναι ευκολότερη και πιο ακριβής λαμβάνοντας υπόψη το μοριακό ρολόι (Posada 2003). Ο προσδιορισμός αυτός στηρίζεται κατά κανόνα σε παλαιοντολογικά δεδομένα ή παλαιογεωγραφικά συμβάντα, τα οποία όμως συχνά είναι ελλιπή.

Η εφαρμογή ενός τοπικού ρολογιού, παρά τις όποιες ατέλειες, επιτρέπει τον συσχετισμό της φυλογενετικής και βιογεωγραφικής ιστορίας με την κλίμακα του χρόνου, παρέχοντας εξελικτική πληροφορία που σε άλλη περίπτωση θα έμενε ανεκμετάλλευτη. Συνεπώς, η χρονολόγηση των γεγονότων απόκλισης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο ελέγχου ανεξάρτητων βιογεωγραφικών (και παλαιογεωγραφικών) υποθέσεων και να βοηθήσει στην ερμηνεία των σημερινών κατανομών και στην κατανόηση των ιστορικών προτύπων εξάπλωσης.

Η υπόθεση του μοριακού ρολογιού έχει γίνει αντικείμενο έντονων αντιπαραθέσεων. Πολλοί εξελικτικοί βιολόγοι επιχειρηματολογούν εναντίον αυτής της υπόθεσης, επειδή η εισήγηση του σταθερού ρυθμού δεν φαίνεται να

ταιριάζει με τον ακανόνιστο ρυθμό εξέλιξης σε μορφολογικό και φυσιολογικό επίπεδο (π.χ. Kimura 1969). Αν και η θεωρία του σταθερού ρυθμού εξέλιξης αποτελεί ένα από τα πλέον αμφιλεγόμενα θέματα της μοριακής εξέλιξης, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στην εκτίμηση του χρόνου απόσχισης γενεαλογικών γραμμών, αλλά και στην κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.

3.4 Μέθοδοι ανάλυσης μοριακών δεδομένων

Η εξελικτική απόσταση νοείται ως ο αριθμός των αντικαταστάσεων ανά θέση που διαχωρίζει ένα ζεύγος ομόλογων αλληλουχιών από τότε που αυτές διαχωρίστηκαν από τον κοινό τους πρόγονο. Σήμερα η εκτίμησή της είναι από τα πρώτα βήματα στη φυλογενετική ανάλυση. Στη βιοπληροφορική, μια ομάδα ευθυγραμμισμένων ομόλογων αλληλουχιών είναι η βάση για την εξαγωγή βιολογικής πληροφορίας περί των λειτουργικών, δομικών ή εξελικτικών σχέσεων μεταξύ τους (Mount 2004). Ωστόσο, τα σύνθετα προβλήματα απαιτούν την ευθυγράμμιση επιμήκων, διαφορετικών και πολυάριθμων αλληλουχιών, κάτι που απαιτεί την ανάπτυξη διαφορετικών αλγορίθμων.

Στη φυλογενετική ανάλυση, η συμφωνία έγκειται στην παραδοχή της εξέλιξης του γενετικού υλικού και των πρωτεϊνών των οργανισμών με την πάροδο του χρόνου. Η διαφωνία έγκειται σε όλα τα άλλα προβλήματα που προκύπτουν από την παραδοχή αυτή. Αυτά αφορούν στον τρόπο και στον ρυθμό εξέλιξης και την κατάλληλη μέθοδο εκτίμησης και αναπαράστασης των εξελικτικών διεργασιών. Είναι σημαντικό να καταδείξουμε ότι δεν υπάρχει μία μέθοδος που να εγγυάται το ορθό αποτέλεσμα. Υπάρχουν πολυάριθμοι αλγόριθμοι, διαδικασίες και υπολογιστικά προγράμματα, ωστόσο η αξιοπιστία τους εξαρτάται πάντα από την περίπτωση, τον σκοπό, αλλά και τα ίδια τα δεδομένα.

Σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, η εκτίμηση της εξελικτικής ιστορίας διενεργείται μέσω της σύγκρισης μεταξύ ομόλογων μορίων DNA. Οι αλληλουχίες συγκρίνονται ανά νουκλεοτιδική θέση. Οι αποστάσεις μπορεί να αφορούν σε

κωδικές ή μη κωδικές αλληλουχίες και συνήθως μετρώνται λαμβάνοντας υπόψη τις νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αντικαταστάσεις. Η απλούστερη μέθοδος μέτρησης της διαφοροποίησης είναι ο υπολογισμός του ποσοστού των διαφορών ανά θέση (p-distance), στο σύνολο των θέσεων, μεταξύ δύο αλληλουχιών. Η μέθοδος αυτή δεν έχει μεγάλη βιολογική αξία. Πιο χρήσιμες είναι μέθοδοι που συνυπολογίζουν τις πολλαπλές αντικαταστάσεις στο ίδιο σημείο, τη διαφορά μεταξύ των νουκλεοτιδικών μεταπτώσεων και των μεταστροφών και άλλων παραμέτρων που μπορεί να επηρεάζουν τους ρυθμούς αντικατάσταση ή τους διαφορετικούς εξελικτικούς ρυθμούς στις διαφορετικές θέσεις (π.χ. Jukes & Cantor 1969, Kimura 1980, Tajima & Nei 1984). Τα μοντέλα εκτίμησης αποστάσεων βασίζονται στις ακόλουθες προϋποθέσεις: α) όλες οι νουκλεοτιδικές θέσεις μεταλλάσσονται ανεξάρτητα μεταξύ τους, β) ο ρυθμός αντικατάστασης είναι διαρκής σε όλες τις εξελικτικές γραμμές και γ) η νουκλεοτιδική συχνότητα είναι ισορροπημένη.

Υπάρχουν πολυάριθμες μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δέντρων από μοριακά δεδομένα (Nei & Kumar 2000). Ο προσδιορισμός ενός φυλογενετικού δέντρου είναι ένα στατιστικό πρόβλημα, η λύση του οποίου αποτελεί μόνο μια εκτίμηση του πραγματικού. Οι διάφορες μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: α) μέθοδοι γενετικών αποστάσεων και β) μέθοδοι διακριτών χαρακτήρων. Αυτές οι μέθοδοι επεξηγούνται σε πολλές εργασίες (Swofford *et al.* 1996, Saitu 1996, Nei & Kumar 2000).

Στην πρώτη κατηγορία υπολογίζεται η γενετική απόσταση για όλα τα ζεύγη των ταξινομικών μονάδων τα οποία μελετώνται και με τη βοήθεια αλγορίθμων, οι οποίοι βασίζονται στις σχέσεις των τιμών των γενετικών αυτών αποστάσεων, κατασκευάζεται το αντίστοιχο φυλογενετικό δέντρο. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι μέθοδοι UPGMA, Minimum Evolution και Neighbor-Joining. Γενικότερα, οι μέθοδοι αποστάσεων κατασκευάζουν δέντρα με βάση τη συνολική ομοιότητα, ωστόσο η εμφανής συνολική ομοιότητα και η εξελικτική σχέση δεν είναι απαραίτητα το ίδιο πράγμα.

Στη δεύτερη κατηγορία χρησιμοποιούνται δεδομένα με διαφορετικές καταστάσεις χαρακτήρων, π.χ. στις νουκλεοτιδικές ακολουθίες κάθε

νουκλεοτίδιο είναι μία κατάσταση του χαρακτήρα νουκλεοτίδιο. Το φυλογενετικό δέντρο προκύπτει από την εξέταση των εξελικτικών σχέσεων των ακολουθιών του DNA σε κάθε νουκλεοτιδική θέση. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι μέθοδοι: μέγιστη φειδωλότητα (Maximum Parsimony), μέγιστη πιθανοφάνεια (Maximum Likelihood) και μπεϋσιανή συμπερασματολογία (Bayesian Inference).

Η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου με βάση τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας (Felsenstein 1981), βασίζεται αρχικά στη δημιουργία υποτιθέμενων δέντρων και επιλέγεται το μέγεθος των κλάδων από το οποίο μεγιστοποιείται η πιθανότητα τα μοριακά δεδομένα να δίνουν ένα τέτοιο δέντρο. Το σύνολο όλων αυτών των πιθανοτήτων τελικά συγκρίνεται για όλα τα πιθανά δέντρα και το δέντρο με την μεγαλύτερη πιθανότητα θεωρείται ως η καλύτερη εκτίμηση. Επειδή ο αριθμός των πιθανών δέντρων αυξάνεται πολύ με την αύξηση των εξεταζόμενων ειδών, η χρήση της μεθόδου αυτής είναι χρονοβόρος.

Η μέθοδος μπεϋσιανής συμπερασματολογίας (Box & Tiao 1973) είναι μια στατιστική εξαγωγή συμπεράσματος, στην οποία τα στοιχεία ή οι παρατηρήσεις χρησιμοποιούνται για την ενημέρωση ή την εκ νέου εξαγωγή συμπεράσματος για την πιθανότητα ότι μια προηγούμενη υπόθεση μπορεί να είναι αληθινή. Το όνομα προέρχεται από την συχνή χρήση του Θεωρήματος του Bayes στην διαδικασία εξαγωγής συμπεράσματος.

Οι περιορισμοί που τίθενται στις διάφορες μεθόδους κατασκευής φυλογενετικών δέντρων οδηγεί αναπόφευκτα σε ερωτήματα σχετικά με την αξιοπιστία τους. Η μέθοδος στατιστικού ελέγχου που χρησιμοποιείται συνηθέστερα είναι η ανάλυση Bootstrap (Brown & Newey 2002). Αυτή η μέθοδος, μιμούμενη τις επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες, συνιστά πολλά ψευδοδείγματα από τα υπάρχοντα δεδομένα εκ των οποίων υπολογίζεται εκ νέου η ζητούμενη παράμετρος, η οποία είναι οι συνδέσεις των αλληλουχιών στο δέντρο.

3.5 Εφαρμοσμένη φυλογεωγραφία στη διαχείριση περιβάλλοντος

Το πεδίο της φυλογεωγραφίας, μεταξύ άλλων, στοχεύει στην ερμηνεία των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τις φυλογενετικές σχέσεις και κατανομές διαφόρων ειδών (όχι στενά συγγενικών). Για παράδειγμα, η σύγκριση διαφόρων ταξινομικών ομάδων μπορεί να διαλευκάνει τις ιστορίες των βιογεωγραφικών περιοχών. Πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι η βελτίωση της γνώσης μας για τον τρόπο με τον οποίο διάφορα ιστορικά γεγονότα έχουν επηρεάσει άμεσα την εξέλιξη των πληθυσμών και των ειδών. Επίσης, η αναγνώριση κοινών γραμμών στην ιστορία πολλών ταξινομικών ομάδων είναι πολύ σημαντική στη Διαχειριστική Βιολογία, αφού ο προσδιορισμός γεωγραφικών περιοχών που έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εξελικτική ιστορία διαφόρων οργανισμών μπορεί να ωθήσει στην αποτελεσματικότερη προστασία τους, μέσα από την προστασία του υψηλής αξίας ενδιαιτήματος.

Μέχρι πρόσφατα, τα κριτήρια για τον ορισμό περιοχών διαχείρισης ήταν το μέγεθος των κινδύνων, ο αριθμός των ειδών και ο ενδημισμός (Brooks *et al.*, 2002, Lamoreux *et al.* 2006). Με τη συγκριτική φυλογεωγραφία, ωστόσο, γνωρίζοντας «πού» και «πώς» διαδραματίστηκαν σημαντικά εξελικτικά γεγονότα, είμαστε σε θέση να προστατεύσουμε όχι μόνο την ίδια τη βιοποικιλότητα, αλλά και τις διεργασίες που τη δημιουργούν (Moritz & Faith 1998). Ένα από τα πρώτα και πιο γνωστά παραδείγματα συγκριτικής φυλογεωγραφίας είναι η εργασία του Avise το 1992.

Συνοψίζοντας, η συγκριτική φυλογεωγραφία αποκαλύπτει την επίδραση των ιστορικών παραγόντων στα πρότυπα της βιοποικιλότητας που παρατηρούμε σήμερα. Ακολουθώντας την ίδια λογική, οι φυλογεωγράφοι μπορούν να «προβλέψουν» αλλαγές στη γεωγραφική εξάπλωση ειδών, όπως αυτές μπορεί να προκύψουν από ενδεχόμενες μελλοντικές αλλαγές.

B. Υλικά και Μέθοδοι

4. Το υλικό της μελέτης

4.1 Επιλογή δειγμάτων

Συνολικά στις τελικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν 22 νέα δείγματα, εκ των οποίων τα περισσότερα ανήκουν σε ιδιωτική συλλογή του Δρ. Παναγιώτη Κορνήλιου, ενώ κάποια από αυτά συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Τα ονόματα των συλλεκτών αναλυτικά αναφέρονται στον Πίνακα 2. Όλα τα δείγματα, μετά τη θανάτωσή τους με ψύξη, φυλάχθηκαν σε αιθανόλη 95%. Η επιλογή των δειγμάτων καλύπτει ένα εκτεταμένο δίκτυο πληθυσμών από σημεία της Πελοποννήσου, της Κεφαλονιάς και της δυτικής Στερεάς Ελλάδας. Η επιλογή αυτή έγινε, έτσι ώστε να καλύπτεται τόσο η περιοχή που εντοπίζεται η εξάπλωση του *A. cephallonica*, όσο και η περιοχή συμπάτριας εξάπλωσης των ειδών *A. cephallonica* και *A. graeca*.

Στις φυλογενετικές αναλύσεις συμπεριλήφθηκαν και ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από την Ελλάδα και τη Νότια Αλβανία και έχουν αναγνωρισθεί ως *A. cephallonica*, *A. graeca* και *A. fragilis*. Οι αλληλουχίες αυτές ανακτήθηκαν από το διαδίκτυο (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), από τη βάση δεδομένων του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικής Πληροφορίας των ΗΠΑ (NCBI: National Center of Biotechnology Information) και αφορούν στην ερευνητική εργασία των Gvoždík *et al.* του 2010.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα δείγματα εκ των οποίων νουκλεοτιδικές αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν στις τελικές αναλύσεις, μαζί με την περιοχή συλλογής τους. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται και ένα δείγμα αναγνωρισμένο ως *Pseudopus apodus*, που χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα, το οποίο ανακτήθηκε από την ίδια διαδικτυακή πηγή και σημειώνεται στο τέλος του κατλόγου. Στην Εικόνα 8, που ακολουθεί τον Πίνακα 2, φαίνονται σημειωμένες στον χάρτη οι τοποθεσίες προέλευσης όλων των δειγμάτων *Anguis* που συμπεριλήφθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις.

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός κατάλογος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις

		Περιοχή συλλογής	Ημερομηνία συλλογής	Συλλέκτης	Είδος
1	AV01	Δυρράχι προς Λεοντάρι (Ν. Αργολίδας)	9.5.2009	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
2	AV02	Αγ. Βασίλειος Πατρών (Ν. Αχαΐας)	5.9.2011	Κορνήλιος Π.	<i>A. graeca</i>
3	AV05	Λίμνη Κρεμαστών	28.5.2010	Κορνήλιος Π.	<i>A. graeca</i>
4	AV06	Μαίναλο (ρυάκι Λαγκάδια προς Ελάτη- Ν.Αρκαδίας)	24.5.2008	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
5	AV09	Τριπόταμα (Ν. Αχαΐας)	14.11.2009	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
6	AV10	6 χλμ. πριν την Εθνική οδό από Σελλά προς Ζήρια (Ν. Αχαΐας)	12.4.2009	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
7	AV11	1,5 χλμ. πριν Λάγια	24.3.2012	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
8	AV12	2 χλμ. μετά τη Ναύπακτο – Αρχαιολογικός χώρος Βελβίνας (από Αντίρριο προς Θέρμο- Ν. Ευρυτανίας)	7.6.2008	Κορνήλιος Π.	<i>A. graeca</i>
9	AV13	Ροδιά- Ν.Μεσσηνίας	13.4.2010	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
10	AV14	Λεοντάρι – Ταΰγετος	30.10.2009	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
11	AV15	Ταΰγετος από καταφύγιο προς Δυρράχι	29.10.2009	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
12	AV16	Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου -Ν. Αρκαδίας)	24.5.2008	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
13	AV18	Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου- Ν. Αρκαδίας)	24.5.2008	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
14	AV19	Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου- Ν. Αρκαδίας)	24.5.2008	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
15	AV20	Μαίναλο- Βαλτεσίτικο (Ν. Αρκαδίας)	5.6.2011	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
16	AV21	Εκκλησία Παναγιά από Ελάτη προς Πυργάκι. (Ν.Αρκαδίας)	5.6.2011	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>

17	AV22	Από Μύλο προς Τρίπολη, 5χλμ πριν τον Αχλαδόκαμπο (Ν. Λακωνίας)	5.5.2010	Κορνήλιος Π.	<i>A. cephalonica</i>
18	AV23	Λίμνη Δόξα	3.11.2012	Κορνήλιος Π.	<i>A. graeca</i>
19	AV24	Λίμνη Δόξα	3.11.2012	Κορνήλιος Π.	<i>A. graeca</i>
20	AV25	Αίνος, στρατιωτικά ραντάρ, επαρχιακός δρόμος προς Φορέα Διαχείρισης Αίνου	20.04.2013	Βούλγαρη – Κόκοτα Α.	<i>A. cephalonica</i>
21	AV26	Λίμνη Άβυθος (Επαρχιακή Οδός Γκριζάτα - Μουζακάτων), Κεφαλονιά	27.04.2013	Μεττούρης Ο.	<i>A. cephalonica</i>
22	AV27	Λίμνη Άβυθος (Επαρχιακή Οδός Γκριζάτα - Μουζακάτων), Κεφαλονιά	27.04.2013	Μεττούρης Ο.	<i>A. cephalonica</i>
Ανακτημένες αλληλουχίες από http://blast.ncbi.nlm.nih.gov (Gvozđík <i>et al.</i> , 2010)					
23	FJ666557	Μεσοροπή Καβάλας			<i>A. fragilis</i>
24	FJ666558	Μεγάλο Λιβάδι Δράμας			<i>A. fragilis</i>
25	FJ666560	Ποταμός Μόρνος, Αιτωλοακαρνανία			<i>A. graeca</i>
26	FJ666561	Περτούλι Τρικάλων			<i>A. graeca</i>
27	FJ666562	Στόμιο Λάρισας			<i>A. graeca</i>
28	FJ666563	Erseke, Αλβανία			<i>A. graeca</i>
29	FJ666564	Erseke, Αλβανία			<i>A. graeca</i>
30	FJ666565	Ποταμός Αώος, Ήπειρος			<i>A. graeca</i>
31	FJ666566	Himare, Αλβανία			<i>A. graeca</i>
32	FJ666568	Γλυκή, Ποταμός Αχέρωντας, Ήπειρος			<i>A. graeca</i>
33	FJ666569	Αμπελοχώρι, Ν.Ιωαννίνων, Ήπειρος			<i>A. graeca</i>
34	FJ666570	Κέρκυρα			<i>A. graeca</i>
35	FJ666571	Γλυκή, Ποταμός Αχέρωντας, Ήπειρος			<i>A. graeca</i>
36	FJ666572	Diniake, Αλβανία			<i>A. graeca</i>
37	FJ666574	Dukat, Αλβανία			<i>A. graeca</i>
38	FJ666575	Korce, Αλβανία			<i>A. graeca</i>
39	FJ666586	Γιάλοβα, Πύλος			<i>A. cephalonica</i>
40	FJ666587	Λίμνη Στυμφαλία, Κορινθία			<i>A. cephalonica</i>

41	FJ666588	Pseudopus apodus : εξωμάδα
----	----------	----------------------------



Εικόνα 8. Τοποθεσίες προέλευσης των δειγμάτων

4.2 Περιγραφή των δειγμάτων

Τα νέα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη έχουν συλλεχθεί στο διάστημα 2008-2013. Στον Πίνακα 3, που ακολουθεί, συνοψίζονται κάποια κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων.

Πίνακας 3. Κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων του δείγματος

		Είδος	Χρωματισμός	Αριθμός φολίδων	Άλλα χαρακτηριστικά
1.	AV 01	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία	30	
2.	AV 02	<i>A. graeca</i>	Καφέ/γκρι ανοιχτό	26	
3.	AV 05	<i>A. graeca</i>	Καφέ/γκρι ανοιχτό, διαμήκης ραχιαία σκούρα καφέ γραμμή και δύο πλευρικές πιο ανοιχτές	27	Μπλε κηλίδες ραχιαία και πλευρικά
4.	AV 06	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία	29	Οδοντωτή γραμμή στο κεφάλι
5.	AV 9	<i>A. cephallonica</i>			Ουρά
6.	AV 10	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, ανοιχτό καφέ ραχιαία	31	Νεαρό άτομο
7.	AV 11	<i>A. cephallonica</i>			Ουρά
8.	AV 12	<i>A. graeca</i>	Καφέ /γκρι ανοιχτό, διαμήκης ραχιαία σκούρα καφέ γραμμή.	26	Λίγες μπλε κηλίδες ραχιαία και πλευρικά
9.	AV 13	<i>A. cephallonica</i>			Ουρά
10.	AV 14	<i>A. cephallonica</i>	Καφέ /γκρι κοιλιακά με μαύρη περιοχή στη μέση και καφέ στη ράχη, πιο ανοιχτό καφέ	30	

			πλευρικά.		
11.	AV 15	<i>A. cephallonica</i>	Καφέ/γκρί κοιλιακά, με μαύρη περιοχή στη μέση και καφέ στη ράχη, πιο ανοιχτό καφέ πλευρικά.	30	
12.	AV 16	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία.	30	Οδοντωτή γραμμή στο κεφάλι
13.	AV 18	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία	30	Οδοντωτή γραμμή στο κεφάλι, νεαρό άτομο
14.	AV 19	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία	30	Οδοντωτή γραμμή στο κεφάλι
15.	AV 20	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία	30	
16.	AV 21	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία	30	
17.	AV 22	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, καφέ ανοιχτό ραχιαία	30	
18.	AV 23	<i>A. graeca</i>	Καφέ/γκρι ανοιχτό	26	
19.	AV 24	<i>A. graeca</i>	Καφέ/γκρι ανοιχτό	26	
20.	AV 25	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, σκούρο καφέ ραχιαία	32	
21.	AV 26	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, σκούρο καφέ ραχιαία	32	
22.	AV 27	<i>A. cephallonica</i>	Μαύρο κοιλιακά, σκούρο καφέ ραχιαία	32	

5. Πειραματική πορεία

5.1 Εξαγωγή ολικού γονιδιωματικού DNA

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της εργασίας συντηρήθηκαν μετά τη συλλογή τους σε διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 90%. Η χρήση της αλκοόλης καθιστά σημαντική την προεργασία των τμημάτων των ιστών που αφαιρούνται για την μετέπειτα εξαγωγή ολικού γενομικού DNA (DNA extraction) από κάθε άτομο, καθώς η παρουσία της στους ιστούς μπορεί να επιδράσει αρνητικά τόσο στην εξαγωγή, όσο και στους μοριακούς χειρισμούς του DNA. Αρχικά, τα τμήματα των ιστών, που ενδείκνυται να έχουν βάρος περίπου 25mg, επάζονται σε 800 μl διαλύματος TE9, οι συγκεντρώσεις των συστατικών του οποίου έχουν ως εξής: 500 mM Tris, 20 mM EDTA και 10 mM NaCl. Η επώαση συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία δωματίου σε συνεχή ανακίνηση. Την επόμενη ημέρα γίνεται αντικατάσταση του διαλύματος ανά τρεις ώρες για τέσσερις ή πέντε φορές, ενώ τα δείγματα βρίσκονταν σε συνεχή ανακίνηση και τελικά ακολουθεί μία νέα επώαση για μία ακόμα νύχτα. Αυτή η διαδικασία έκπλυσης είναι πολύ αποτελεσματική στην αφαίρεση της αιθανόλης από τους ιστούς (Shiozawa *et al.* 1992, Chakraborty *et al.* 2006).

Η εξαγωγή του ολικού γονιδιωματικού DNA έγινε με τη χρήση των αντιδραστηρίων της εταιρείας MACHEREY – NAGEL (NucleoSpin Tissue kit), ενώ ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο με την εφαρμογή κάποιων τροποποιήσεων. Το τελικό πρωτόκολλο συνοψίζεται στη συνέχεια. Αρχικά, ο ιστός επάζεται στους 56 °C για τρεις ώρες σε διάλυμα (extraction buffer), που περιέχει 180μl απορρυπαντικής ουσίας T1 και 25 μl πρωτεΐνάσης K συγκέντρωσης 10mg/ml. Η συνδυασμένη δράση του αντιδραστηρίου T1 και της πρωτεΐνάσης K προκαλεί ρήξη των μεμβρανών και των εσωτερικών δομών των κυττάρων. Η επώαση πρέπει να συνοδεύεται από συχνή ανάδευση. Στην περίπτωση που, ύστερα από τις προβλεπόμενες τρεις ώρες επώασης,

μπορούσαν να παρατηρηθούν ακόμη ακέραια τμήματα ιστού στο διάλυμα, ακολουθούσε ακόμη μία ώρα επώασης ή και προσθήκη νέας ποσότητας πρωτεΐνης K. Στη συνέχεια, το προϊόν της λύσης αφήνεται για περίπου 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να διασφαλισθεί η όσο καλύτερη απομάκρυνση της αιθανόλης από τους ιστούς. Ακολουθεί η προσθήκη 200μl του αντιδραστηρίου B3 και η επώασή του για 10 λεπτά στους 70 °C και η πρόσθεση 210 μl αιθανόλης. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλες με φίλτρο πυριτίου, οι οποίες φυγοκεντρούνται για ένα λεπτό σε ταχύτητα 11.000 x g. Ως αποτέλεσμα, το DNA προσδένεται στο φίλτρο καθώς το διάλυμα το διαπερνά. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την έκπλυση της μεμβράνης για τον καθαρισμό του προσδεμένου DNA. Η έκπλυση πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση χρησιμοποιείται το διάλυμα έκπλυσης BW σε ποσότητα 500 μl και στη δεύτερη φάση το διάλυμα B5 σε ποσότητα 600 μl. Στο τέλος κάθε έκπλυσης η στήλη φυγοκεντρείται για ένα λεπτό στην ίδια ταχύτητα. Τέλος, η μεμβράνη επάζεται για 5 λεπτά σε προθερμασμένο στους 70 °C διάλυμα BE ποσότητας 100μl και στη συνέχεια φυγοκεντρείται ως άνω. Το παραλαμβανόμενο διάλυμα περιέχει έτοιμο προς χρήση σε μοριακές διαδικασίες ολικό γενομικό DNA.

Γενικά, η εφαρμοζόμενη μέθοδος στηρίζεται στη δέσμευση του DNA σε μεμβράνη πυριτίου και στην ακόλουθη απελευθέρωσή του με τη βοήθεια διαλύματος κατάλληλης ιοντικής ισχύος, προκειμένου να εξαχθεί ολικό γενομικό DNA στη μεγαλύτερη δυνατή συγκέντρωση. Ο έλεγχος της απόδοσης της διαδικασίας εξαγωγής γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα TBE 1 X, περιέχον βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1g/dl. Μετά την πάροδο 45 λεπτών σε τάση 90 Volt, με την παρατήρηση της φωτογραφίας του πηκτώματος υπό την έκθεση υπεριώδους φωτός, μπορούσε να εκτιμηθεί η ποσότητα και η ποιότητα του απομονωμένου γενετικού υλικού. Η τελική αυτή εκτίμηση είναι σημαντική στα πλαίσια των επόμενων χειρισμών.

5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον μοριακό δείκτη

Ο μοριακός δείκτης που επιλέχθηκε για την προσέγγιση των φυλογενετικών σχέσεων και τη διερεύνηση των γενεαλογικών γραμμών τόσο εντός του *A. cerphallonica*, όσο και μεταξύ αυτού και των συγγενών με αυτό ειδών, είναι το τμήμα του μιτοχονδριακού DNA που περιέχει το κωδικό γονίδιο ND2 και πέντε αλληλουχίες tRNA (tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, tRNA-Tyr) (Εικόνα 9). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για τη 2^η υπομονάδα του ενζύμου NADH και επιλέχθηκε κυρίως γιατί έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε άλλες φυλογενετικές αναλύσεις ερπετών και αμφιβίων, όπως και στην μελέτη των Gvoždík *et al.* του 2010, ενώ ταυτόχρονα φέρει όλα τα πλεονεκτήματα του μιτοχονδριακού DNA, όπως αναφέρθηκαν στη σχετική ενότητα.

Για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό του επιλεγμένου ως μοριακού δείκτη τμήματος του μιτοχονδριακού χρωμοσώματος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction: PCR). Η PCR πρόκειται για τη διαδομένη ενζυμική μέθοδο απομόνωσης και κλωνοποίησης μίας επιλεγμένης ακολουθίας DNA, *in vitro*. Με τη διαδικασία αυτή μπορεί, μέσα σε λίγες ώρες, να παραχθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας DNA, με τη χρησιμοποίηση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (primers) και μιας ειδικής θερμοανεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq polymerase).

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια: την αποδιάταξη του DNA (denaturation), την προσαρμογή των εκκινήτων στο DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα (annealing) και την επιμήκυνση των εκκινήτων (extension). Το ζεύγος των εκκινήτων που επιλέγεται είναι ειδικό να προσαρμόζεται στο επιθυμητό προς πολλαπλασιασμό DNA τμήμα. Ένας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται σε θερμοκυκλωτές.



Εικόνα 9. Η θέση και το μήκος του μοριακού δείκτη που περιλαμβάνει το γονίδιο ND2 και τα τμήματα που μεταγράφονται σε tRNA -Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys και tRNA-Tyr στο μιτοχονδριακό χρωμόσωμα. Η κίτρινη γραμμή δείχνει την έκταση του μοριακού δείκτη στο χρωμόσωμα, μήκους περίπου 1.400 ζευγών βάσεων. Τροποποίηση από: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7670170>

Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95° C. Στη συνέχεια οι εκκινητές προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου σε θερμοκρασία 40 – 60 °C. Ακολουθεί επώαση στους 72 °C για την επιμήκυνση (extension) των εκκινητών με τη βοήθεια της πολυμεράσης Taq, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών απόσταση. Στην πράξη, συνήθως 30 με 40 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί. Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για το επιλεγμένο γονιδιακό τμήμα, η σύσταση της PCR, καθώς και το συγκεκριμένο πρόγραμμα που ακολουθήθηκε της PCR φαίνονται αναλυτικά στον συγκεντρωτικό Πίνακα 4.

Το τελικό μήκος της αλληλουχίας που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε 1424 ζεύγη βάσεων. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια για PCR της εταιρείας Kara Biosystems. Ο έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης PCR γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης κατά τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην περίπτωση του ελέγχου της απόδοσης της εξαγωγής του ολικού γενομικού DNA από τους ιστούς. Αυτή τη φορά, με αυτόν τον τρόπο γινόταν αξιολόγηση της επίτευξης ή μη του πολλαπλασιασμού, της ποσότητας, του μήκους του προϊόντος που πολλαπλασιάστηκε και της καθαρότητας του πολλαπλασιασμένου προϊόντος, προκειμένου να γίνουν ανάλογοι χειρισμοί κατά την εξέλιξη της πειραματικής πορείας.

Πίνακας 4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον επιλεγμένο μοριακό δείκτη.

Εκκινητές	
L4437n (Macey <i>et al.</i> , 1997, τροποποίηση από Gvo [^] ozdik <i>et al.</i> , 2010)	5'-AAGCTATTGGGCCCATACC-3'
H5934 (Macey <i>et al.</i> , 1997)	5'-AGRGTGCCAATGTCTTTGTGRTT-3'

Αντίδραση PCR		Τελική συγκέντρωση	
DNA μήτρα	Ανάλογα με την ποιότητα και τη συγκέντρωση		
διάλυμα Taq 10X	1X		
MgCl ₂ 10μM	3μM		
dNTPs 10mM	0,2 mM		
L4437n 10μM	0,1 μM		
H5934 10μM	0,1 μM		
Taq πολυμεράση 1U/μl	1 U		
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο		
Πρόγραμμα PCR			
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5'	
Αποδιάταξη	94 °C	40''	x 40
Προσαρμογή εκκινήτων	45 °C	40''	
Επιμήκυνση	72 °C	1' 20''	
Τελική Επιμήκυνση	72 °C	5'	

5.3. Καθαρισμός του προϊόντος της PCR και αλληλούχηση

Για να είναι δυνατόν το προϊόν της PCR να χρησιμοποιηθεί για αλληλούχηση (sequencing), είναι απαραίτητος καθαρισμός, που συνίσταται στην αφαίρεση από αυτό της περίσσειας των εκκινήτων, των νουκλεοτιδίων και της πολυμεράσης. Ο καθαρισμός έγινε μέσω πηκτώματος αγαρόζης με μέθοδο που βασίζεται σε δέσμευση του DNA σε μεμβράνη πυριτίου, με τη χρήση των αντιδραστηρίων της εταιρείας MACHEREY – NAGEL (NucleoSpin Extract II kit), ενώ ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Το πρωτόκολλο συνοψίζεται στη συνέχεια. Το σύνολο του προϊόντος της PCR για κάθε δείγμα ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης κατά τον ίδιο τρόπο, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Η απαιτούμενη ποσότητα του προϊόντος

καθορίζεται ανάλογα με την εκτιμώμενη συγκέντρωση του DNA. Η τελική συγκέντρωση πρέπει να είναι κατ' ελάχιστον 100ng/μl.

Η μπάντα που λαμβάνεται μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης για κάθε δείγμα, παρατηρείται με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός και αφαιρείται. Το τμήμα του πηκτώματος ζυγίζεται και για κάθε 100 mg πηκτώματος αγαρόζης, που προστίθεται σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης χωρητικότητας 1.5 ml, προστίθεται σε αυτόν 200 μl του απορρυπαντικού διαλύματος NT. Το διάλυμα αφήνεται προς επώαση στους 50 °C μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και σε κάθε περίπτωση τουλάχιστον για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη με φίλτρο μεμβράνης πυριτίου και φυγοκεντρείται για ένα λεπτό σε ταχύτητα 11.000 x g. Στη συνέχεια προστίθεται 700 μl διαλύματος NT3 και η στήλη φυγοκεντρείται ξανά κατά τον ίδιο τρόπο δύο φορές. Στη συνέχεια, προστίθενται 15ml διαλύματος NE και μετά από ολιγόλεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, η στήλη επαναφυγοκεντρείται για την παραλαβή του τελικού διαλύματος που περιέχει κατάλληλο για τη διαδικασία αλληλούχισης DNA.

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε από την υπηρεσία sequencing της εταιρείας Cemía A.E. που εδρεύει στην Λάρισα. Η διαδικασία αλληλούχισης μοιάζει με αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Σε αυτή γίνεται χρήση εξειδικευμένου ενζύμου Taq πολυμεράσης (Big Dye), χρωμοσημασμένων νουκλεοτιδίων και αντίστοιχων εκκινητών. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, τα νουκλεοτίδια της δεδομένης αλληλουχίας αντικαθίστανται από σημασμένα νουκλεοτίδια. Έτσι, η ειδική συσκευή (sequencer) μπορεί, προσλαμβάνοντας τα διαφορετικά χρώματα, να διαβάσει την αλληλουχία.

6. Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων και φυλογενετική ανάλυση

Οι χειρισμοί που ακολουθούν μετά τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για τον μοριακό δείκτη περιλαμβάνουν την πολλαπλή γραμμική στοίχιση των αλληλουχιών, τη διόρθωση και επεξεργασία τους, τον προσδιορισμό των διαφορετικών απλοτύπων και τη στατιστική τους διερεύνηση, την εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ τους και τη διενέργεια των φυλογενετικών αναλύσεων. Στον Πίνακα 5 φαίνονται συγκεντρωτικά τα λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για τον χειρισμό των δεδομένων και τις φυλογενετικές αναλύσεις.

6.1 Στοίχιση των αλληλουχιών και εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Η πολλαπλή γραμμική στοίχιση ακολουθιών (multiple sequence alignment) είναι η στοίχιση δύο ή περισσότερων ακολουθιών νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών καταλοίπων. Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας του προσδιορισμού των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των δειγμάτων γίνεται η πολλαπλή στοίχισή τους. Η διευθέτηση των νουκλεοτιδίων των αλληλουχιών σε γραμμές (συνήθως κάθετες), συμπεριλαμβάνοντας ελλείψεις και προσθήκες όπου είναι απαραίτητο, γίνεται έτσι ώστε όλες οι θέσεις να θεωρούνται ομόλογες.

Η στοίχιση, η διόρθωση των αλληλουχιών, όπου η ανάγνωσή τους περιέχει εμφανή λάθη και η επεξεργασία τους γίνεται με ειδικά λογισμικά προγράμματα προκειμένου να επιτευχθεί η τελική στοίχισή τους. Με βάση τις διαφορές στις στοιχισμένες ομόλογες θέσεις είναι που υπολογίζονται οι εξελικτικές αποστάσεις και συνάγονται οι εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη αλληλουχιών. Για την πολλαπλή στοίχιση των παραλαμβανόμενων

αλληλουχιών, τη διόρθωση και επεξεργασία τους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Geneious v.6.1.6 της εταιρείας Biomatters Ltd. Ύστερα από τη διόρθωση των αλληλουχιών και την τελική στοίχισή τους, με το πρόγραμμα DnaSP v.5 (Librado & Rozas 2009), προσδιορίστηκαν οι διαφορετικοί απλότυποι στο σύνολο των αλληλουχιών.

Το πρόγραμμα MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) χρησιμοποιήθηκε για τους στατιστικούς χειρισμούς επί του συνόλου των δεδομένων. Στοιχεία που διερευνήθηκαν είναι τα ποσοστά των μεταβλητών θέσεων τόσο των νουκλεοτιδικών όσο και των αμινοξικών καταλοίπων και η νουκλεοτιδική σύνθεση.

Οι γενετικές αποστάσεις των αλληλουχιών ανά ζεύγη εκτιμήθηκαν με βάση το μοντέλο Tamura–Nei (Tamura & Nei 1993), επίσης με το πρόγραμμα MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). Η πιο απλή μέτρηση του βαθμού της νουκλεοτιδικής διαφοροποίησης είναι το ποσοστό p των νουκλεοτιδικών θέσεων στις οποίες δύο αλληλουχίες διαφέρουν (απόσταση p , p -distance). Όταν ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών είναι μεγάλος, η παράμετρος p υποεκτιμά τον πραγματικό αριθμό των διαφορών, γιατί δεν λαμβάνει υπόψη τις αναστροφές και παράλληλες υποκαταστάσεις (Page & Holmes 1998). Συνεπώς, χρησιμοποιούνται διαφορετικά μοντέλα για την καλύτερη εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων, όπως το μοντέλο που αναφέρθηκε..

6.2 Φυλογενετικές αναλύσεις

Εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι αναλύσεων για την ομάδα δεδομένων των αλληλουχιών, τόσο αυτών που απομονώθηκαν μετά την πειραματική διαδικασία, όσο και αυτών που προστέθηκαν από τη βάση δεδομένων του NCBI, όπως αναφέρθηκε συγκεκριμένα στην ενότητα 4. Αυτές οι μέθοδοι είναι οι: Σύνδεση Γειτόνων (Neighbor-Joining / NJ) (Saitou & Nei 1987), Μέγιστη Πιθανοφάνεια (Maximum Likelihood / ML) (Felsenstein 1981) και Μπεϋεσιανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference / BI) (Geyer 1991). Ως εξωομάδα, χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αναλύσεις ο απλότυπος *Pseudopus*

apodus. Η χρήση του κρίθηκε κατάλληλη εφόσον τα γένη *Pseudopus* και *Anguis* είναι αδελφά taxa (Macey et al. 1999), με το είδος *Pseudopus apodus* να εντοπίζεται στην Ελλάδα.

Η ανάλυση μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας πραγματοποιήθηκε με το ελεύθερο λογισμικό Mr Bayes 3.2.2. (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Για την ανάλυση, το καταλληλότερο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης, επιλέχθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος jModeltest v.0.1.1 (Posada 2008) με το κριτήριο BIC (Bayesian Information Criterion, Schwarz 1978), που έχει προταθεί ως καταλληλότερο (Posada & Buckley 2004, Luo et al. 2010). Ο έλεγχος διενεργήθηκε, αφού οι διαθέσιμες αλληλουχίες για τον μοριακό δείκτη διαχωρίστηκαν σε κωδική περιοχή και περιοχή μετάγραφων tRNA και αφού η κωδική περιοχή εξετάσθηκε για κάθε ένα από τα τρία κωδικώνια. Μετά την επιλογή των μοντέλων για κάθε τμήμα, το λογισμικό MrBayes διενέργησε δύο ανεξάρτητες αναλύσεις (runs) για 2.000.000 γενιές, ενώ ρυθμίστηκε ανά 100 γενιές να αποθηκεύεται ένα δέντρο. Το 25% αυτών απορρίπτονται στο τέλος, από προεπιλογή, ως αναξιόπιστα (burnin).

Η ανάλυση της μέγιστης πιθανοφάνειας πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα RAxML 7.2.7 (Stamatakis 2006), ενώ η στατιστική υποστήριξη των κόμβων του φυλογενετικού δέντρου που προκύπτει έγινε με τη μέθοδο bootstrap και την εφαρμογή 1.000 επαναλήψεων (Felsenstein 1985). Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το GTRCAT, ως το πλέον πολύπλοκο και το μόνο που υποστηρίζεται από το πρόγραμμα.

Η ανάλυση σύνδεσης γειτόνων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Geneious v.6.1.6 της Biomatters Ltd. Η ανάλυση βασίστηκε στις γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν με το μοντέλο Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993). Ξανά, η μέθοδος bootstrap είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε με 1.000 επαναλήψεις για την εκτίμηση της στατιστικής υποστήριξης των κόμβων του σχηματιζόμενου δένδρου.

Πίνακας 5. Λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον χειρισμό των ανακτημένων αλληλουχιών

Λογισμικό	Κατασκευαστής	Λειτουργία
Geneious v.6.1.6	Biomatters Ltd.	πολλαπλή στοίχιση, διόρθωση και επεξεργασία αλληλουχιών, ανάλυση σύνδεσης γειτόνων
DnaSP v.5	Librado & Rozas 2009	προσδιορισμός διαφορετικών απλοτύπων
MEGA5	Tamura <i>et al.</i> 2011	στατιστικοί χειρισμοί, εκτίμηση γενετικών αποστάσεων
Mr Bayes 3.2.2.	Ronquist & Huelsenbeck 2003	φυλογενετική ανάλυση μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας
jModeltest v.0.1.1	Posada 2008	προσδιορισμός καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για την BI ανάλυση
RAxML 7.2.7	Stamatakis 2006	φυλογενετική ανάλυση μέγιστης πιθανοφάνειας

Γ. Αποτελέσματα

7. Στατιστικά στοιχεία και γενετικές αποστάσεις

7.1 Στατιστικά στοιχεία

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας είχαν προσδιορισθεί 22 νέες αλληλουχίες του μιτοχονδριακού γενετικού τόπου που περιέχει το γονίδιο ND2 και πέντε tRNAs (tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, tRNA-Tyr). Οι αλληλουχίες αυτές αντιστοιχούν σε 14 νέους απλότυπους. Αυτοί οι αριθμοί αντιστοιχούν στα άτομα του γένους *Anguis* συνολικά. Πιο συγκεκριμένα, για το *A. cephallonica* προσδιορίσθηκαν 17 αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε εννέα απλότυπους και για το είδος *A. graeca* προσδιορίσθηκαν πέντε αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε πέντε διαφορετικούς απλότυπους. Το συνολικό μήκος του μοριακού δείκτη ισοδυναμεί με 1424 ζεύγη βάσεων. Το γονίδιο ND2 εκτείνεται έως τη θέση 1038, ενώ το τμήμα των tRNAs εκτείνεται από τη θέση 1039 ως τη θέση 1424.

Για το σύνολο των νέων αλληλουχιών το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 10.1% (145/1424) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, με βάση το κριτήριο της φειδωλότητας (parsimony criterion), ήταν 8.2% (118/1424). Σημειώνεται ότι ως πληροφοριακές θέσεις φειδωλότητας προσμετρούνται οι θέσεις στις οποίες εμφανίζονται τουλάχιστον δύο διαφορετικά νουκλεοτίδια και το καθένα απαντάται τουλάχιστον δύο φορές στο σύνολο των αλληλουχιών που εξετάζονται. Για το τμήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο ND2, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 12.1% (126/1038) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, βάσει του κριτηρίου της φειδωλότητας ήταν 9.9% (103/1038). Τέλος, για το μεταφρασμένο τμήμα του γονιδίου ND2 παρατηρήθηκε ποσοστό 9.8% (34/345) μεταβλητών θέσεων αμινοξέων, με το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων να είναι 7.2% (25/345).

Πιο συγκεκριμένα, για τις προσδιορισμένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο είδος *A. cephallonica*, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 3.3% (47/1424) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, με βάση το

κριτήριο της φειδωλότητας ήταν 1.1% (17/1424). Για το τμήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο ND2, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 3.6% (39/1038) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, βάσει του κριτηρίου της φειδωλότητας ήταν 1.6% (13/1038). Τέλος, για το μεταφρασμένο τμήμα του γονιδίου ND2 παρατηρήθηκε ποσοστό 4.6% (16/345) μεταβλητών θέσεων αμινοξέων, με το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων να είναι 1.4% (5/345).

Στην ανάλυση συμπεριελήφθησαν ακόμα 19 αλληλουχίες, ήδη δημοσιευμένες (Gvoždík *et al.* 2010), που ανακτήθηκαν από το NCBI. Αυτές αντιστοιχούν σε δύο αλληλουχίες *A. fragilis*, 14 αλληλουχίες *A. graeca*, δύο αλληλουχίες *A. cephallonica* και μία αλληλουχία *Pseudopus apodus*, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα. Συνολικά, οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι 40 συν την αλληλουχία - εξωομάδα *Pseudopus apodus*. Οι αλληλουχίες αυτές αντιστοιχούν σε 28 απλότυπους (Πίνακας 6). Για το είδος *A. cephallonica* έχουμε 19 αλληλουχίες που ισοδυναμούν με εννέα απλότυπους και για το είδος *A. graeca*, 19 αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε 16 διαφορετικούς απλότυπους. Οι δύο αλληλουχίες *A. fragilis* ισοδυναμούν με δύο απλότυπους.

Για το σύνολο των αλληλουχιών *Anguis* που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, τα ποσοστά των διαφορετικών νουκλεοτιδίων φαίνονται στον Πίνακα 7. Το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 15.9% (227/1424) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, με βάση το κριτήριο της φειδωλότητας ήταν 14.4% (179/1424). Για το τμήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο ND2, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 17.7% (186/1038) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, βάσει του κριτηρίου της φειδωλότητας ήταν 14.3% (148/1038). Τέλος, για το μεταφρασμένο τμήμα του γονιδίου ND2 παρατηρήθηκε ποσοστό 12.6% (44/345) μεταβλητών θέσεων αμινοξέων, με το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων να είναι 9.3% (32/345).

Πίνακας 6. Παράθεση απλοτύπων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Οι αλληλουχίες με κωδικό FJ6665** αντιστοιχούν στις ανακτημένες από το NCBI αλληλουχίες

Απλότυπος	Αλληλουχίες	Αριθμός αλληλουχιών	Τοποθεσία	Είδος
1	AV11	1	Λάγια Λακωνίας	<i>A. cephalonica</i>
2	AV06, AV22	2	Μαίναλο (Λαγκάδια προς Ελάτη) - Μύλος προς Τρίπολη	<i>A. cephalonica</i>
3	AV18, AV19	2	Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου)	<i>A. cephalonica</i>
4	AV01	1	Δυρράχι προς Λεοντάρι (Ν. Αργολίδας)	<i>A. cephalonica</i>
5	FJ666586, AV14, AV15	3	Γιάλοβα Πύλος, Ταΰγετος (Λεοντάρι και καταφύγιο προς Δυρράχι)	<i>A. cephalonica</i>
6	AV25, AV26, AV27	3	Κεφαλονιά (Αίνος και Λίμνη Άβυθος)	<i>A. cephalonica</i>
7	AV16	1	Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου)	<i>A. cephalonica</i>
8	AV20	1	Μαίναλο (Βαλτεσίνικο)	<i>A. cephalonica</i>
9	FJ666587, AV21, AV09, AV10, AV13	5	Λίμνη Στυμφαλία, Παναγιά Αρκαδίας, Τριπόταμα και Σελλά-Ζήρια Αχαΐας, Ροδιά Μεσσηνίας	<i>A. cephalonica</i>
10	AV05	1	Λίμνη Κρεμαστών	<i>A. graeca</i>
11	AV12	1	Αρχ. Χώρος Βελβίνας	<i>A. graeca</i>
12	AV23	1	Λίμνη Δόξα, Φενεός	<i>A. graeca</i>
13	AV24	1	Λίμνη Δόξα, Φενεός	<i>A. graeca</i>
14	FJ666560, AV02	2	Ποταμός Μόρνος, Αγ. Βασίλειος Πατρών	<i>A. graeca</i>
15	FJ666561, FJ666562	2	Περτούλι Τρικάλων, Στόμιο Λάρισας	<i>A. graeca</i>
16	FJ666565	1	Ποταμός Αώος, Ήπειρος	<i>A. graeca</i>
17	FJ666563, FJ666564	2	Erseke, Αλβανία	<i>A. graeca</i>
18	FJ666566	1	Himare, Αλβανία	<i>A. graeca</i>
19	FJ666569	1	Αμπελοχώρι, Ν.Ιωαννίνων, Ήπειρος	<i>A. graeca</i>
20	FJ666568	1	Γλυκή, Ποταμός Αχέρωντας, Ήπειρος	<i>A. graeca</i>

21	FJ666570	1	Κέρκυρα	<i>A. graeca</i>
22	FJ666571	1	Γλυκή, Ποταμός Αχέρωντας, Ήπειρος	<i>A. graeca</i>
23	FJ666574	1	Dukat, Αλβανία	<i>A. graeca</i>
24	FJ666575	1	Korce, Αλβανία	<i>A. graeca</i>
25	FJ666572	1	Diniake, Αλβανία	<i>A. graeca</i>
26	FJ666557	1	Μεσοροπή Καβάλας	<i>A. fragilis</i>
27	FJ666558	1	Μεγάλο Λιβάδι Δράμας	<i>A. fragilis</i>
28	FJ666588	1	outgroup	<i>P. apodus</i>

Πίνακας 7. Ποσοστό κάθε νουκλεοτιδίου σε κάθε απλότυπο, ανά είδος και συνολικά

	απλότυπος	T(U)	C	A	G
Λάγια Λακωνίας	1	23.5	30.9	32.6	13.0
Μαίναλο (Λαγκάδια προς Ελάτη) - Μύλος προς Τρίπολη	2	23.0	31.1	33.1	12.8
Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου)	3	23.2	31.3	32.8	12.7
Δυρράχι προς Λεοντάρι (Ν. Αργολίδας)	4	23.0	31.3	33.0	12.6
Γιάλοβα Πύλος, Ταΰγετος (Λεοντάρι και καταφύγιο προς Δυρράχι)	5	23.1	31.3	33.0	12.6
Κεφαλονιά (Αίνος και Λίμνη Άβυθος)	6	23.1	31.1	33.0	12.7
Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου)	7	23.2	31.2	32.8	12.8
Μαίναλο (Βαλτεσίνικο)	8	23.4	31.4	33.1	12.1
Λίμνη Στυμφαλία, Τριπόταμα και Σελλά-Ζήρια Αχαΐας, Ροδιά Μεσσηνίας	9	23.1	31.2	32.9	12.9
Λίμνη Κρεμαστών	10	23.3	31.6	31.1	14.0
Αρχ. Χώρος Βελβίνας	11	23.1	31.6	31.2	14.1
Λίμνη Δόξα, Φενεός	12	23.3	32.2	31.7	12.8
Λίμνη Δόξα, Φενεός	13	23.5	32.0	31.8	12.8
Ποταμός Μόρνος, Αγ. Βασίλειος Πατρών	14	23.3	31.6	31.3	13.8
Περτούλι Τρικάλων, Στόμιο Λάρισας	15	23.3	31.6	31.4	13.7
Ποταμός Αώος, Ήπειρος	16	23.5	31.4	31.3	13.8
Erseke, Αλβανία	17	23.3	31.6	31.2	13.9
Himare, Αλβανία	18	23.7	31.2	31.1	14.0
Αμπελοχώρι, Ν.Ιωαννίνων, Ήπειρος	19	23.6	31.3	31.3	13.8

Γλυκή, Ποταμός Αχέρωντας, Ήπειρος	20	23.4	31.4	31.6	13.6
Κέρκυρα	21	23.4	31.5	31.3	13.8
Γλυκή, Ποταμός Αχέρωντας, Ήπειρος	22	23.3	31.5	31.5	13.7
Dukat, Αλβανία	23	23.3	31.5	31.7	13.5
Korce, Αλβανία	24	23.5	31.3	31.6	13.6
Diniake, Αλβανία	25	23.3	31.4	31.5	13.8
Μεσοροπή Καβάλας	26	23.3	31.6	32.1	13.0
Μεγάλο Λιβάδι Δράμας	27	23.1	31.7	32.0	13.2
Σύνολο	μέσος όρος	23.3	31.4	32.0	13.3
<i>A. cephalonica</i> (απλότυποι 1-9)	μέσος όρος	23.2	31	32.9	12.7
<i>A. graeca</i> (απλότυποι 10-25)	μέσος όρος	23.4	31.5	31.4	13.7
<i>A. fragilis</i> (απλότυποι 26-27)	μέσος όρος	23.2	31.6	32.1	13.1

Για το σύνολο των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στο είδος *A. cephalonica* και χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 3.1% (44/1424) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, με βάση το κριτήριο της φειδωλότητας ήταν 1% (13/1424). Για το τμήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο ND2, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 3.5% (36/1038) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, βάσει του κριτηρίου της φειδωλότητας ήταν 0.9% (9/1038). Τέλος, για το μεταφρασμένο τμήμα του γονιδίου ND2 παρατηρήθηκε ποσοστό 3.8% (13/345) μεταβλητών θέσεων αμινοξέων, με το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων να είναι 1.2% (4/345).

Για το σύνολο των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στο είδος *A. graeca*, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 6.5% (92/1424) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, με βάση το κριτήριο της φειδωλότητας ήταν 1.9% (27/1424). Για το τμήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο ND2, το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων ήταν 7% (73/1038) και το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων, βάσει του κριτηρίου της φειδωλότητας ήταν 1.8% (19/1038). Τέλος, για το μεταφρασμένο τμήμα του γονιδίου ND2 παρατηρήθηκε ποσοστό 4.6% (16/345) μεταβλητών θέσεων αμινοξέων, με το ποσοστό των πληροφοριακών θέσεων να είναι 1.7% (6/345).

7.2 Γενετικές αποστάσεις

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των αλληλουχιών *Anguis*, εκφρασμένη με τη μορφή γενετικών αποστάσεων και με βάση το μοντέλο Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993), κυμάνθηκε από 0.1% έως 9.8%, με μέσο όρο 5.3%. Σημειώνεται, επιπλέον, ότι η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών του γένους *Anguis* και της εξωομάδας *Pseudopus apodus* είναι 15.4%.

Η γενετική διαφοροποίηση υπολογισμένη με τον ίδιο τρόπο για το *A. cephallonica* κυμάνθηκε από 0.1% έως 2,8%, με μέσο όρο 1%, ενώ για το είδος *A. graeca* κυμάνθηκε από 0.1% έως 2.8%, με μέσο όρο 1.5% (Πίνακες 8 και 9). Εντός του είδους *A. cephallonica*, οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις παρατηρούνται για τον απλότυπο 1, που αντιστοιχεί στη νοτιότερη περιοχή από τις τοποθεσίες προέλευσης των δειγμάτων. Εντός του *A. graeca*, οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις παρατηρούνται για τους απλότυπους που αντιστοιχούν στη Βόρεια Ήπειρο.

Πίνακας 8. Πίνακας γενετικών αποστάσεων βάσει του μοντέλου Tamura-Nei για το είδος *A. cephallonica*. Οι εκτιμήσεις του τυπικού σφάλματος φαίνονται στην άνω πλευρά της διαγωνίου και υπολογίσθηκαν με έλεγχο 1000 επαναλήψεων bootstrap. Η ανάλυση περιλαμβάνει εννέα απλότυπους. Συμπεριελήφθησαν όλες οι κωδικές θέσεις και τα μη κωδικά τμήματα, ενώ η έλλειψη δεδομένων αγνοείται.

Απλότυπος	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Λάγια Λακωνίας		0.005	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Μαίναλο (Λαγκάδια προς Ελάτη)									
2. Μύλος προς Τρίπολη	0.027		0.001	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
3. Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου)	0.028	0.001		0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.002
4. Δυρράχι προς Λεοντάρι	0.025	0.008	0.009		0.001	0.003	0.003	0.003	0.002
5. Πάλοβα Πύλος, Ταύγετος	0.025	0.007	0.007	0.002		0.002	0.002	0.002	0.002
6. Κεφαλονιά	0.026	0.007	0.008	0.007	0.006		0.002	0.002	0.002
7. Μαίναλο (ρέμα Αγ. Νικολάου)	0.024	0.007	0.008	0.007	0.006	0.005		0.001	0.001
8. Μαίναλο (Βαλτεσίνικο)	0.023	0.007	0.008	0.007	0.006	0.005	0.002		0.001
Τριπόταμα-Σελλά-Ζήρια Αχαΐας									
9. ΑΣτυμφαλία-Ροδιά Μεσσηνίας	0.024	0.007	0.007	0.007	0.005	0.004	0.001	0.001	

Πίνακας 9. Πίνακας γενετικών αποστάσεων βάσει του μοντέλου Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) για το είδος *A.graeca*. Οι εκτιμήσεις του τυπικού σφάλματος φαίνονται στην άνω πλευρά της διαγωνίου και υπολογίσθηκαν με έλεγχο 1000 επαναλήψεων bootstrap. Η ανάλυση περιλαμβάνει 16 απλότυπους. Συμπεριελήφθησαν όλες οι κωδικές θέσεις και τα μη κωδικά τμήματα, ενώ η έλλειψη δεδομένων αγνοείται.

ΑΠΛΌΤΥΠΟΣ	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
10. Λίμνη Κερμασιών		0.002	0.003	0.003	0.002	0.002	0.004	0.004	0.005	0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.005	0.005
11. Αοχ. Χάρος Βελβίνας	0.005		0.003	0.003	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.005	0.005
12. Λίμνη Δόξα, Φενεός	0.006	0.006		0.001	0.002	0.002	0.004	0.003	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.005	0.005
13. Λίμνη Δόξα, Φενεός	0.007	0.007	0.001		0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.006	0.005
14. Μόρος - Αγ. Βασίλειος	0.003	0.003	0.002	0.003		0.001	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.005	0.005	0.005
15. Πετρούλη - Στόμιο	0.005	0.005	0.003	0.005	0.001		0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005	0.005	0.005
16. Ποταμός Αώος	0.012	0.012	0.011	0.012	0.008	0.009		0.001	0.004	0.003	0.003	0.004	0.003	0.005	0.005	0.005
17. Erseke, Αλβανία	0.011	0.011	0.009	0.011	0.007	0.008	0.001		0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.005	0.005	0.005
18. Himare, Αλβανία	0.016	0.016	0.015	0.016	0.013	0.014	0.012	0.010		0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.005	0.006
19. Αμπτελοχώρι Ιωαννίνων	0.015	0.015	0.014	0.015	0.012	0.013	0.011	0.009	0.015		0.002	0.004	0.002	0.005	0.004	0.004
20. Γλυκή, Αχέρωντας	0.015	0.015	0.012	0.013	0.012	0.013	0.011	0.009	0.015	0.005		0.004	0.003	0.005	0.005	0.005
21. Κέρκυρα	0.020	0.020	0.019	0.020	0.017	0.018	0.015	0.014	0.020	0.012	0.014		0.003	0.006	0.005	0.005
22. Γλυκή, Αχέρωντας	0.013	0.013	0.012	0.013	0.009	0.011	0.008	0.007	0.013	0.005	0.007	0.011		0.005	0.004	0.004
23. Dukat, Αλβανία	0.028	0.028	0.027	0.028	0.024	0.025	0.023	0.021	0.027	0.023	0.025	0.026	0.020		0.005	0.005
24. Korca, Αλβανία	0.025	0.025	0.024	0.025	0.021	0.023	0.020	0.019	0.025	0.018	0.020	0.021	0.015	0.024		0.004
25. Diniake, Αλβανία	0.021	0.021	0.020	0.021	0.018	0.019	0.019	0.018	0.024	0.017	0.019	0.020	0.014	0.025	0.013	

Υπολογίστηκαν, επίσης, οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ομάδων απλοτύπων που αντιστοιχούν σε κάθε είδος και μεταξύ αυτών και του απλοτύπου της εξωομάδας (Πίνακας 10). Η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των ειδών *A.cephallonica* και *A. graeca* είναι 8.4%.

Πίνακας 10. Πίνακας γενετικών αποστάσεων βάσει του μοντέλου Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) μεταξύ των ομάδων απλοτύπων που συγκροτεί το κάθε είδος που συμπεριλαμβάνεται στην ανάλυση. Οι εκτιμήσεις του τυπικού σφάλματος φαίνονται στην άνω πλευρά της διαγωνίου και υπολογίστηκαν με έλεγχο 1000 επαναλήψεων bootstrap. Συμπεριελήφθησαν όλες οι κωδικές θέσεις και τα μη κωδικά τμήματα, ενώ η έλλειψη δεδομένων αγνοείται.

	1	2	3	4
1. <i>A. cephallonica</i>		0.010	0.016	0.011
2. <i>A. graeca</i>	0.084		0.017	0.011
3. <i>Pseudopus apodus</i>	0.143	0.161		0.015
4. <i>A. fragilis</i>	0.081	0.090	0.145	

8. Φυλογενετικά δέντρα

Συνολικά, όπως αναφέρθηκε, εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι φυλογενετικών αναλύσεων για τον μιτοχονδριακό μοριακό δείκτη (Εικόνα 10, 11 και 12). Ως εξωομάδα χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αναλύσεις ο απλότυπος *Pseudopus apodus*, αφού το γένος *Pseudopus* πρόκειται για αδελφό τάξο του γένους *Anguis* (Macey *et al.* 1999), ενώ η εξάπλωσή του είδους *Pseudopus apodus* συμπεριλαμβάνει τον ελλαδικό χώρο.

Στο τέλος της ενότητας, συσχετίζονται οι κλάδοι που προκύπτουν από τα φυλογενετικά δέντρα και αντιστοιχούν σε καθένα από τα είδη *A. fragilis*, *A. graeca* και *A. cephallonica*, με τη γεωγραφική εξάπλωση αυτών (Εικόνα 13). Επίσης, πιο συγκεκριμένα εστιάζουμε στον κλάδο που προκύπτει στα διαφορετικά δέντρα και αντιστοιχεί στο *A. cephallonica* (Εικόνα 14).

Για την ανάλυση Μπεϋεσιανής Συμπερασματολογίας, η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου έγινε με έλεγχο σύμφωνα με το κριτήριο BIC (Bayesian Information Criterion) (Schwarz 1978), το οποίο έχει προταθεί ως καταλληλότερο (Posada & Buckley 2004, Luo *et al.* 2010). Ο έλεγχος διενεργήθηκε σε διαχωρισμένα δεδομένα (partitions) για καθμία από τις τρεις θέσεις των κωδικονίων για το τμήμα του μοριακού δείκτη που κωδικοποιεί πρωτεΐνη και για το τμήμα των tRNAs (Πίνακας 11). Για την πρώτη θέση των κωδικονίων του κωδικού για πρωτεΐνη τμήματος του μοριακού δείκτη ως καταλληλότερο μεταξύ 56 μοντέλων επιλέχθηκε το μοντέλο υποκατάστασης HKY+G (Hasegawa *et al.* 1985). Για τη δεύτερη θέση των κωδικονίων του ίδιου τμήματος του μοριακού δείκτη ως καταλληλότερο επιλέχθηκε το μοντέλο υποκατάστασης HKY και τέλος, για την τρίτη θέση καθώς και για το τμήμα των tRNAs επιλέχθηκε το HKY+I. Έγιναν δύο ανεξάρτητες αναλύσεις (runs) για 2.000.000 γενιές, ενώ ανά 100 γενιές αποθηκεύονταν ένα δέντρο. Συνεπώς, αποθηκεύθηκαν συνολικά 20.000 δέντρα από κάθε ανάλυση. Δεν λήφθηκαν υπόψη 25% αυτών ως αναξιόπιστα (burnin). Η στατιστική υποστήριξη του φυλογενετικού δέντρου λαμβάνεται από τις τιμές της εκ των υστέρων

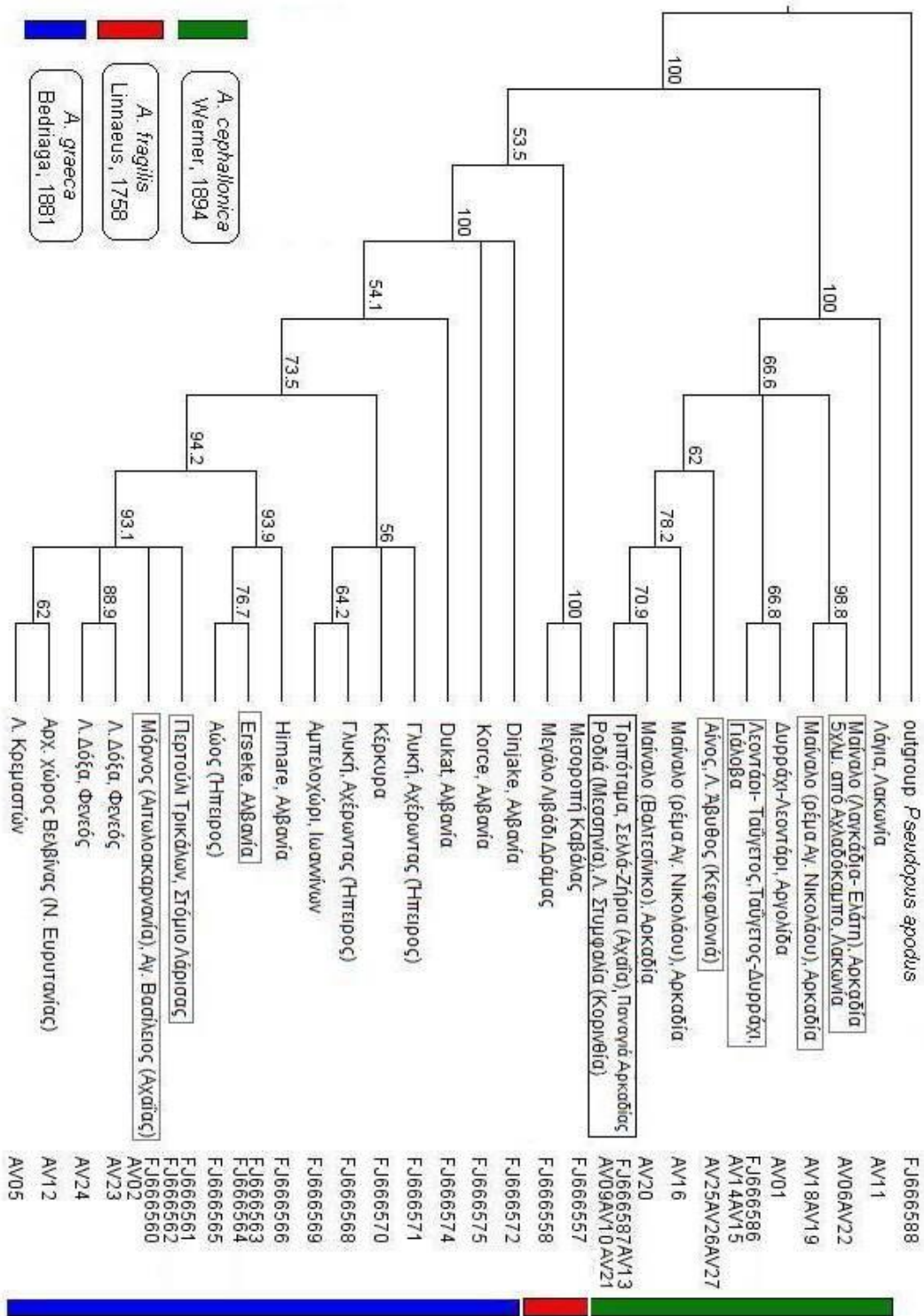
πιθανότητας (posterior probability) (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Η ανάλυση τερματίστηκε με την μέση τυπική απόκλιση να έχει τιμή 0,002501. Το δραστικό μέγεθος δείγματος (ESS: Estimated Sample Size) για κάθε παράμετρο είχε τιμή πολύ μεγαλύτερη του ορίου του 100, ενώ ο παράγοντας PSRF (Gelman & Rubin 1992) ήταν ίσος με 1.

Πίνακας 11. Παράμετροι υποκατάστασης που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμένο σύνολο των δεδομένων για την ανάλυση Μπεϋεσιανής Συμπερασματολογίας.

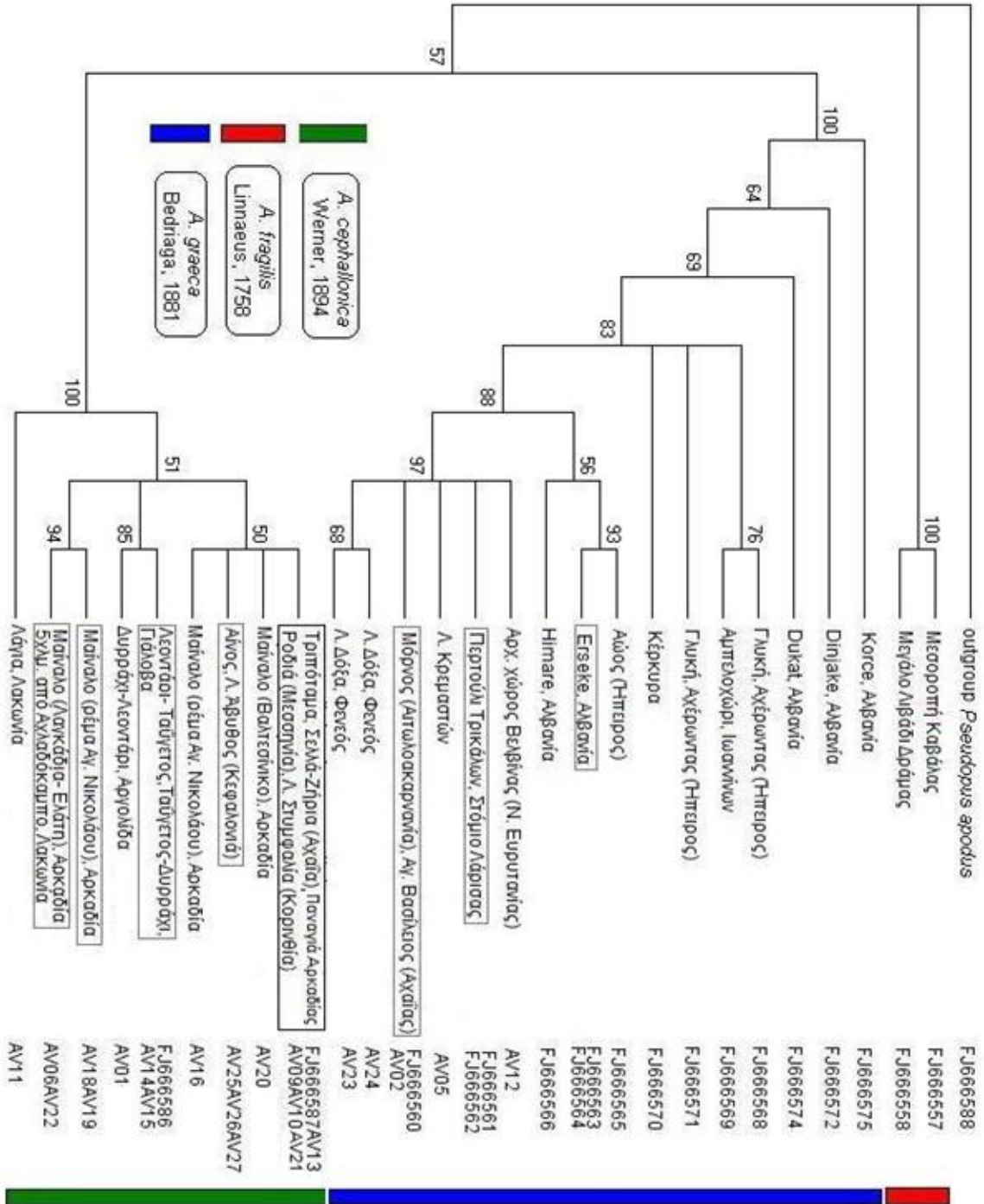
Τμήμα	Μοντέλο	-lnL	BIC	I	G
ND2 - 1 ^η κωδική θέση	HKY+G	903,207	2151,3535		0,209
ND2 - 2 ^η κωδική θέση	HKY	571,268	1481,6302		
ND2 - 3 ^η κωδική θέση	HKY+I	1433,451	3211,8419	0,163	
tRNAs	HKY+I	929,134	2209,9663	0,787	

Όπως αναφέρθηκε, η NJ ανάλυση βασίστηκε στις γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν με το μοντέλο Tamura–Nei (Tamura & Nei 1993). Η μέθοδος bootstrap εφαρμόστηκε για την στατιστική υποστήριξη των κόμβων του φυλογενετικού δένδρου με 1000 επαναλήψεις (Felsenstein 1985).

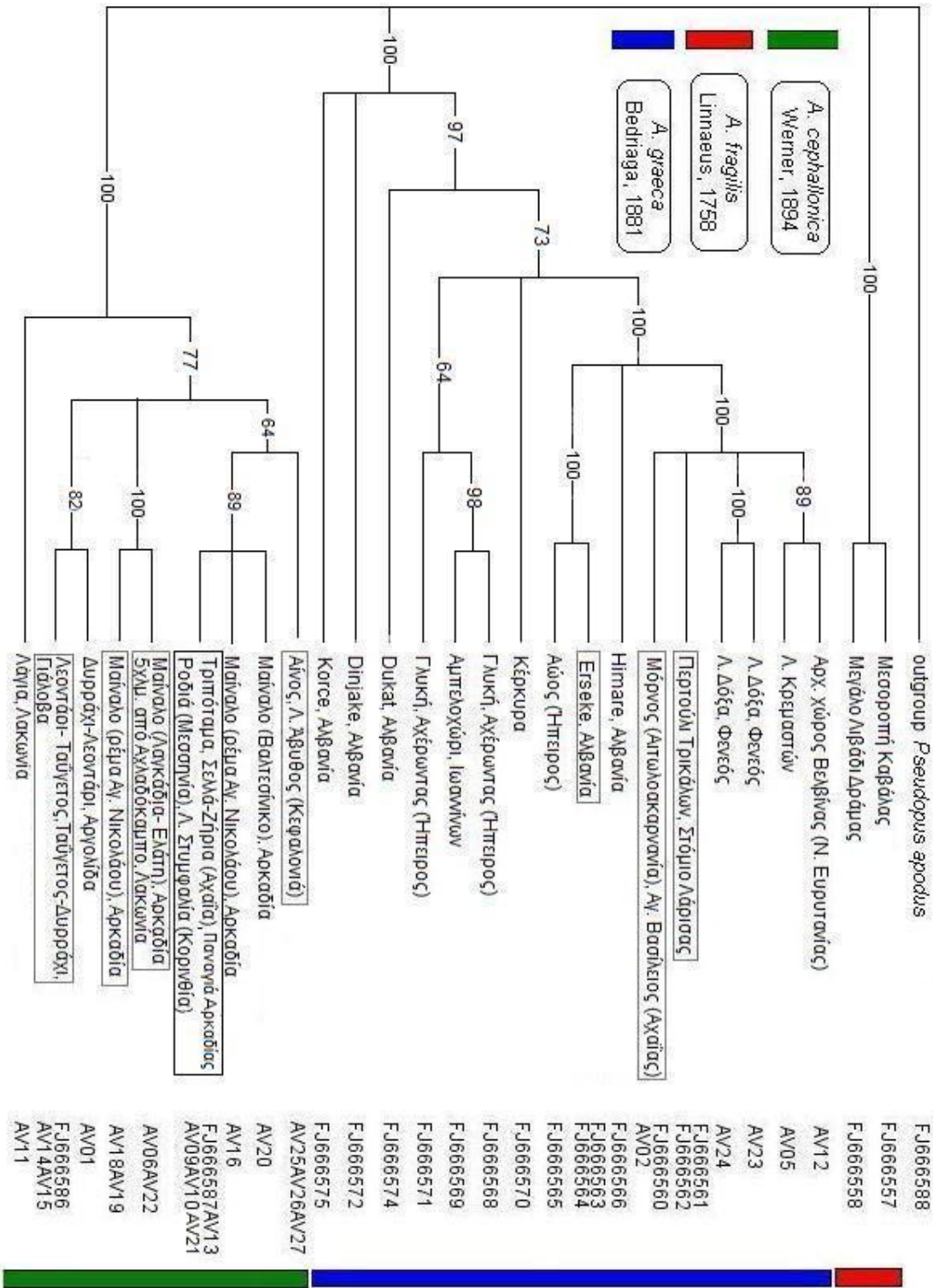
Τέλος, στην ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο GTRCAT, ως το πλέον πολύπλοκο και το μόνο που υποστηρίζεται από το χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα. Η στατιστική υποστήριξη για το δέντρο αυτό ελέγχθηκε με 1000 επαναλήψεις bootstrap (Felsenstein 1985).



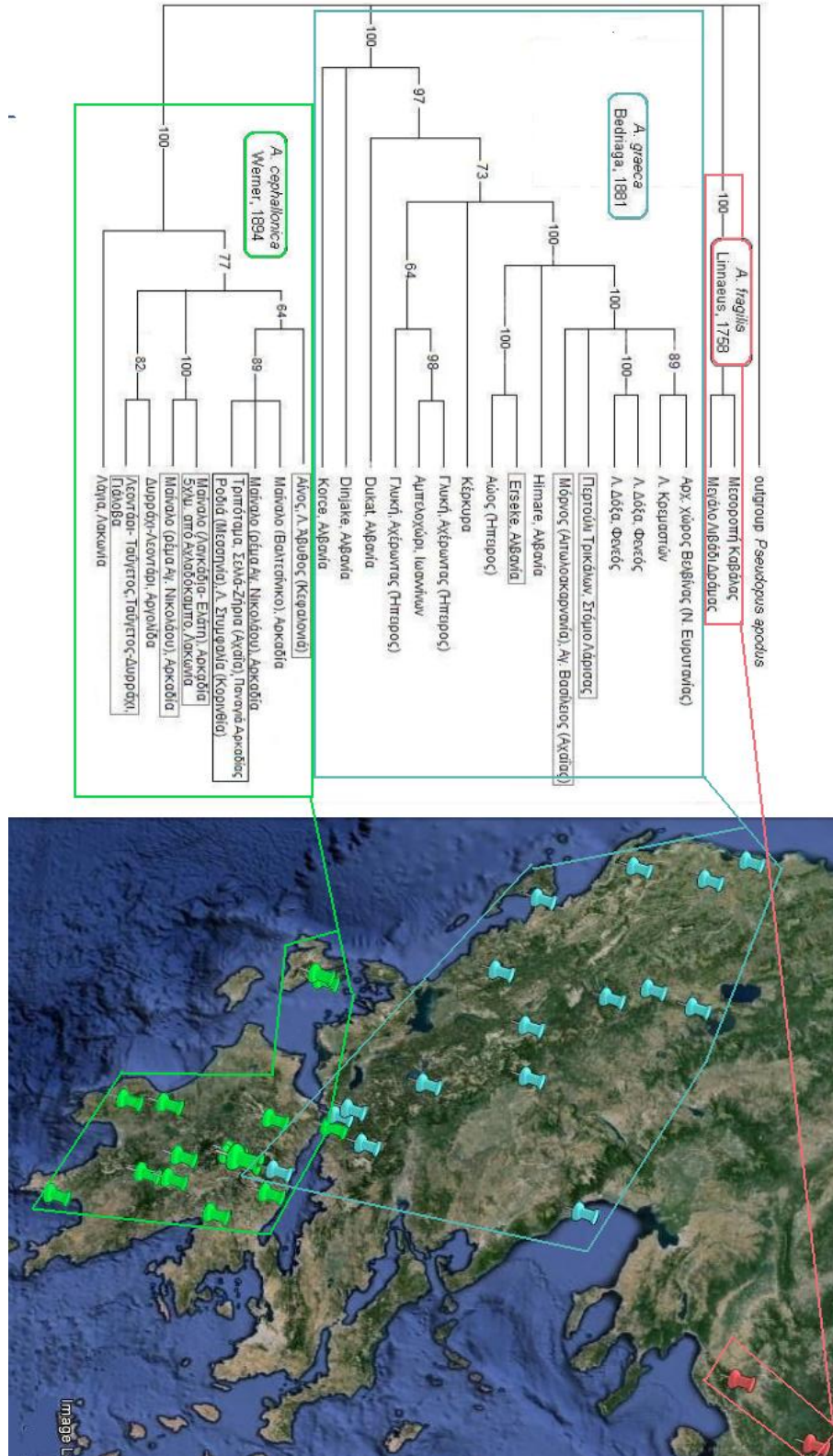
Εικόνα 10. Δέντρο Σύνδεσης Γειτόνων για τον μιτοχονδριακό δείκτη ND2 και 28 απλότυπους, βάσει του μοντέλου Tamura–Nei και 1000 επαναλήψεων bootstrap. Οι τρεις σημασμένοι κλάδοι αντιστοιχούν σε καθένα από τα τρία είδη *Anguis* που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση.



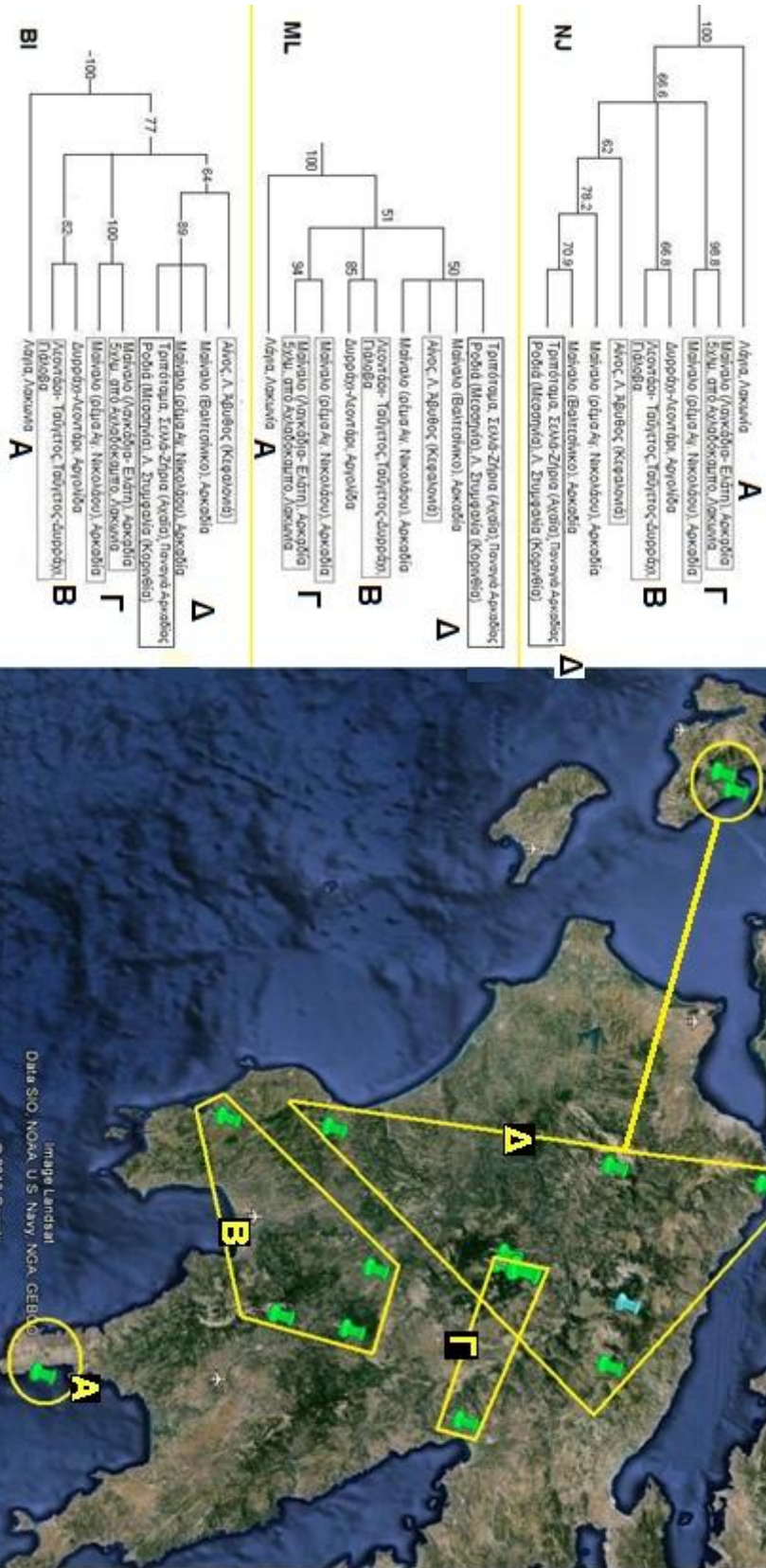
Εικόνα 11. Φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας για τον μιτοχονδριακό δείκτη ND2 και 28 απλότυπους, βάσει του μοντέλου GTRCAT και 1000 επαναλήψεων bootstrap. Οι τρεις σημασμένοι κλάδοι αντιστοιχούν σε καθένα από τα τρία είδη *Anguis* που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση.



Εικόνα 12. Φυλογενετικό δέντρο Μπεύσειανής Συμπερασματολογίας για τον μιτοχονδριακό δείκτη ND2 και 28 απλότυπους, Χρησιμοποιήθηκαν το μοντέλα HKY+G για την πρώτη κωδική θέση του κωδικού τμήματος, το HKY για τη δεύτερη και το HKY+I για την Τρίτη και το τμήμα των tRNAs. Η ανάλυση έγινε για 2.000.000 γενιές.



Εικόνα 13. Αντιστοίχιση των κλάδων του φυλογενετικού δέντρου ΒΙ που αντιστοιχούν σε κάθε είδος, με τη γεωγραφική εξάπλωση των αντίστοιχων δειγμάτων της μελέτης. Το κόκκινο αντιστοιχεί στους απλότυπους *A. fragilis*, το μπλε στους απλότυπους *A. graeca* και το πράσινο στους απλότυπους *A. cephalonica*.



Εικόνα 14. Ο κλάδος που προκύπτει σε καθεμία από τις τρεις αναλύσεις και αντιστοιχεί στο *A. cerphallonica*, σε σχέση με τη γεωγραφική εξάπλωση των δειγμάτων της ανάλυσης.

Δ. Συζήτηση

9. Γενετικές σχέσεις

9.1 Γενετικές σχέσεις εντός του *Anguis* στον ελλαδικό χώρο

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας τα διαθέσιμα δεδομένα για τον γενετικό μιτοχονδριακό δείκτη ND2 και τα πέντε τμήματα tRNAs, που αντιστοιχούν σε 1424 ζεύγη βάσεων και αναφέρονται σε 28 διαφορετικούς απλότυπους, κατατάχθηκαν σε τρία διαφορετικά taxa σε επίπεδο είδους. Αναγνωρίζονται, λοιπόν, στον ηπειρωτικό ελλαδικό χώρο καθώς και στα Ιόνια νησιά τρία διαφορετικά είδη ενταγμένα στο γένος *Anguis*. Από τους 28 απλότυπους που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, στο είδος *A. cephallonica* αντιστοιχούν εννέα, ενώ στο είδος *A. graeca* αντιστοιχούν 16. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο απλότυποι που αντιστοιχούν στο είδος *A. fragilis* και ένας απλότυπος που χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα και αντιστοιχεί στο είδος *Pseudopus apodus*.

Μέχρι πρότινος, πιστευόταν ότι στον ελλαδικό χώρο απατώνται δύο είδη με εντελώς ανισότιμη εξάπλωση: το είδος *A. fragilis*, που φαινόταν να έχει εξάπλωση σε ολόκληρη την περιοχή της δυτικής Παλαιαρκτικής και το *A. cephallonica* που είχε αναφερθεί από την περιοχή της Πελοποννήσου και τα νησιά Ζάκυνθο, Κεφαλονιά και Ιθάκη του Ιονίου. Σήμερα, γνωρίζουμε πως στην Ελλάδα εμφανίζονται τρεις διαφορετικές εξελικτικές γραμμές που αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη.

Τα παρατηρούμενα επίπεδα ενδοειδικής μιτοχονδριακής ετερογένειας εντός των αλληλουχιών του *A. cephallonica* (0.1% έως 2,8%, με μέσο όρο 1%) είναι συγκρίσιμα με αυτά του *A. graeca* (0.1% έως 2.8%, με μέσο όρο 1.5%). Η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών του γένους *Anguis* (5.3%) είναι μόλις τρεις περίπου φορές μικρότερη από τη μέση γενετική απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών του γένους *Anguis* και της εξωομάδας *Pseudopus apodus* (15.4%). Επίσης, η απόσταση αυτή της τάξης του 15.4% είναι μόλις 1.83

φορές μεγαλύτερη από τη μέση γενετική απόσταση μεταξύ των ειδών *A. cephalionica* και *A. graeca* (8.4%).

9.2 Ενδοειδική γενετική απόσταση

Όπως αναφέρθηκε, τα παρατηρούμενα επίπεδα ενδοειδικής μιτοχονδριακής ετερογένειας εντός των αλληλουχιών του *A. cephalionica* είναι συγκρίσιμα με αυτά του *A. graeca*. Ωστόσο, παρατηρούνται διαφορετικά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης εντός κάθε είδους ξεχωριστά. Μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε εντός του είδους *A. graeca*. Αυτό ίσως να συνδέεται με το γεγονός ότι οι αλληλουχίες που εξετάστηκαν προέρχονται από άτομα με ευρεία γεωγραφική διασπορά που καλύπτει σε μεγάλο βαθμό τη ζώνη εξάπλωσης του είδους στην Ελλάδα. Επίσης, στη γεωγραφική ζώνη στην οποία αντιστοιχούν συναντάται μεγάλη γεωμορφολογική ετερογένεια, ενώ η περιοχή αυτή έχει υπάρξει καταφύγιο κατά τις παγετώδεις περιόδους (Joger *et al.* 2007, Taberlet *et al.* 1998).

Εντός του *A. graeca*, οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις παρατηρούνται για τους απλότυπους που αντιστοιχούν σε περιοχές της Βορείας Ηπείρου και ανήκουν στην Αλβανία (Korce, Dinjake, Dukat). Οι περιοχές αυτές αντιστοιχούν στα βορειότερα σημεία που έχουν συμπεριληφθεί στην ανάλυση. Ως αρκετά διαχωρισμένος γενετικά ακολουθεί ο απλότυπος που προέρχεται από το νησί της Κέρκυρας, ωστόσο σε εγγύτητα με τους απλότυπους που βρίσκονται πιο κοντά γεωγραφικά σε αυτόν από την ηπειρωτική Ελλάδα, όπως κανείς θα περίμενε.

Εντός του είδους *A. cephalionica*, οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις με αξιοσημείωτη διαφορά (2,3 έως 2,8%), παρατηρούνται για τον απλότυπο 1, που αντιστοιχεί στη νοτιότερη περιοχή (Λάγια Λακωνίας) από τις τοποθεσίες προέλευσης των δειγμάτων. Οι μικρότερες γενετικές αποστάσεις (0,1%) αντιστοιχούν μεταξύ δύο απλοτύπων (2 και 3) που αντιστοιχούν σε δύο γειτονικές περιοχές του όρους Μαίναλο, κάτι που δε χρήζει ιδιαίτερης ερμηνείας, και στη γειτονική περιοχή του Αχλαδόκαμπου Λακωνίας. Οι δύο απλότυποι

αυτοί είναι πολύ κοντά εξελικτικά έχοντας πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία, αφού η μόνη νουκλεοτιδική τους μετάλλαξη είναι συνώνυμη. Ίδιας τάξης μικρή γενετική απόσταση εμφανίζεται μεταξύ δύο απλότυπων (7 και 8) που αντιστοιχούν πάλι σε γειτονικές περιοχές του όρους Μαίναλο και του απλότυπου 9 που αντιστοιχεί σε περιοχές του νομού Αχαΐας και στη Λίμνη Στυμφαλία, όπως και σε μία κατά πολύ νοτιότερη περιοχή του νομού Μεσσηνίας.

Το γεγονός της ύπαρξης κοινού απλότυπου μεταξύ περιοχών από τη Βόρεια Αχαΐα, την Κορινθία και τη Μεσσηνία, μεταξύ δηλαδή σχετικά απομακρυσμένων περιοχών, ίσως δείχνει πως στο τρίγωνο που σχηματίζεται από αυτές, το οποίο περικλείει τους προαναφερθέντες απλότυπους 7 και 8, βρίσκουμε μια κοινή εξελικτική γραμμή με κέντρο το όρος Μαίναλο. Για τους τρεις απλότυπους που συναντούμε σε αυτό το γεωγραφικό τρίγωνο, οι απλότυποι που αντιστοιχούν στις περιοχές του όρους Μαίναλο διαφέρουν σε δύο κωδικόνια, ενώ και οι δύο έχουν μία διαφορετική κωδικά σημαντική θέση από τον απλότυπο 9. Τέλος, ο κοινός απλότυπος που προέρχεται από τις δύο περιοχές της Κεφαλονιάς (όρος Αίνος και Λίμνη Άβυθος) φαίνεται να συνδέεται γενετικά περισσότερο με αυτό το γεωγραφικό τρίγωνο.

Τέλος, υπάρχει ένας ακόμη απλότυπος που συναντάται σε δύο περιοχές: η μία αντιστοιχεί σε δύο σημεία του Ταΰγετου και η άλλη στην περιοχή της Γιάλοβας στη νοτιοδυτική Μεσσηνία. Ο απλότυπος αυτός συνδέεται με έναν ακόμα που αντιστοιχεί σε μια τοποθεσία του Ταΰγέτου. Μεταξύ τους χωρίζονται με γενετική απόσταση της τάξης του 0,2%, ενώ διαφέρουν μόνο σε ένα μεταφραστικό για tRNA κωδικόνιο.

10. Τοπολογία δενδρογραμμάτων

10.1 Ο κλάδος για το ελληνικό κονάκι *A. graeca*

Το ελληνικό κονάκι *A. graeca* φαίνεται να ακολουθεί ένα γενικό γεωγραφικό πρότυπο με κατεύθυνση από τον Βορρά προς τον Νότο. Σε αυτήν την εξελικτική γραμμή διαχωρίζονται διαδοχικά πρώτα οι πληθυσμοί των βορειότερων περιοχών, που έχουν συμπεριληφθεί στην ανάλυση. Αυτές αντιστοιχούν στις περιοχές των Korçe (Κορυτσά), Dinjake και Dukat που ανήκουν στην Αλβανία. Στη συνέχεια, διακρίνονται τρεις κλάδοι. Ο πρώτος κλάδος, αντιστοιχεί στις περιοχές Γλυκή στην έξοδο των στενών του ποταμού Αχέρωντα και στο Αμπελοχώρι Ιωαννίνων, και περιλαμβάνει τον απλότυπο που προέρχεται από την Κέρκυρα. Σημειώνεται πως έως και πολύ πρόσφατα, τα νησιά του βόρειου Ιονίου βρίσκονταν σε σύνδεση με την ηπειρωτική χώρα, με τελευταίο διαχωρισμό της Λευκάδας. Η Λευκάδα αποτελούσε μέρος της ηπειρωτικής Ελλάδας, με την Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα και τη Λευκάδα να σχηματίζουν μια ενιαία στεριά, μέχρι και έως 18.000 χρόνια πριν (Λυκούσης κ.α. 1994).

Ο δεύτερος κλάδος συμπεριλαμβάνει απλότυπους που προέρχονται από άτομα που έχουν συλλεχθεί στον ποταμό Αώο σε μια ορεινή περιοχή του νομού Ιωαννίνων, καθώς και σε δύο σημεία των αλβανικών περιοχών Erseke και Himare (Χιμάρα). Σημειώνεται ότι στην ανάλυση μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας, η περιοχή Himare εμφανίζεται ως κοντινός εξελικτικά, ωστόσο διακριτός, κλάδος με έναν κλάδο που σχηματίζεται από τις δύο προαναφερθείσες περιοχές και εμφανίζει απόλυτη στατιστική υποστήριξη.

Τέλος, ο τρίτος κλάδος περιέχει όλους τους υπόλοιπους απλότυπους του είδους. Ο ένας αποτελεί κοινό απλότυπο από το Περτούλι Τρικάλων και το Στόμιο Λάρισας. Στη συνέχεια, έχουμε έναν κοινό απλότυπο από τον ποταμό Μόρνο στον νομό Αιτωλοακαρνανίας και από την περιοχή Αγίου Βασιλείου Πατρών. Δύο απλότυποι προέρχονται από τη Λίμνη Κρεμαστών, που βρίσκεται

μεταξύ των νομών Αιτωλοακαρνανίας και Ευρυτανίας, και των αρχαιολογικό χώρο Βελβίνας του νομού Ευρυτανίας και δύο από τη Λίμνη Δόξα που σχηματίζουν κοινό κλάδο. Οι απλότυποι που αντιστοιχούν στη Λίμνη Κρεμαστών και στην περιοχή της Βελβίνας σχηματίζουν κοινό κλάδο τόσο στην ανάλυση μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας με στατιστική υποστήριξη 89%, όσο και στο δενδρόγραμμα Σύνδεσης Γειτόνων.

Στην ανάλυση με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, το ελληνικό κονάκι *A. graeca* ομαδοποιείται εγγύτερα στο κεφαλλονίτικο κονάκι *A. cephallonica*, από ό, τι στο *A. fragilis*, ωστόσο με πολύ χαμηλή στατιστική υποστήριξη της τάξης του 57%. Από άποψη γενετικής απόστασης, βρίσκεται εγγύτερα στο είδος *A. fragilis*, όπως φαίνεται και στο δένδρο σύνδεσης γειτόνων, κάτι που συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Gvoždík *et al.* 2010, 2013) και με το γεωγραφικό πρότυπο εξέλιξης του κάθε είδους, το οποίο θα συζητήσουμε στη συνέχεια.

10.2 Ο κλάδος για το κεφαλλονίτικο κονάκι *A. cephallonica*

Τα φυλογενετικά δέντρα για τον γενετικό δείκτη που χρησιμοποιήσαμε συμφωνούν, για το είδος *A. cephallonica*, όσον αφορά στη σχέση των κύριων κλάδων με τα γεωγραφικά δεδομένα. Το κεφαλλονίτικο κονάκι *A. cephallonica* φαίνεται να ακολουθεί ένα σαφές γενικό γεωγραφικό πρότυπο εξέλιξης στην Πελοπόννησο και το Ιόνιο, από το νότο προς το βορρά ή τα βορειοδυτικά. Η ανάλυση με τις μεθόδους μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας, μέγιστης πιθανοφάνειας και σύνδεσης γειτόνων συμφωνούν μεταξύ τους και αποκαλύπτουν διακριτές και γεωγραφικά εντοπισμένες επιμέρους γενεαλογικές γραμμές.

Αξιοσημείωτη είναι η γενετική απόσταση που εμφανίζεται μεταξύ του απλότυπου που αντιστοιχεί στην περιοχή Λάγια της ανατολικής Μάνης στον νομό Λακωνίας και όλων των υπόλοιπων. Η περιοχή αυτή είναι η νοτιότερη από τις τοποθεσίες προέλευσης των δειγμάτων. Τα φυλογενετικά δένδρα για τον υποκλάδο του *A. cephallonica* συμφωνούν στην ύπαρξη ενός διακριτού κλάδου,

που αντιστοιχεί στην τοποθεσία αυτή και που στο εξής θα αναφέρουμε ως κλάδο Α.

Σε όλα τα δένδρα, ένας διαφορετικός κλάδος εμπεριέχει άλλους τρεις κύριους (κλάδοι Β, Γ και Δ). Ο πρώτος από αυτούς (κλάδος Β), δείχνει την εξελικτική γραμμή που συνδέει δύο απλότυπους *A. cephallonica*. Ο ένας απλότυπος συναντάται σε δύο περιοχές: η μία αντιστοιχεί σε δύο σημεία του Ταΰγετου και η άλλη στην περιοχή της Γιάλοβας στη νοτιοδυτική Μεσσηνία. Ο άλλος αντιστοιχεί σε μια τοποθεσία του Ταΰγέτου. Μεταξύ τους διαφέρουν μόνο σε ένα μεταφραστικό για tRNA κωδικόνιο, ενώ η στατιστική υποστήριξη για αυτόν είναι 82% και 85% με βάση τις αναλύσεις της μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας και της μέγιστης πιθανοφάνειας, αντίστοιχα.

Ο δεύτερος κλάδος (κλάδος Γ), αντιστοιχεί σε δύο απλότυπους που βρίσκονται πολύ κοντά εξελικτικά, έχοντας πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία. Ο ένας αντιστοιχεί σε δύο πολύ γειτονικά σημεία του όρους Μαίναλο και ο άλλος σε ένα σημείο του όρους Μαίναλο και σε ένα στη γειτονική περιοχή του Αχλαδόκαμπου. Από τους τρεις κλάδους που αναφέρθηκαν, φαίνεται να λαμβάνει την μεγαλύτερη στατιστική υποστήριξη (94% και 100% αντιστοίχως με βάση τις αναλύσεις της μέγιστης πιθανοφάνειας και μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας).

Τέλος, ο κλάδος που ονομάσαμε Δ αφορά τρεις ακόμα απλότυπους του *A. cephallonica*. Οι δύο αντιστοιχούν σε κοντινές περιοχές του όρους Μαίναλο και ενός ακόμα που αντιστοιχεί σε περιοχές του νομού Αχαΐας και στη Λίμνη Στυμφαλία, όπως και σε μία κατά πολύ νοτιότερη περιοχή του νομού Μεσσηνίας. Ο κοινός απλότυπος μεταξύ αυτών των σχετικά απομακρυσμένων περιοχών σχηματίζει ένα μεγάλο γεωγραφικό τρίγωνο που καλύπτει καταρχάς ολόκληρο το βορειοδυτικό τμήμα της Πελοποννήσου, εμφανίζοντας παράλληλα ευρύτερη κατανομή. Συγκεκριμένα, ο απλότυπος που προέρχεται από το όρος Αίνος και τη Λίμνη Άβυθο της Κεφαλονιάς είναι τμήμα αυτού του κλάδου.

Σχετικά με τους τέσσερις κύριους κλάδους που διακρίνονται για το *A. cephallonica*, οι γενετικές αποστάσεις των απλοτυπικών ομάδων, που τους

συγκροτούν, ίσως θα έδιναν ένα παραπάνω στοιχείο για τον τρόπο που αυτοί συνδέονται μεταξύ τους. Ο κλάδος A, που εμφανίζεται ως εξελικτικά πιο απομακρυσμένος, όπως αναφέρθηκε, χωρίζεται από τον κλάδο B με γενετική απόσταση 2.5%, με τον κλάδο Γ με γενετική απόσταση 2.8%, ενώ για τον Δ το ποσοστό είναι 2.4%. Επίσης, ο κλάδος B παρουσιάζεται εξελικτικά εγγύτερα στον κλάδο Δ από ο, τι στον κλάδο Γ, με εξελικτική απόσταση 0.6% έναντι 0.8%. Ο κλάδος Γ παρουσιάζει γενετική απόσταση ίση και από τους δύο κλάδους B και Γ.

Το γενικό γεωγραφικό πρότυπο που φαίνεται να αναδεικνύεται από την παρατήρηση των δενδρογραμμάτων υποδηλώνει μια διαβάθμιση από τον νότο προς τον βορρά. Διάφορες υποθέσεις θα μπορούσαν να γίνουν σχετικά με την ακριβή «διαδρομή». Αρχικά, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε, λαμβάνοντας υπόψη εκτός από τα φυλογενετικά δένδρα και την πληροφορία που παίρνουμε από την εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων, ότι η διαδρομή έχει κατεύθυνση από την γεωγραφική περιοχή που αφορά τον κλάδο A, σε αυτήν που αφορά τον κλάδο B και τελικά στην γεωγραφική περιοχή που καλύπτει την βορειοδυτική Πελοπόννησο και την Κεφαλονιά, που αντιστοιχεί στον κλάδο Δ. Σχετικά με τη γενεολογική γραμμή του κλάδου Γ, αυτή είναι πιθανό να σχηματίζεται παράλληλα με τον Δ, ενώ το όρος Μαίναλο φαίνεται να προσέφερε κατάλληλο καταφύγιο για αυτήν.

Η διασπορά ατόμων *Anguis* από την Πελοπόννησο προς τα Ιόνια νησιά μπορεί να ερμηνευτεί με βάση την εξέλιξη του παλαιογεωγραφικού σκηνικού. Γνωρίζουμε πως ενώ η αρχαία γενεαλογική γραμμή της οικογένειας Anguidae εντοπίζεται στην Ευρώπη πριν από 50 εκατομμύρια χρόνια (Macey *et al.* 1999), 30 εκατομμύρια χρόνια πριν ανυψώθηκε η Αιγαίς, η ενιαία στεριά που περιλάμβανε τη σημερινή νότια Βαλκανική χερσόνησο. Στο ύστερο Μειόκαινο, άρχισε η βύθιση της ελληνικής ζώνης, ενώ στο τέλος του τοποθετείται το κλείσιμο των στενών του Γιβραλτάρ, περίπου πριν από 5.5 εκατομμύρια χρόνια, γεγονός που επηρέασε την εξελικτική και βιογεωγραφική ιστορία πολλών οργανισμών της περιοχής γύρω από τη Μεσόγειο. Για την πιο πρόσφατη παλαιογεωγραφική ιστορία που αφορά το Πλειστόκαινο, γνωρίζουμε πως οι

βασικές αιτίες αλλαγής της γεωγραφίας ήταν αποτέλεσμα των οκτώ κύκλων παγετωδών και μεσοπαγετωδών περιόδων (Beard *et al.* 1982). Υπήρξαν περίοδοι που οι αποστάσεις μεταξύ της ηπειρωτικής Ελλάδας και των νησιών ήταν σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τις σημερινές (Χρονόπουλος, 2010). Μάλιστα, πριν από 22.000 έως 18.000 χρόνια, η Κεφαλονιά, Ιθάκη και Ζάκυνθος ήταν ενωμένες μεταξύ τους και αποτελούσαν ένα νησί. Η δε Λευκάδα αποτελούσε μέρος της ηπειρωτικής Ελλάδας, με την Πελοπόννησο, τη Στερεά Ελλάδα και τη Λευκάδα να σχηματίζουν μια ενιαία στεριά, μέχρι και έως 18.000 χρόνια πριν (Λυκούσης κ.α. 1994).

Η εξελικτική γραμμή του *A. cephallonica* φαίνεται να συναντήθηκε με αυτήν του *A. graeca*, με αποτέλεσμα τη σημερινή μερικώς συμπάτρια εξάπλωσή τους με ζώνη επαφής τη Βόρεια Πελοπόννησο. Η διαχωρισμένη με σαφή τρόπο εξάπλωση των δύο ειδών στα νησιά του νότιου Ιονίου για το *A. cephallonica* και στο βόρειο Ιόνιο για το *A. graeca*, φαίνεται να συνάδει με την ύπαρξη του δεξιόστροφου ρήγματος μετασχηματισμού της Κεφαλονιάς, που στα βόρεια διαχωρίζει τα νησιά του νότιου από τα νησιά του βόρειου Ιονίου.

11. Μορφολογικά και μοριακά δεδομένα

Στην τοπολογία των φυλογενετικών δέντρων, που προέκυψαν από την ανάλυση των αλληλουχιών του μιτοχονδριακού δείκτη της περιοχής του γονιδίου ND2 και της παρακείμενης περιοχής των πέντε tRNAs με τις μεθόδους μπεϋεσιανής συμπερασματολογίας και μέγιστης πιθανοφάνειας, διακρίνονται τρεις κλάδοι, με απόλυτη στατιστική υποστήριξη, που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τα τρία είδη *Anguis* που συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση.

Η σύγχρονη γνώση πάνω στην μορφολογία των ειδών που αναγνωρίστηκαν ως διαφορετικά από το *A. fragilis* με τη φυλογενετική μελέτη του 2010 (Gvoždík *et al.* 2010), καθώς και για το *A. cephallonica*, δεν ήταν σε καμία περίπτωση ακριβής, επειδή οι περισσότερες από τις διαθέσιμες μορφολογικές μελέτες (Wermuth 1950, Voipio 1962, Lac 1967, Shcherban' 1976, Cabela & Grillitsch 1989, Grilitsch & Cabela 1990) έχουν βασιστεί σε δείγματα που εμπεριείχαν μείγματα διαφόρων ειδών, που αναγνωρίζονταν ως μορφότυποι ενός είδους. Ωστόσο, υπάρχουν κάποια χαρακτηριστικά που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως διαγνωστικά μεταξύ των μορφοτύπων που διαχωρίζονταν ως «*fragilis*» ή «*colchica*» και «*cephallonica*». Στη βιβλιογραφία, ο τελευταίος μορφότυπος εμφανίζεται επίσης ως «*cephallonicus*» ή «*pelloronesiacus*» (Dely 1981, Cabela & Grillitsch, 1989, Grilitsch & Cabela 1990).

Από αυτές τις εργασίες μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ως διαγνωστικούς χαρακτήρες για το είδος *A. fragilis* τις ευρέως ενωμένες προμετωπιαίες φολίδες, την απουσία ακουστικού ανοίγματος, την παρουσία 24 έως 26 φολίδων στο μέσον του σώματος, τη σπάνια παρουσία μπλε κηλίδων και μάλιστα μόνο σε αρσενικά άτομα. Για το είδος *A. colchica* ισχύουν ως διαγνωστικοί χαρακτήρες οι συνήθως διαχωρισμένες προμετωπιαίες φολίδες (σπάνια σε μερική και σπανιότερα σε ευρεία ένωση), η συνήθης απουσία διακριτού ακουστικού ανοίγματος, η παρουσία 26 έως 30 φολίδων στο μέσον

του σώματος και η συχνή παρουσία μπλε κηλίδων, συνηθέστερα δε στα αρσενικά άτομα.

Το είδος *A. graeca* παραμένει το λιγότερο μελετημένο μορφολογικά, αφού οι πληθυσμοί του αναγνωρίζονταν ως ενδιάμεσος μορφότυπος των μορφοτύπων «*fragilis*» και «*colchica*», ενώ στις εργασίες των Grillitsch & Cabella αναφέρεται, μεταξύ άλλων, εντελώς αόριστα ως «μορφότυπος από την Πελοπόννησο αλλά όχι *A. cephallonica*». Τα άτομα που προέρχονται από πληθυσμούς *A. graeca*, που συμπεριλήφθηκαν στην εργασία, χαρακτηρίζονται από απουσία ακουστικών ανοιγμάτων, 26 ή 27 φολίδες στο μέσον του σώματος, ενώ δεν λείπουν οι περιπτώσεις με εμφάνιση μπλε κηλίδων ραχιαία και πλευρικά.

Όσον αφορά το *A. cephallonica* (Grillitsch & Cabela 1990), περιγράφεται ως γενικά μεγαλύτερου μεγέθους, με 30 έως 34 φολίδες στο μέσο του σώματος, χωρίς διακριτά ακουστικά ανοίγματα ή μπλε κηλίδες. Επίσης, αναφέρεται ως χαρακτηριστικό η παρουσία μίας φωτεινής γραμμής που οριοθετεί τη σκοτεινή πλευρική περιοχή και την ανοιχτόχρωμη ραχιαία περιοχή στην περιοχή του λαιμού. Στην παρούσα εργασία, τα άτομα που προέρχονται από πληθυσμούς *A. cephallonica* εμφανίζουν κοινό χρωματικό πρότυπο με λιγότερο ή περισσότερο εμφανή οδοντωτή γραμμή στο κεφάλι και αριθμό φολίδων από 30 έως 32.

Σύμφωνα με τον ορισμό του είδους ως ομάδας οργανισμών αναπαραγωγικά συμβατών που διαβιούν σε φυσικούς πληθυσμούς, απομονωμένους γενετικά από άλλες αντίστοιχες ομάδες (Baker & Bradley's 2006), έχουν προταθεί νέα ονόματα για τους διαφορετικούς μορφότυπους του γένους. Ειδικά για τους πληθυσμούς των νοτίων Βαλκανίων, οι πληθυσμοί που μέχρι πρότινος συγχέονταν με τον μορφότυπο «*fragilis*» χρειάζονται πλήρη επαναπροσδιορισμό.

12. Γενικά συμπεράσματα

Το ευρωπαϊκό κονάκι *A. fragilis* έχει χαρακτηριστεί ως είδος ελαχίστου ενδιαφέροντος (Least Concern), σύμφωνα με τα κριτήρια της IUCN (Cox *et al.*, 2006). Πιστεύεται πως η γεωγραφική του εξάπλωσή είναι μεγάλη και θεωρείται κοινό είδος. Εντούτοις, η κρυπτική του οικολογία, κάτι που ισχύει γενικά για το γένος, δυσκόλευε και δυσκολεύει μια άρτια αξιολόγηση των πυκνοτήτων των πληθυσμών του και των πιθανών κινδύνων που μπορεί να αντιμετωπίζει. Η συμβολή της γενετικής στην αποκάλυψη της παρουσίας διαφορετικών ειδών εντός του *A. fragilis* παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανασκευή της στάσης απέναντί του, όσον αφορά στην προστασία και διαχείριση των πληθυσμών του.

Πλέον, μπορεί να υποστηριχθεί πως το είδος *A. fragilis*, που μέχρι πρότινος πιστευόταν ότι εξαπλώνεται στο μεγαλύτερο μέρος της ηπειρωτικής Ελλάδας, έχει το νότιο όριό του στη Βόρεια Ελλάδα. Επίσης, το είδος *A. colchica* δεν θεωρείται πλέον ότι εξαπλώνεται ως τα νότια Βαλκάνια. Η μορφή που συναντάται νοτιότερα στην ηπειρωτική Ελλάδα, μέχρι και την Πελοπόννησο, χωρίς ωστόσο το όριο της εξάπλωσής της στην Πελοπόννησο να μπορεί να ορισθεί με βεβαιότητα, είναι πλέον αποδεκτό ότι αποτελεί ένα διαφορετικό είδος, το ελληνικό κονάκι *A. graeca*. Το είδος *A. graeca* φαίνεται να έχει την πιο μικρή εξάπλωση από όλους τους μορφοτύπους που θεωρούνταν, μέχρι πρότινος, ότι εντάσσονται στο taxon *A. fragilis*. Ως τώρα, περιορισμένη προσοχή έχει δοθεί στο είδος αυτό. Ωστόσο, η περιορισμένη του εξάπλωση θα πρέπει να στρέψει πλέον το ενδιαφέρον στη διερεύνηση της οικολογίας του, καθώς και στην περιοχή της Βαλκανικής Χερσονήσου.

Όσον αφορά στο είδος *Anguis cephalionica*, το κεφαλονίτικο κονάκι, πρόκειται για το ένα από τα εννέα ενδημικά είδη ερπετών που συναντώνται στην Ελλάδα. Παρόλο που η ιδέα της ταξινομικής διαίρεσης των πληθυσμών του τότε αναγνωρισμένου ως *Anguis fragilis* της ευρωπαϊκής ηπείρου είχε τεθεί υπό αμφισβήτηση και είχε συναντήσει δυσκολίες ορισμού, όπως είδαμε παραπάνω,

πολλές φορές στο παρελθόν η ταξινομική αυτονόμηση των πληθυσμών της Πελοποννήσου ως διαφορετικού υποείδους βρήκε, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων (Mertens & Mueller 1940), καθολική αποδοχή. Στην αποδοχή αυτή της ταξινομικής διαφοροποίησης συνέβαλε, φυσικά, η εντονότερα διαφορετική μορφολογία, που είχε μελετηθεί με συστηματικό τρόπο από το 1990 (Grilitsch & Cabela 1990).

Η ακριβής εξάπλωση των τριών ειδών που απαντώνται στην Ελλάδα δεν είναι επακριβώς προσδιορισμένη. Ειδικά για την περίπτωση του κοινού ευρωπαϊκού είδους *A. fragilis*, που εξαπλώνεται από την Ιβηρική Χερσόνησο προς τα ανατολικά στην Κεντρική Ευρώπη (Τσεχία, νοτιοδυτική Σλοβακία), ενώ φαίνεται να προχωρεί στην Ουγγαρία δυτικά του ποταμού Δούναβη (Musters & in den Bosch, 1982), στα βόρεια προς τη δυτική Σκανδιναβία και στα νοτιοανατολικά προς την Ιταλική Χερσόνησο και τα νοτιοδυτικά Βαλκάνια (Völkl & Alfermann 2007). Η βόρεια Ελλάδα φαίνεται να είναι το νοτιότερο όριο εξάπλωσής του. Η παρουσία του στην Ελλάδα θα μπορούσε να συνάδει με την υπόθεση της παρουσίας ενός απομονωμένου καταφυγίου στη Βουλγαρία (για παράδειγμα, στην οροσειρά της Ροδόπης). Η παρουσία ή η απουσία του *A. fragilis* στα βορειοδυτικά Βαλκάνια δεν είναι επαρκώς μελετημένη. Είναι πιθανό ότι οι πληθυσμοί της Ελλάδας και της Βουλγαρίας δεν είναι απομονωμένοι αλλά συνδέονται με κάποιο τρόπο με τους παραδουνάβιους πληθυσμούς.

Είναι πολύ πιθανό ότι και τα τρία είδη που παλαιότερα θεωρούνταν συνδεδεμένα σε επίπεδο είδους (*A. fragilis*, *A. colchica* και *A. graeca*) συναντώνται κάπου στα βόρεια Βαλκάνια, ενώ η εξάπλωσή τους παραπέμπει σε παραπάτρια ειδογένεση, αυτό όμως δεν αποκλείει τις περιπτώσεις συμπατρίας, όπως στην περίπτωση των *A. graeca* και *A. cephalonica* στη βόρεια Πελοπόννησο. Επίσης, αν και η προτεινόμενη εξάπλωση για το *A. colchica* φαίνεται να ανταποκρίνεται στο μορφότυπο “colchica”, όπως έχει περιγραφεί (Arnold 2002, Dely 1981, Petzold 1971, Volkl & Alfermann 2007), κάτι τέτοιο δεν ισχύει στην περίπτωση των νότιων Βαλκανίων, όπου υπάρχει το *A. graeca*.

Στις ζώνες επαφής των διαφορετικών ειδών *Anguis*, ο βικαριανισμός είναι πιθανό σενάριο ειδογένεσης, όπως έχει δειχθεί στην περίπτωση των πληθυσμών της Βουλγαρίας (Beshkov 1966). Εντούτοις, δεν υπάρχει κανένα στοιχείο που να παραπέμπει σε οποιαδήποτε διαδικασία υβριδισμού. Υπάρχουν τέσσερις ζώνες επαφής *A. graeca* / *A. fragilis*, *A. fragilis* / *A. colchica*, *A. colchica* / *A. graeca* και *A. cephallonica* / *A. graeca*. Στην τελευταία, ωστόσο, περίπτωση της ζώνης επαφής των *A. graeca* και *A. cephallonica*, οι δύο εξελικτικές γραμμές που αντιστοιχούν στο κάθε ένα από τα δύο είδη δεν δείχνουν κοινή γεωγραφική καταγωγή.

Το κεφαλονίτικο κονάκι φαίνεται ξεκάθαρα πως ακολουθεί μια γενετική διαβάθμιση από τα νότια με βόρεια κατεύθυνση προς την Κεφαλονιά. Το πιο ευκρινές στοιχείο αυτής της διαβάθμισης μας δίνει ο απλότυπος του *A. cephallonica* που προέρχεται από τη νοτιότερη περιοχή της Πελοποννήσου, αφού φαίνεται σαφώς να είναι ο πιο διακριτός από αυτούς που προσδιορίστηκαν από τα υπόλοιπα άτομα του δείγματος της μελέτης και που αντιστοιχούν στους τρεις κλάδους Β, Γ και Δ, όπως εξηγήθηκε παραπάνω. Η πρόσφατη γεωγραφική απομόνωση των νότιων Ιόνιων νήσων από την Πελοπόννησο, φαίνεται να επέτρεψε την παράλληλη εξέλιξη των απλοτύπων που προέρχονται από άτομα της Κεφαλονιάς και της Πελοποννήσου, και τη μικρή σχετικά διαφοροποίησή τους.

Τα διαφορετικά εξελικτικά πρότυπα, γενετικές αποστάσεις και τοπολογίες των ειδών *A. graeca* και *A. cephallonica* αποκλείουν μια κοινή γενεαλογική γραμμή στον ελλαδικό χώρο, που μπορεί να οδήγησε στη σημερινή εξάπλωση του γένους σε αυτόν. Σε συνδυασμό με το στοιχείο της μικρότερης γενετικής απόστασης που συνδέει το *A. graeca* με το *A. fragilis*, φαίνεται να επαληθεύεται η υπόθεση ότι το κεφαλονίτικο κονάκι αντιστοιχεί σε διαφορετικό εξελικτικό κλάδο από αυτόν που αντιστοιχεί στα δύο άλλα είδη. Οι δύο εξελικτικές γραμμές φαίνεται να συναντήθηκαν με αποτέλεσμα την παρούσα μερικώς συμπάτρια εξάπλωσή τους στη βόρεια Πελοπόννησο.

Άλλωστε, έχει ήδη προταθεί (Macey *et al.* 1999) ότι η αρχαία γενεαλογική γραμμή των σαυρών *Anguinae* εισήλθε στην Ευρώπη από τη Βόρεια Αμερική κατά το Ηώκαινο (50 εκατομμύρια χρόνια πριν), πριν τον σχηματισμό του Βόρειου Ατλαντικού και στη συνέχεια επεκτάθηκε σε δύο κατευθύνσεις: νότια προς τη Βόρεια Αφρική και στα ανατολικά προς τη Δυτική Ασία.

Η παρούσα εργασία επιχείρησε να διαλευκάνει τμήμα της εξελικτικής διαφοροποίησης εντός του γένους *Anguis*. Ζητούμενο είναι να μπορέσει να συμβάλει σε μελλοντικές προσπάθειες περαιτέρω διερεύνησης αυτής της διαφοροποίησης, όπως και σε μελέτες που θα ασχοληθούν με τη διαχείριση των πληθυσμών, των ειδών του γένους.

Βιβλιογραφία

- Arnold, E.N., 2002. Reptiles and amphibians of Europe, second ed. Princeton Univ. Press, Princeton and Oxford.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J.C., 1992. Molecular Population Structure and the Biogeographic History of a Regional Fauna: A Case History with Lessons for Conservation Biology. *Oikos* 63:62-76.
- Avise, J.C., 2000. Phylogeography. The history and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Baker, R.J., Bradley, R.D., 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *J. Mammal.* 87: 643–662.
- Beard, J.H., Sangree, J.B., Smith, L.A., 1982. Quaternary Chronology, Paleoclimate, Depositional Sequences and Eustatic Cycles. *Am. Ass. Petrol. Geol.* 66: 158-169.
- Beheregaray, L.B., 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* 17: 3754-3774.
- Beshkov, V., 1966. Investigations on the systematics and distribution of the slow worm (*Anguis fragilis* L.) in Bulgaria. *Bull. Inst. Zool. Mus.* 21: 185–201.
- Box, G.E.P., Tiao, G.C., 1973. Bayesian Inference in Statistical Analysis, Wiley, Reading MA.
- Briggs, J., C., 1987. Biogeography and Plate Tectonics. Elsevier, Amsterdam.

- Bringsoe, H., 1985. A check-list of Peloponnesian Amphibians and Reptiles, including new records from Greece. *Ann. Musei. Goulandris*, 7: 271-318.
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., Rylandas, A.B., Konstant, W.R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., Hilton-Taylor, C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv. Biol.* 16: 909–923.
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 1967–1971.
- Brown, B.W., Newey, W.K., 2002. Generalized Method of Moments, Efficient Bootstrapping, and Improved Inference. *Journal of Business and Economic Statistics*, 20: 507-517.
- Cabela, A., Grillitsch, H., 1989. Zum systematischen Status der Blindschleiche (*Anguis fragilis* Linnaeus, 1758) von Nordgriechenland und Albanien (Squamata: Anguidae). *Herpetozoa* 2: 51–69.
- Chakraborty, A., Sakai, M., Iwatsuki, Y., 2006. Museum fish specimens and molecular taxonomy: A comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. *J. Appl. Ichthyol.* 22: 160–166.
- Chondropoulos, B.P., 1986. A checklist of the Greek reptiles. I. The lizards. *Amphibia-Reptilia*, 7: 217-235.
- Cox, N., Chanson, J., Stuart, S., 2006. The Status and Distribution of Reptiles and Amphibians of the Mediterranean Basin. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Cyren, O., 1941. Beiträge zur Herpetologie der Balkanhalbinsel. *Mitt. Kgl. Naturw. Inst. Sofia* 14: 36-152.
- Dely, O.G., 1981. *Anguis fragilis* Linnaeus 1758 – Blindschleiche. In: Böhme, W. (Ed.), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*. Band 1. Echsen (Sauria) 1. AULA-Verlag, Wiesbaden, 241–258.

- Dewey, J., F., Cande, S., Pitman, W., C., 1989. Tectonic evolution of the India/Eurasia collision zone. *Ecologiae Geol. Helv.* 82: 717–734.
- Doglioni, C., Agostini, S., Crespi, M., Innocenti, F., Manetti, P., Riguzzi, F., Savasçin, Y., 2002. On the extension in western Anatolia and the Aegean sea. *J. Virtual Explorer* 7: 167-181.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary Trees from DNA-Sequences - a Maximum-Likelihood Approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368–376.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Felsenstein, J., 2006. Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci? *Mol. Biol. Evol.* 23: 691–700.
- Gauthier, J.A., 1982. Fossil xenosaurid and anguid lizards from the early Eocene Wasatch Formation, southeast Wyoming, and a revision of the Anguioidea. *Contr. Geol. Univ. Wyoming* 21: 7–54.
- Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Statist. Sci.* 7: 457-472.
- Geyer, C.J., 1991. Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. In: Keramidas, E.M. (Ed.), *Computing Science and Statistics: Proceedings of the 23rd Symposium of the Interface*, Interface Foundation, Fairfax Station, VA, 156–163.
- Gibbons, J.W., Scott, D.E, Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C.T., 2000. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *BioScience* 50: 653-666.
- Graur, D., Li, W.H., 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Grillitsch, H., Cabela, A., 1990. Zum systematischen Status der Blindschleichen (Squamata: Anguidae) der Peloponnes und der südlichen Ionischen Inseln (Griechenland). *Herpetozoa* 2: 131–153.

- Gvoždík, V., Jandzik, D., Lymberakis, P., Jablonski, D., Moravec, J., 2010. Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) as a species complex: genetic structure reveals deep divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 460–472.
- Gvoždík, V., Benkovsky, N., Crottini, A., Bellati, A., Moravec, J., Romano, A., Sacchi, R., Jandzik, D., 2013. An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguidae), survived in the Italian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, in press.
- Hasegawa, M., Kishino, K., Yano, T., 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160–174.
- Hewitt, G.M., 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Mol. Ecol.* 10: 537–549.
- Holman, A.J., 1970. Herpetofauna of the Wood Mountain formation (Upper Miocene) of Saskatchewan. *Can. J. Earth Sci.* 7: 1317–1325.
- Hsü, K.J., Montadert, L., Bernoulli, D., Cita, M.B., Erickson, A., Garrison, R.E., Kidd, R.B., Mélières, F., Müller, C., Wright, R.H., 1977. History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* 267: 399–403.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.P., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.M. (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, 21–132.
- Kimura, M., 1969. The rate of evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 454–458.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.

- Kuehnelt, W., 1941. Zoologische Ergebnisse einer von Prof. Dr. Jan VERSLUYS geleiteten Forschungsfahrt nach Zante.- Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien; 88/89: 109-214.
- Lác, J., 1967. To the systematics of the slow worm (*Anguis fragilis* L.) and its distribution in Slovakia. *Biológia* (Bratislava) 22: 908–921.
- Lambeck, K., 1996. Sea-level change and shore-line evolution in Aegean Greece since Upper Palaeolithic time. *Antiquity* 70: 588–611.
- Lamoreux, J.F., Morrison, J.C., Ricketts, T.H., Olson, D.M., Dinerstein, E., McKnight, M.W., Shugart, H.H., 2006. Global tests of biodiversity concordance and the importance of endemism. *Nature* 440: 212–214.
- Le Pichon, X., Angelier, J., 1981. The Aegean Sea. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London A* 300: 357–372.
- Leekley, D., Noyes, R., 1979. *Archaeological Excavations in Southern Greece*, Noyes Press. New Jersey.
- Lenk, P., Fritz, U., Joger, U., Winks, M., 1999. Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). *Mol. Ecol.* 8: 1911–1922.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Luo, A., Qiao, H., Zhang, Y., Shi, W., Ho, S.Y.W., Xu, W., Zhang, A., Zhu, C., 2010. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evol. Biol.* 10: 242.
- Macey, R.J., Schulte II, J.A., Larson, A., Tuniyev, B.S., Orlov, N., Papenfuss, T.J., 1999. Molecular phylogenetics, tRNA evolution, and historical biogeography in anguid lizards and related taxonomic families. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 250–272.

- Mahnert, V., 1973. Recherches zoologiques dans les iles Ioniennes.-Rev. Mus. Genève; 131: 2-6.
- Mayer, W., Grillitsch, H., Cabela, A., 1991. Proteinelektrophoretische Untersuchungen zur Systematik der südgriechischen Blindschleiche (Squamata: Anguinae). Herpetozoa 4: 157-165.
- Mertens, R., Müller L., 1940. Liste der Amphibien und Reptilien Europas (Zweite Liste, nach dem Stand vom 1.Januar 1960).. Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft 451: 1-56.
- Mertens, R., Wermuth, H., 1960. Liste der Amphibien und Reptilien Europas (Dritte Liste, nach dem Stand vom 1.Januar 1960). Waldemar Kramer, Frankfurt a. M.
- Meszoely, C., Haubold, H., 1975. The status of the Middle Eocene Geiseltal limbless anguid lizards. Copeia 1975: 36-43.
- Meulenkamp J.E., 1985. Aspects of the Late Cenozoic evolution of the Aegean region. In D. J. Stanley and F.C. Wezel (eds) Geological evolution of Mediterranean Basin (eds), New York: Springer-Verlag, 307-321.
- Moritz, C.D.M., Faith, D., 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. Mol. Ecol. 7: 419-429.
- Moritz, C.D.M., Hillis, 1996. Molecular systematics: Context and controversies. Pp. 1-13 in Molecular Systematics, 2nd. ed. (D. M. Hillis, B. K. Mable, and C. Moritz, eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Mount, W.D., 2004. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis. CSHL Press, eNew York
- Musters, C.,J.,M., in den Bosch, H.,J.,A., 1982. Einige Bemerkungen zu den Unterarten von *Anguis fragilis* L., mit Berücksichtigung niederländischer Exemplare (Reptilia: Sauria: Anguinae). Salamandra 18: 196-204.

- Nass, M.M., Nass, S., 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *The Journal of Cell Biology* 19: 593 – 611.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Ondrias, J.C., 1968. Liste des Amphibiens et des Reptiles de Grèce. *Biol- Gallo-Hellen* 1: 111-135.
- Page, R.D.M., 2011. Space, time, form: Viewing the Tree of Life. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 113–120.
- Page, R.D.M., Holmes, E.C., 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford.
- Perissoratis, C., Conispoliatis, N., 2003. The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). *Mar Geol* 196: 145-156.
- Petzold, H.G., 1971. *Blindschleiche und Scheltopusik. Die Familie Anguidae. Die Neue Brehm-Bücherei* 448. A. Ziemsen, Wittenberg-Lutherstadt.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D.V., Littlewood, D.T.J., Manuel, M., Wörheide, G., Baurain, D., 2011. Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough. *PLoS Biol.* 9: 602.
- Posada, D., 2003. Selecting model of evolution. In: Salemi, M., Vandamme, A.M. (Eds.), *The Phylogenetic Handbook. A practical approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press, Cambridge, 256-282.
- Posada, D., 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.*: 25, 1253-1256.
- Posada, D., Buckley, T.R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53: 793-808.

- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Saitu, N., 1996. Reconstruction of gene trees from sequence data. *Methods in Enzymology*, 266: 427-449.
- Saitu, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Shackleton, R., M., Chang, C., 1988. Cenozoic uplift and deformation of the Tibetan Plateau: The geomorphological evidence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 327: 365-377.
- Shanks, M., 1996. *Classical Archaeology of Greece. Experiences of the discipline.* Routledge, London.
- Shcherban', M.I., 1976. To the intraspecific systematics of the slow worm (Reptilia, Sauria, *Anguis fragilis* L.). *Sborn. Trud. Zool. Mus. (Kiev)* 36: 81-83.
- Shiozawa, D.K., Kudo, J., Evans, R.P., Woodward, S.R., Williams, R.N., 1992. DNA extraction from preserved trout tissues. *Great Basin Nat.* 52: 29-34.
- Souyoudzoglou-Haywood, C., 1999. *Ionian Islands in the Bronze Age and Early Iron Age, 3000-800 BC.* Liverpool University Press.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stepanek, O., 1944. Zur Herpetologie Griechenlands.- *Vest. Ccsk. Zool. Spolec, Pra/.c*; 9: 123-147.
- Stojanov, A., 2001. Beobachtung einer Kopulation zwischen den beiden Unterarten der Blindschleiche (*Anguis fragilis* L.). *Historia Naturalis Bulgarica* 13: 155-157.

- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic Inference. In *Molecular systematics*, 2nd edition, chap. 5, 407-514. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-G., Cosson, J.-F., 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* 7: 453-464.
- Tajima, F., Nei, M., 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1: 269-285.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Toubeau, G., Cotman, C., Bels, V., 1994. Morphological and kinematic study of the tongue and buccal cavity in the lizard *Anguis fragilis* (Reptilia:Anguidae). *Anat Rec. Nov* 240: 423-433.
- Valakos, E.D., Pafilis, P., Sotiropoulos, K., Lymberakis, P., Maragou, P., Foufopoulos, J. 2008. *The Amphibians and Reptiles of Greece*. Chimaira, Frankfurt am Main.
- Voipio, P., 1962. Multiple phaneromorphism in the European slow-worm (*Anguis fragilis*) and the distributional and evolutionary history of the species. *Ann. Zool. Soc. 'Vanamo'*, 23: 1-20.
- Völkl, W., Alfermann, D., 2007. Die Blindschleiche–die vergessene Echse. *Z. Feldherpetologie*, Beiheft 11. Laurenti-Verlag, Bielefeld.

- Wermuth, H., 1950. Variationsstatistische Untersuchung der Rassen- und Geschlechtsmerkmale bei der Blindschleiche (*Anguis fragilis* Linné). Dtsch. Zool. Z. 1: 81-121.
- Werner, F., 1894. Die Reptilien- und Batrachierfauna der ionischen Inseln.- Sitzber. Zool.-Bot. Ges. Wien; 44: 225-237.
- Werner, F., 1938. Die Amphibien und Reptilien Griechenlands.- Zoologica, Stuttgart; 35(94): 1-117.Dtsch. Zool. Z. 1: 81-121.
- Willemsen, R.E., Hailey, A., 2001. Effects of spraying the herbicides 2,4-D and 2,4,5-T on a population of the tortoise *Testudo hermanni* in southern Greece. Environmental Pollution 113: 71-78.
- Wilson, M.J., 2006. Herpetological observations on the Greek islands of Kefallinia and Zakynthos. Herpetological Bulletin 97: 19-28.
- Zuckermandl, E., Pauling, L., 1965. Molecules as Documents of Evolutionary History. Theoret Biol, 8:357-366.
- Zylberberg, L., Castanet, L., 1985. New data on the structure and the growth of the osteoderms in the reptile *Anguis fragilis*. J. Morphol. 186: 327-342.
- Κορνήλιος, Π., 2012. Συμβολή στη μελέτη της φυλογεωγραφίας στην Ανατολική Μεσόγειο: η περίπτωση του εδαφόβιου φιδιού *Typhlops vermicularis* Merrem, 1820. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών. Διδακτορική διατριβή.
- Κυριαζή, Π., 2008. Μιτοχονδριακό DNA και η γενεαλογία των φιδιών της Κρήτης: σύγκριση των φυλογεωγραφικών τους προτύπων. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Μεταπτυχιακή διατριβή.
- Λεγάκις, Α. και Μαραγκού, Π. (επιμέλεια), 2009. Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας, Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, 180.
- Λεγάκις, Α., Τζαννετάτου-Πολυμένη, Ρ.Μ., Γκιώκας, Σ., Σωτηρόπουλος, Κ., 2010. Ζωική Ποικιλότητα. Τομέας Ζωολογίας και Θαλάσσιας Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών. 200.

- Λυκούσης, Β., Παυλάκης, Π., Αναγνώστου, Χ., Ρουσάκης, Γ., Αλεξανδρή, Μ., 1994. Εξέλιξη της ανωτεταρτογενούς ιζηματογένεσης και γεωτεκτονικής του ανατολικού τμήματος του Κεντρικού Αιγαίου. Δελτίον της Ελληνικής Γεωλογικής Εταιρίας, 30: 401-410.
- Πουλακάκης, Ν., 2005. Διερεύνηση των φυλογενετικών διεργασιών στις σαύρες του γένους *Podarcis* (Sauria: Lacertidae) του ελληνικού χώρου. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Διδακτορική διατριβή.
- Στρατηγική Μελέτη Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων (ΣΜΠΕ) του ΠΕΠ Δυτικής Ελλάδας, Πελοποννήσου και Ιόνιων νήσων, 2007 – 2013. P.S.G. Περιβαλλοντική Γεω-Ερευνητική Ε.Π.Ε. Διαθέσιμη στο: <http://www.dytikiellada-peloponnisos-ionio.gr/el/pages/SMPE.aspx>
- Τσαγκάρη Κ., Καρέτσος Γ., 2010. Κλίμα και βλάστηση της Πελοποννήσου. WWF-Ελλάς.
- Φαρμακάκη, Α., 2012. Κλιματικός Άτλαντας Ελλάδος. Διατμηματικό Πρόγραμμα «Περιβάλλον και Ανάπτυξη», Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Μεταπτυχιακή διατριβή.
- Χρονόπουλος, Κ., 2010. Παλαιογεωγραφική αναπαράσταση του ελληνικού αρχιπελάγους τα τελευταία 150.000 χρόνια με την χρήση του Arcgis / Arcview. Τμήμα Γεωλογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών. Μεταπτυχιακή διατριβή.