



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ - ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γενετική ποικιλότητα και στοιχεία οικολογίας
των πληθυσμών του ζαρκαδιού (*Capreolus capreolus*)
στην Ελλάδα



Δημήτρης Τσαπάρης
Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2011

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ & ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Γενετική ποικιλότητα και στοιχεία οικολογίας
των πληθυσμών του ζαρκαδιού (*Capreolus capreolus*)
στην Ελλάδα

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δημήτρης Τσαπάρης
Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2011

NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCES
FACULTY OF BIOLOGY
SECTION OF ZOOLOGY & MARINE BIOLOGY

Genetic diversity and aspects of ecology of roe deer
(*Capreolus capreolus*) populations in Greece.

PhD THESIS

Dimitris Tsaparis

Biologist

ATHENS 2011

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λεγάκις Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κωτούλας Γεώργιος, Ερευνητής Α΄

Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών

Τζαννετάτου - Πολυμένη Ρόζα-Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικολαΐδου Άρτεμις, Καθηγήτρια

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μυλωνάς Μωσής, Καθηγητής

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σκούρας Ζαχαρίας, Καθηγητής

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κωτούλας Γεώργιος, Ερευνητής Α΄

Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών

Λεγάκις Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βαλάκος Ευστράτιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τζαννετάτου - Πολυμένη Ρόζα-Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003.

Το έργο συγχρηματοδοτήθηκε κατά 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο), 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο - Υπουργείο Ανάπτυξης (Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας) και από τον Ιδιωτικό Τομέα, στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα (Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης).

Τίτλος υποέργου

Μελέτη της γενετικής ποικιλότητας πληθυσμών του ζαρκαδιού (*Capreolus capreolus*) και του πλατωνιού (*Dama dama*) (Αρτιοδάκτυλα Θηλαστικά).

Κωδικός υποέργου

03ΕΔ 305

Επιστημονικός υπεύθυνος

Λεγάκις Αναστάσιος

Φορέας Υλοποίησης

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συνεργαζόμενοι Φορείς

- Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών
- Οργανισμός Περιβάλλοντος Δήμου Ροδίων

Φορείς Συγχρηματοδότησης

- Αθ. & Δημ. Τάσος Α.Ε (Περιβαλλοντικό Κέντρο Μπουραζάνι)
- Δημοτική Επιχείρηση Πολιτισμού, Αθλητισμού, Τουρισμού, Ανάπτυξης Δήμου Λινδίων (ΔΕΠΑΤΑΛ)

- Όσο γνωρίζεις πιο βαθιά, τόσο αγάπης πιο πλέρια.
- Όσο και πιο πολύ αγάπης, και πιο πολύ γνωρίζεις.

Κ. Παλαμάς

στους γονείς μου Κώστα και Ελένη
και στον νουό μου Φωκίωνα

*Αντί προλόγου**

Ο χώρος και ο χρόνος, οι συνθήκες, οι άνθρωποι και οι συνέργειές τους ακόμη και τυχαία γεγονότα είναι παράγοντες που αλληλεπιδρώντας επηρεάζουν την πορεία εκτέλεσης ενός οποιουδήποτε έργου και τελικά διαμορφώνουν το τελικό αποτέλεσμα. Μια ερευνητική εργασία όπως η παρούσα διδακτορική διατριβή, δεν θα μπορούσε να αποτελεί εξαίρεση. Αν και κατά κανόνα η προσπάθεια κρίνεται «εκ του αποτελέσματος», για μένα η ίδια η ενασχόληση με το συγκεκριμένο θέμα δηλαδή η πορεία προς το αποτέλεσμα (πολλές φορές μέσα από σαράντα κύματα) υπήρξε ένα παραγωγικό και συνάμα συναρπαστικό ερευνητικό ταξίδι, που με δίδαξε πολλά, μου προσέφερε πολύτιμες εμπειρίες και τη χαρά της γνωριμίας και συνεργασίας με σημαντικούς ανθρώπους. Εντέλει με έκανε να αγαπήσω ακόμη περισσότερο την επιστήμη που σπούδασα και αποφάσισα να υπηρετήσω ερευνητικά.

Με τη συγγραφή της διατριβής κορυφώνεται μια διαδρομή που ξεκινά ήδη από τα φοιτητικά μου χρόνια, όταν ίσως και με μια δόση ρομαντισμού και «άγνοιας κινδύνου», επιχείρησα να ασχοληθώ με την πληθυσμιακή οικολογία του ζαρκαδιού στα πλαίσια μιας διπλωματικής εργασίας. Η έλλειψη οικονομικών πόρων αλλά και μιας συμπαγούς ερευνητικής ομάδας που να εργάζεται σε σχετικά θέματα (π.χ. οικολογία μεγάλων θηλαστικών) και επομένως να μπορεί να υποστηρίξει και να καθοδηγήσει τις προσπάθειές μου, οδήγησαν αναπόφευκτα στην εγκατάλειψη του εγχειρήματος. Παρόλα αυτά η συστηματική βιβλιογραφική έρευνα και οι λιγοστές εξορμήσεις και έρευνες πεδίου εκείνης της περιόδου συνετέλεσαν στην απόκτηση πολύτιμων γνώσεων και εμπειριών, που αποτέλεσαν τη «μαγιά» για τη μετέπειτα ουσιαστικότερη ενασχόληση στα πλαίσια μιας διδακτορικής διατριβής. Η σημαντικότερη ίσως διαπίστωση από την πρώιμη εκείνη ενασχόληση ήταν πως το ζαρκάδι, παρά την αυταπόδεικτη οικολογική του αξία για τα δασικά οικοσυστήματα της Ελλάδας αλλά και τα προβλήματα διατήρησης που αντιμετωπίζει στη χώρα μας, δεν έχει τύχει ανάλογης ερευνητικής μελέτης.

Από την μακρινή περίοδο της διπλωματικής εργασίας έως και σήμερα σταθερή ήταν η παρουσία και η αρωγή στις προσπάθειές μου του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αναστάσιου Λεγάκη. Πάντα με διακριτική καθοδήγηση και ευγένεια και χωρίς ίχνος πατερναλιστικών προθέσεων, μου επέτρεψε να αναπτύξω σε κλίμα ακαδημαϊκής ελευθερίας τις όποιες ερευνητικές μου δραστηριότητες (διπλωματική εργασία, ερευνητικά προγράμματα, διδακτορική διατριβή) στις οποίες υπήρξε επιβλέπων ή επιστημονικός υπεύθυνος. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την στήριξή όλα αυτά τα χρόνια.

** Στις πρώτες αυτές γραμμές, με τις οποίες προσπαθώ να σκιαγραφήσω το γενικότερο «περιβάλλον» στο οποίο εκπονήθηκε η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή και να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, ας μου επιτραπεί μια πιο προσωπική γραφή που παρεκκλίνει από την τοπικότητα ενός προλόγου σε επιστημονικό κείμενο.*

Ο κ. Γιώργος Κωτούλας, Ερευνητής Α΄ ως μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, ήρθε να προσθέσει την πολύτιμη γνώση και ερευνητική του εμπειρία και έδωσε λύση στο πρόβλημα απαιτητικής εργαστηριακής υποδομής για την πραγματοποίηση των γενετικών αναλύσεων. Τον ευχαριστώ για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Γενετικής του ΕΛΚΕΘΕ στην Κρήτη αλλά και για τις ατέλειωτες, δαιδαλώδεις αλλά πάντα χρήσιμες και ενθαρρυντικές συζητήσεις μας, για την εγκάρδια υποστήριξη καθώς και για την ειλικρινή του αγάπη και πίστη στους νέους επιστήμονες.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στην Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ρόζα Πολυμένη, επίσης μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, τόσο για την φιλοξενία στο εργαστήριό της όπου πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πρωτογενών μοριακών αναλύσεων όσο κυρίως για το αδιάλειπτο ενδιαφέρον, την ειλικρινή συμπαράσταση αλλά και την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε όποτε κι αν της ζητήθηκε.

Τους Καθηγητές κα. Άρτεμη Νικολαΐδου, κ. Μωσή Μυλωνά, κ. Ζαχαρία Σκούρα καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευστράτιο Βαλάκο ευχαριστώ για την τιμή που μου έκαναν να αποδεχθούν την κλήση τους ως μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής καθώς και για τις πολύτιμες διορθώσεις και παρατηρήσεις τους πάνω στο τελικό κείμενο της διατριβής. Τον κ. Βαλάκο ευχαριστώ επιπλέον για τη βοήθειά του στη γραφιστική επιμέλεια του τελικού κειμένου.

Ιδιαίτερη μνεία και εγκάρδιες ευχαριστίες οφείλω σε τρεις πολύ καλούς φίλους και συνεργάτες των οποίων η εξειδικευμένη συμβουλή, υπήρξε καταλυτικός παράγοντας για την ευόδωση της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ το Στέλιο Κατσανεβάκη εκλεγμένο Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αιγαίου, τον Κώστα Σωτηρόπουλο Λέκτορα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον Παναγιώτη Κασαπίδη Ερευνητή Γ΄ του ΕΛΚΕΘΕ. Ο καθένας στον τομέα εξειδίκευσής του μου έδωσε τη δυνατότητα να διδαχτώ από την εμπειρία και τη γνώση του τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο. Επίσης οι ουσιαστικές παρατηρήσεις και επισημάνσεις τους συνετέλεσαν στη βελτίωση του τελικού κειμένου της διατριβής.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής απαιτήσε εξ αντικειμένου πολυάριθμες εξορμήσεις στο πεδίο, μετακινήσεις που κάλυψαν το σύνολο σχεδόν της χώρας και πολυήμερες διαμονές «εκτός έδρας». Αν σε αυτά προστεθούν οι «ακριβές» σε εξοπλισμό και αναλώσιμα εργαστηριακές αναλύσεις, γίνεται κατανοητό ότι το εγχείρημα υπήρξε από οικονομικής σκοπιάς ιδιαίτερα απαιτητικό και ότι δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την απαραίτητη οικονομική υποστήριξη. Ένα σημαντικό μέρος των οικονομικών απαιτήσεων καλύφθηκε χάρη στη χρηματοδότηση που εξασφαλίστηκε στο πλαίσιο του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003. Ευχαριστώ το Περιβαλλοντικό Κέντρο Μπουραζάνι (Αθ. & Δημ. Τάσος Α.Ε) που συνεισέφερε τμήμα της συγχρηματοδότησης καθώς και τους

ανώνυμους αξιολογητές της ΠΤΕΤ που μέσω της θετικής τους εισήγησης πρόκριναν τη χρηματοδότηση της μελέτης.

Ευχαριστίες οφείλω, επίσης, στους Δασάρχες και το προσωπικό των Δασαρχείων Καλαβρύτων, Αμφισσας, Λάρισας και Σερρών για τη βοήθεια που προσέφεραν στη συλλογή δειγμάτων και στην ομαλή διεξαγωγή των ερευνών πεδίου. Με ιδιαίτερη προθυμία και πέραν των αυστηρά υπηρεσιακών τους καθηκόντων στήριξαν με όποιο τρόπο μπορούσαν αυτή την προσπάθεια.

Τη Χριστίνα Σταμούλη και την Ειρήνη Ντόλκα, οι οποίες εκπόνησαν τις διπλωματικές τους εργασίες στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθεια που παρείχαν στην πραγματοποίηση των απαιτητικών δειγματοληψιών εκτίμησης αφθονίας του πληθυσμού των Καλαβρύτων. Με ενθουσιασμό, επιμονή και ενδιαφέρον συνεργάστηκαν άψογα μαζί μου και με συντρόφεψαν στις εξορμήσεις πεδίου.

Η διενέργεια του κύριου όγκου των γενετικών εργαστηριακών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής του ΕΛΚΕΘΕ. Ευχαριστώ τους ερευνητές, το προσωπικό αλλά και τους φοιτητές με τους οποίους συνυπήρξα στο εργαστήριο, για την αγάπη και την εκτίμηση με την οποία με περιέβαλαν, επιτρέποντάς μου από την πρώτη στιγμή να νιώσω οικεία και άνετα σε έναν άγνωστο μέχρι τότε ερευνητικό χώρο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την τεχνικό Βάσω Τερζόγλου, που βοήθησε στη γρήγορη εξοικείωσή μου με τις τεχνικές και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου.

Η παρουσία και η βοήθεια των φίλων, υπήρξε αναμφίβολα μια παράμετρος που συνέβαλε στην ευόδωση της προσπάθειάς μου. Τους καλούς μου φίλους Παναγιώτη Παφίλη, Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών και Γιάννη Αναστασίου, διδάκτορα Βιολογίας, ευχαριστώ θερμά γιατί με αγάπη, πίστη και συντροφικότητα με παρότρυναν όλα αυτά τα χρόνια και συνετέλεσαν στη διατήρηση ψυχικής ηρεμίας αλλά και επιστημονικής εγρήγορσης. Ευχαριστώ επίσης μέσα από την καρδιά μου τη φίλη και συνοδοιπόρο από τα φοιτητικά μας χρόνια Ελένη Γουργού, μεταδιδακτορική ερευνήτρια σήμερα του Πανεπιστημίου του Μίσιγκαν, για την σταθερή της παρουσία και την αγάπη της. Όσο κανένας άλλος άκουγε και κατανοούσε τα προβλήματα, τα «αδιέξοδα», τις ανασφάλειές μου και με την ήρεμη προσέγγισή της με στήριξε στις δύσκολες στιγμές. Την ευχαριστώ γιατί ήταν πάντα εκεί, όποτε αναζήτησα τη βοήθεια, τη συμβουλή, τη «φυγή».

Στους γονείς μου Κώστα και Ελένη Τσαπάρη οφείλω πολλά. Όχι μόνο για την αμέριστη συμπαράσταση ή την ηθική και οικονομική ενίσχυση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, αλλά κυρίως γιατί πάντα στήριξαν και στηρίζουν τις όποιες επιλογές μου με εμπιστοσύνη, αγάπη και υπομονή. Τους ευχαριστώ γιατί με το παράδειγμά τους με έμαθαν να αγαπώ και να εμπιστεύομαι τους ανθρώπους, να παλεύω για το καλύτερο και να προσπαθώ για το πιο δίκαιο. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο νονό μου Φωκίωνα Καψάλη, έναν φανατικό λάτρη των ελληνικών βουνών, που ανιδιοτελώς παλεύει επί δεκαετίες για την

προστασία της ηπειρώτικης φύσης. Εκεί στα πανέμορφα βουνά του Ζαγορίου, που περπατήσαμε μαζί, πρωτοδιδάχθηκα την αγάπη για το φυσικό περιβάλλον και ξύπνησε μέσα μου το ενδιαφέρον για τη μελέτη του.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
Γενική εισαγωγή	1
1.1 Το ευρωπαϊκό ζαρκάδι: «η βιολογία της επιτυχίας»	3
<i>Ταξινόμηση και Φυλογένεση</i>	5
<i>Εξωτερική μορφολογία</i>	7
<i>Γεωγραφική κατανομή και αφθονία</i>	8
<i>Ενδιαίτηματα</i>	10
<i>Διατροφικές στρατηγικές και προσαρμογές</i>	11
<i>Αναπαραγωγή και αναπαραγωγική φυσιολογία</i>	12
<i>Κοινωνική συμπεριφορά και οργάνωση</i>	13
<i>Θηρευτές</i>	13
<i>Απειλές</i>	14
1.2 Το ζαρκάδι στην Ελλάδα – πόσο καλά το γνωρίζουμε;	15
<i>Κατανομή στο παρελθόν</i>	16
<i>Σύγχρονη κατανομή και σημαντικές περιοχές εξάπλωσης</i>	18
<i>Πληθυσμιακές πυκνότητες</i>	20
<i>Επιλογή και χρήση ενδιαιτήματος</i>	21
<i>Απειλές</i>	22
1.3 Σκοπός της διατριβής	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
Γενετική ποικιλότητα του ζαρκαδιού στην Ελλάδα	25
2.1 Εισαγωγή	27
<i>Η γενετική ποικιλότητα ως σημαντική συνιστώσα της βιοποικιλότητας</i>	27
<i>Πληθυσμιακό μέγεθος και γενετική ποικιλότητα</i>	29
<i>Γενετική δομή και διατήρηση απειλούμενων πληθυσμών</i>	30

	Σελ.
<i>Η μελέτη της φυλογεωγραφίας στην υπηρεσία της διατήρησης και της διαχείρισης</i>	32
<i>Γενετικοί δείκτες</i>	33
<i>Γενετικές μελέτες του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού</i>	35
<i>Στόχοι και ερωτήματα</i>	39
2.2 Υλικά και Μέθοδοι	41
2.2.1 <i>Δειγματοληψία</i>	41
2.2.2 <i>Εξαγωγή και ποσοτικοποίηση DNA</i>	44
2.2.3 <i>Πολλαπλασιασμός και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA</i>	45
2.2.4 <i>Αναλύσεις μιτοχονδριακού DNA</i>	48
2.2.5 <i>Πολλαπλασιασμός μικροδορυφορικών δεικτών και γονοτύπηση των δειγμάτων</i>	55
2.2.6 <i>Αναλύσεις μικροδορυφορικών δεικτών</i>	59
2.2.7 <i>Αναλύσεις συσχέτισης</i>	70
2.3 Αποτελέσματα	73
2.3.1 <i>Απομόνωση DNA</i>	73
2.3.2 <i>Μιτοχονδριακό DNA</i>	73
2.3.3 <i>Μικροδορυφορικό DNA</i>	85
2.3.4 <i>Αποτελέσματα συσχετίσεων</i>	109
2.4 Συζήτηση	111
<i>Φυλογεωγραφία του ζαρκαδιού – η θέση του ελληνικού ζαρκαδιού</i>	111
<i>Η γενετική ποικιλότητα του ελληνικού ζαρκαδιού</i>	116
<i>Γενετική δομή και διαφοροποίηση μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών</i>	122
<i>Από την περιγραφή στη διαχείριση</i>	128
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
Εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων εκτίμησης της αφθονίας	135
3.1 Εισαγωγή	137
<i>Σύντομη ανασκόπηση</i>	137
<i>Η καταμέτρηση των περιττωμάτων ως έμμεση μέθοδος εκτίμησης της αφθονίας</i>	138

	Σελ.
<i>Η χρήση των μεθόδων καταμέτρησης περιττώματων στα ελαφοειδή</i>	139
<i>Τα περιττώματα του ζαρκαδιού</i>	141
<i>Στόχοι και ερωτήματα</i>	142
3.2 Περιοχή και πληθυσμός μελέτης	143
3.3 Εφαρμογή της μεθόδου FAR	147
3.3.1 <i>Γενικά</i>	147
3.3.2 <i>Έρευνα πεδίου</i>	149
3.3.3 <i>Αναλύσεις</i>	152
3.3.4 <i>Αποτελέσματα</i>	153
3.4 Εφαρμογή της μεθόδου FSC με δειγματοληψία αποστάσεων	157
3.4.1 <i>Γενικά</i>	157
3.4.2 <i>Μεθοδολογία δειγματοληψίας αποστάσεων</i>	159
3.4.3 <i>Έρευνα πεδίου</i>	166
3.4.4 <i>Αναλύσεις</i>	168
3.4.5 <i>Αποτελέσματα</i>	170
3.5 Πείραμα υπολογισμού του χρόνου αποικοδόμησης	177
3.5.1 <i>Γενικά</i>	177
3.5.2 <i>Εργασία πεδίου</i>	178
3.5.3 <i>Ανάλυση</i>	179
3.5.4 <i>Αποτελέσματα</i>	182
3.6 Συζήτηση	187
<i>Ευστοχία</i>	188
<i>Ακρίβεια</i>	189
<i>Προσπάθεια</i>	193
<i>Ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης</i>	195
<i>Το διάστημα συσσώρευσης</i>	198
<i>Πρακτικές δυσκολίες εφαρμογής</i>	199
<i>Συνολική αποτίμηση και δυνατότητα χρήσης των μεθόδων σε προγράμματα παρακολούθησης</i>	201

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
Κατακλείδα	205

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	211
---------------------	------------

<i>Ξενογλώσση</i>	213
-------------------	-----

<i>Ελληνική</i>	243
-----------------	-----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	247
------------------	------------

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	265
---------------------	------------

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	271
-------------------	------------

<i>Περίληψη</i>	273
-----------------	-----

<i>Summary</i>	277
----------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Γενική Εισαγωγή



Το ευρωπαϊκό ζαρκάδι : «η βιολογία της επιτυχίας»

Αυτή την εντυπωσιακή πρόταση επέλεξαν οι συγγραφείς Andersen, Duncan και Linnell (1998) -ίσως και με μια πρόθεση «πρόκλησης» του αναγνώστη- ως τίτλο για τη μονογραφία τους, που αποτελεί την πιο πρόσφατη και ολοκληρωμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση της συσσωρευμένης επιστημονικής γνώσης για τη βιολογία του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού (*Capreolus capreolus*, Linnaeus 1758). Υιοθετήσαμε τον ίδιο τίτλο για την εισαγωγή της παρούσας διατριβής γιατί -αν και επιστημονικά αδόκιμος και στα όρια του λεκτικού ακροβατισμού- συμπυκνώνει με τον πιο αντιπροσωπευτικό ίσως τρόπο την μακραιώνη και απόλυτα επιτυχημένη φυσική ιστορία του συγκεκριμένου είδους. Μια σειρά ιδιαίτερων βιολογικών χαρακτηριστικών, με τα οποία «προικίστηκε» εξελικτικά, του επέτρεψαν να επιζήσει επί μακρόν και να ακμάσει, εποικίζοντας ποικιλία ενδιαιτημάτων στο σύνολο σχεδόν της έκτασης της ευρωπαϊκής ηπείρου. Ενώ λοιπόν, πολλά θηλαστικά προσελκύουν τη σύγχρονη οικολογική έρευνα και την προσοχή κυβερνητικών ή μη, περιβαλλοντικών οργανώσεων επειδή αντιμετωπίζουν το φάσμα της εξαφάνισης, το ζαρκάδι απολαμβάνει μια ιδιότυπη μοναξιά ανήκοντας σε μια μικρή ομάδα ειδών άγριας πανίδας που επέζησαν ή ακόμη και ευδοκίμησαν, παρά την αύξηση του πληθυσμού και της έντασης των καταστρεπτικών για το περιβάλλον δραστηριοτήτων του ανθρώπινου είδους. Η αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητά του, εξειδικευμένη σε στοιχεία της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας, του επέτρεψε να αντιμετωπίσει τις γρήγορες αλλαγές των ενδιαιτημάτων του, να εξαπλωθεί σε νέες ή να επανεποικίσει περιοχές στις οποίες είχε εκλείψει και τελικά να φθάσει, όταν οι συνθήκες ήταν βέλτιστες, σε κατά τόπους πολύ υψηλές πληθυσμιακές πυκνότητες. Σήμερα θεωρείται το πλέον άφθονο είδος άγριου οπληφόρου στην Ευρώπη (Danilkin 1996) και ένα από τα πιο επιτυχημένα θηλαστικά.

Πολυάριθμες αποθέσεις σκελετικού υλικού ζαρκαδιών, που βρέθηκαν σε παλαιοντολογικές και αρχαιολογικές ανασκαφές, μαρτυρούν ότι ο άνθρωπος υπήρξε εδώ και χιλιάδες χρόνια ένας από τους θηρευτές του συγκεκριμένου είδους. Ως πολύτιμο στοιχείο του περιβάλλοντος και οικεία φιγούρα της καθημερινότητας του ανθρώπου-κυνηγού, το ζαρκάδι αποτυπώνεται ήδη στις πρώιμες απόπειρες ανθρώπινης καλλιτεχνικής έκφρασης, όπως αποκαλύπτουν βραχογραφίες της Νεολιθικής εποχής. Οι πρώτες γραπτές αποδείξεις της παρουσίας του -που αποτελούν ταυτόχρονα σε κάποιες περιπτώσεις πρωτόλειες περιγραφές της οικολογίας και της συμπεριφοράς του- εντοπίζονται σε κείμενα αρχαίων Ελλήνων συγγραφέων (βλ. Αριστοτέλης: «*Περί Ζώων*», Ξενοφών: «*Κυνηγετικά*», Πausanias: «*Αρκαδικά*»), όπου αναφέρεται κυρίως ως «*πρόξ*» ή σπανιότερα ως «*δορκάς*». Η παλαιότερη αναφορά (8^{ος} - 7^{ος} αιώνας π.Χ.) προέρχεται από το ομηρικό έπος της Οδύσσειας, που μαζί με τη Ιλιάδα

αποτελούν τα αρχαιότερα γραπτά κείμενα της ελληνικής γραμματείας (βλ. Voultziadou & Tatolas 2005). Η πρώτη μονογραφία με πληροφορίες για τη βιολογία του είδους δημοσιεύτηκε τη δεκαετία του 1890 από τον Γερμανό Ferdinand von Raesfeld (*Das Rehwild*, μτφ Το Ζαρκάδι) και για αρκετά χρόνια αποτέλεσε τη «βίβλο» όσων ασχολούνταν με αυτό. Η εθνικότητα του συγγραφέα κάθε άλλο παρά τυχαία είναι. Ήδη από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα στη γερμανόφωνη κεντρική Ευρώπη είχε εγκαθιδρυθεί ένα σταθερό κυνηγετικό σύστημα και υπήρχε επομένως αυξημένο ενδιαφέρον για τα θηρεύσιμα είδη (*game species*), όπως το ζαρκάδι, αλλά και συσσωρευμένη εμπειρική γνώση που προέκυπτε από τις παρατηρήσεις των κυνηγών.

Η ουσιαστική ερευνητική ενασχόληση με το είδος ξεκινά τη δεκαετία του 1950 από τη Δανία, όταν οι ιδέες του Αμερικανού Aldo Leopold (1887-1948), θεμελιωτή του μόλις τότε αναδυόμενου επιστημονικού κλάδου «Βιολογία της Άγριας Ζώης (*Wildlife Biology*), επηρεάζουν τους ευρωπαίους επιστήμονες και τους οδηγούν στη θεώρηση των θηραματικών ειδών υπό νέο πρίσμα. Η παραδοσιακή κεντροευρωπαϊκή «ανάμειξη» της ζωολογίας με την παρατήρηση των κυνηγών παύει να θεωρείται πλέον επαρκής, αφού η διατήρηση και η διαχείριση της άγριας πανίδας οφείλει να στηρίζεται στην αξιόπιστη επιστημονική έρευνα και όχι στην εικασία και τον εμπειρισμό. Τα χρόνια που ακολούθησαν, κυρίως από τη δεκαετία του 1970 και μετά, εκατοντάδες επιστημονικές εργασίες και δεκάδες μονογραφίες δημοσιεύονται για το ζαρκάδι, ως αποτέλεσμα της εκτεταμένης ερευνητικής ενασχόλησης που επεκτείνεται τόσο γεωγραφικά καλύπτοντας περιοχές εξάπλωσης του είδους που δεν είχαν μελετηθεί (βλ. Danilkin 1996), όσο και θεματικά, φωτίζοντας πολυάριθμες πτυχές της βιολογίας του (εξέλιξη, φυσιολογία, οικολογία, συμπεριφορά, πληθυσμιακή βιολογία). Η ευρεία κατανομή και η αφθονία του, το αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω της οικολογικής του αξίας για τα ευρωπαϊκά οικοσυστήματα αλλά και η ανάγκη εφαρμογής ορθών διαχειριστικών πρακτικών στο πλαίσιο της εκμετάλλευσής του ως θήραμα, είναι οι βασικοί παράγοντες που συνδυαστικά οδήγησαν στην εντατικοποίηση της έρευνας για το ζαρκάδι, καθιστώντας το σήμερα ένα από τα πλέον μελετημένα είδη θηλαστικών.

Με δεδομένη τη συσσώρευση γνώσης, δημιουργείται η αμφιβολία για το αν νέες μελέτες για το ζαρκάδι έχουν κάτι ιδιαίτερα σημαντικό να προσφέρουν. Η ανάπτυξη όμως καινοτόμων μεθοδολογικών και αναλυτικών εργαλείων, επιτρέπει σε αρκετές περιπτώσεις τη διατύπωση νέων ή την επαναπροσέγγιση παλαιών ερωτημάτων, τον έλεγχο κυρίαρχων υποθέσεων και εν τέλει μια ουσιαστικότερη μετάβαση από την περιγραφή του «τι υπάρχει ή τι συμβαίνει» στην προσπάθεια κατανόησης του «γιατί υπάρχει ή γιατί συμβαίνει». Επιπλέον, αρκετές περιοχές εξάπλωσης του είδους παραμένουν σχετικά «παρθένες» από ερευνητικής άποψης (π.χ. νοτιοανατολική Ευρώπη) ενώ σε κάποια πεδία της βιολογίας του (π.χ. πληθυσμιακή βιολογία, φυλογεωγραφία) ανοιχτά ζητήματα συντηρούν το ενδιαφέρον και διεγείρουν την ανάπτυξη ενός γόνιμου επιστημονικού διαλόγου.

Οι Andersen *et al.* (1998) παρατηρούν εύστοχα ότι: «όσο περισσότερο γνωρίζουμε το ζαρκάδι, τόσο σαφέστερη γίνεται η διαπίστωση πως πρόκειται για ένα πολύ ιδιαίτερο ζώο». Στις επόμενες παραγράφους, και πριν προχωρήσουμε στην περιγραφή των στόχων που έθεσε η παρούσα μελέτη, σκιαγραφούμε με αδρές γραμμές το πορτραίτο του, αναδεικνύοντας κάποια από εκείνα τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερο και επιτυχημένο ως είδος.

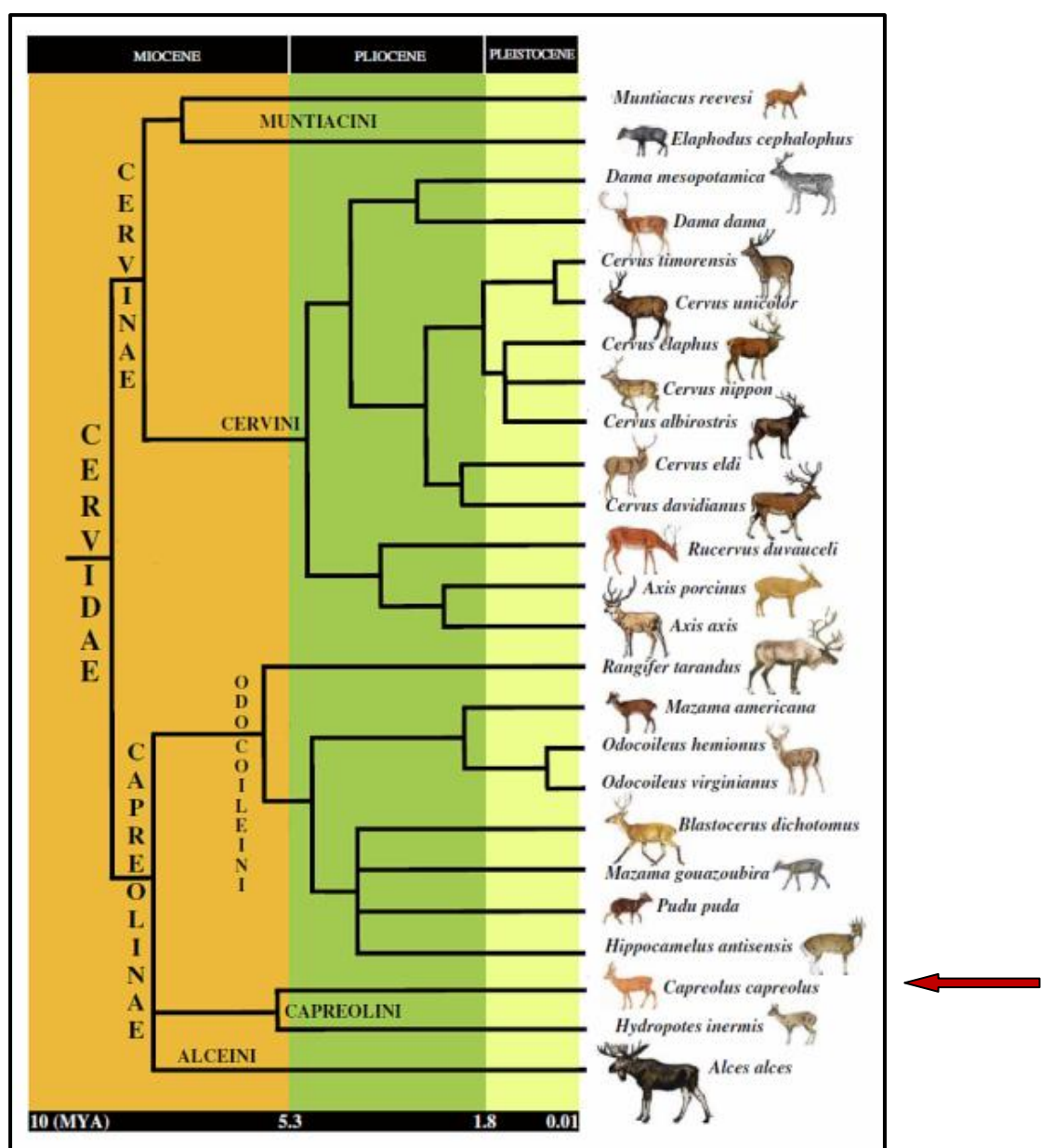
Ταξινόμηση και Φυλογένεση

Το ζαρκάδι είναι ένα ελαφοειδές του οποίου η ταξινομική και φυλογενετική θέση υπήρξε αντικείμενο διαμάχης. Αν και κατά καιρούς αντιμετωπίστηκε ως ένα ευρασιατικό γένος με ένα και μοναδικό είδος, πλέον είναι ευρέως αποδεκτό ότι υπάρχουν δύο αλλοπάτρια είδη ζαρκαδιού (Groves & Grubb 1987, Grubb 1993, Danilkin 1996, Andersen *et al.* 1998): το πιο μεγάλωμο ζαρκάδι της Σιβηρίας (*Capreolus pygargus*, Pallas 1777) που εξαπλώνεται κυρίως στην Ασία (Σιβηρία, βόρεια και κεντρική Κίνα, Μογγολία, Κορέα) και το μικρόσωμο ευρωπαϊκό ζαρκάδι (*Capreolus capreolus*, Linnaeus 1758) με κατανομή κυρίως ευρωπαϊκή. Τα δύο είδη, εκτός από το μέγεθος, παρουσιάζουν διαφορές σε μια σειρά διαγνωστικών μορφομετρικών χαρακτήρων καθώς και στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (καρυότυπος), ενώ τα περισσότερα υβριδικά αρσενικά άτομα που γεννήθηκαν σε αιχμαλωσία ήταν στείρα (Sokolov & Gromov 1990, Danilkin 1996). Οι αλλοπάτριες κατανομές τους, με μια πιθανή στενή ζώνη επαφής μεταξύ Δνειπερου και Βόλγα στη δυτική Ρωσία (Danilkin 1996), το διαθέσιμο αρχείο απολιθωμάτων αλλά κυρίως μοριακές φυλογενετικές αναλύσεις (αλληλουχιών του μιτοχονδριακού DNA) υποδηλώνουν ότι τα δύο είδη διαχωρίστηκαν στα όρια Πλειόκαινου/Πλειστόκαινου και έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα για ένα διάστημα 2-3 εκατομμυρίων χρόνων περίπου (Randi *et al.* 1998b).

Σε ένα υψηλότερο ταξινομικό επίπεδο, το γένος *Capreolus* (Gray 1821) συμπεριλαμβάνεται στην οικογένεια των ελαφοειδών (Cervidae). Πολυάριθμες μελέτες της συστηματικής κατάταξης και της φυλογένεσης της οικογένειας, που έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς (για ανασκόπηση βλ. Danilkin 1996, Lister *et al.* 1998, Randi *et al.* 1998a, Randi *et al.* 2001), έχουν προτείνει διάφορες ομαδοποιήσεις των ειδών σε ανώτερα taxa. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη από αυτές (Gilbert *et al.* 2006), η οποία στηρίχθηκε σε μοριακά δεδομένα μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA, το ευρωπαϊκό ζαρκάδι ακολουθεί την κατάταξη που παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1.1., ενώ οι φυλογενετικές σχέσεις εντός της οικογένειας αποτυπώνονται με τη βοήθεια του σύνθετου δενδρογράμματος της Εικόνας 1.1.1.

Πίνακας 1.1.1 : Συστηματική κατάταξη του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού (σύμφωνα με Gilbert *et al.* 2006)

Βασίλειο	Animalia	Ζώα
Φύλο	Chordata	Χορδωτά
Υπόφυλο	Vertebrata	Σπονδυλόζωα
Ομοταξία	Mammalia	Θηλαστικά
Τάξη	Artiodactyla	Αρτιοδάκτυλα
Υπόταξη	Ruminantia	Μηρυκαστικά
Οικογένεια	Cervidae	Ελαφοειδή
Υποοικογένεια	Capreolinae	-
Φυλή (tribe)	Capreolini	-
Γένος	<i>Capreolus</i>	Ζαρκάδι
Είδος	<i>Capreolus capreolus</i>	Ευρωπαϊκό ζαρκάδι



Εικόνα 1.1.1 : Δενδρόγραμμα της φυλογένεσης των ελαφοειδών.

Πηγή: Gilbert *et al.* 2006

Εξωτερική μορφολογία

Το ευρωπαϊκό ζαρκάδι είναι ένα μικρόσωμο ελαφοειδές (18-32kg) λεπτής σωματοδομής (βλ. Εικόνα 1.1.2). Οι βασικές διαστάσεις δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ενήλικων ατόμων των δύο φύλων (χαμηλά επίπεδα φυλετικού διμορφισμού) και κυμαίνονται από 107 έως 126 εκατοστά για το μήκος του σώματος και από 66 έως 83 εκατοστά για το ύψος μέχρι τους ώμους (Danilkin 1996). Ο ελαφρώς πιο εύρωστος σωματότυπος και η παρουσία κεράτων στα αρσενικά ζαρκάδια είναι χαρακτηριστικά άμεσης διάκρισης.

Τα κέρατα ή οι όποιες κρνιακές αποφύσεις (cranial appendages) αναπτύσσονται σε όλα τα ελαφοειδή (οικογένεια Cervidae) μόνο στα αρσενικά άτομα και αλλάζουν κάθε χρόνο με μια διαδικασία πτώσης και επανέκφυσης (deciduous antlers). Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι βασικές συναπομορφίες που διακρίνουν τα ελαφοειδή ως ομάδα από τα υπόλοιπα Μηρυκαστικά (Janis & Scott, 1987). Στα αρσενικά ζαρκάδια τα κέρατα σε πλήρη ανάπτυξη έχουν λίγες διακλαδώσεις (τρεις κορυφές), μήκος που κυμαίνεται μεταξύ 18 και 26 εκατοστά, πέφτουν το φθινόπωρο (Νοέμβριο με Δεκέμβριο) και αμέσως μετά αρχίζουν να αναπτύσσονται τα νέα (Sempéré & Boissin 1983, Danilkin 1996).

Ο χρωματισμός και η υφή του τριχώματός του μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του έτους. Το χειμώνα είναι γκριζωπό με πυκνές και σχετικά χοντρές τρίχες, ενώ το καλοκαίρι γίνεται καφεκόκκινο, κοντότερο και με λεπτότερες τρίχες. Τα κάτω μέρη του σώματος έχουν ανοιχτότερο χρώμα και το κάτοπτρο (γλουτοί) είναι λευκό. Τα νεογνά εμφανίζουν χαρακτηριστικό στικτό χρωματισμό.



Εικόνα 1.1.2 : Εξωτερική μορφολογία αρσενικού (αριστερά) και θηλυκού ατόμου.

Φωτογραφία.: Wikipedia

Γεωγραφική κατανομή και αφθονία

Η σύγχρονη γεωγραφική κατανομή του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού παρουσιάζεται στο χάρτη της εικόνας 1.1.3, που προέρχεται από την επίσημη ιστοσελίδα της IUCN (*International Union for Conservation of Nature*, Lovari *et al.* 2008). Παρατηρούμε μια σχεδόν καθολική παρουσία του είδους στην Ευρώπη, αφού απαντάται στο σύνολο των χωρών της ηπείρου, με εξαίρεση τα νησιωτικά κράτη της Ισλανδίας και της Ιρλανδίας, τα οποία φαίνεται ότι δεν αποτέλεσαν ποτέ μέρος της ιστορικής του εξάπλωσης (Lister *et al.* 1998, Hufthammer & Aaris-Sørensen, 1998). Απουσιάζει επίσης από όλα τα νησιά της Μεσογείου. Ανατολικά φθάνει έως τη Φινλανδία (την οποία εποίκισε κατά τη δεκαετία του 1970, βλ. Danilkin 1996), τις χώρες της Βαλτικής, τη Λευκορωσία, την Ουκρανία και τις δυτικότερες περιοχές της Ρωσίας. Στο βορρά, το ζαρκάδι έχει πλέον μόνιμη παρουσία στο σύνολο σχεδόν της Σκανδιναβικής χερσονήσου, μετά από επέκταση της ιστορικής του κατανομής προς τις βορειότερες περιοχές κατά το τελευταίο μισό του 20^{ου} αιώνα (Danilkin 1996). Στη νότια Ευρώπη είναι παρόν και στις τρεις χερσονήσους (Ιβηρική, Ιταλική, Βαλκανική) αν και η κατανομή που δίνεται για την Ελλάδα στο χάρτη της Εικόνας 1.1.3 δεν είναι αντιπροσωπευτική της πραγματικής κατάστασης (αναλυτικά στοιχεία στο Κεφάλαιο 1.2). Στην Ασιατική ήπειρο εξαπλώνεται από τη Μικρά Ασία και μέσω της Τουρκίας βορειοανατολικά ως τη Γεωργία, την Αρμενία, και το Αζερμπαϊτζάν και νοτιοανατολικά έως το βόρειο Ιράν (Lister *et al.* 1998). Επίσης, έχει αναφερθεί η παρουσία του ακόμη και σε περιοχές του Ιράκ, της Συρίας, του Λιβάνου, της Ιορδανίας και της Παλαιστίνης (Harrison & Bates 1991). Με μια προσεγγιστική ανάλυση ο Danilkin (1996), υπολόγισε τη συνολική έκταση κατανομής του είδους στα μέσα της δεκαετίας του 1980 σε 5.500.000 km².

Σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών εξάπλωσής του παρατηρείται όσον αφορά το μέγεθος των τοπικών πληθυσμών (Burbaitè & Csányi 2009). Οι πλέον ακμαίοι πληθυσμοί (υψηλές πληθυσμιακές πυκνότητες) εντοπίζονται κυρίως στην Κεντρική και Δυτική Ευρώπη ενώ αντίθετα στις νότιες και βόρειες περιφερειακές περιοχές οι πληθυσμοί εμφανίζουν ελαττωμένη πυκνότητα (Danilkin 1996, Lovari *et al.* 2008). Η σύγκριση δύο αντιπροσωπευτικών πληθυσμών από τις περιοχές αυτές είναι ενδεικτική των σημαντικών αποκλίσεων που παρατηρούνται. Στην Ιταλία ζουν περίπου 400.000 άτομα (Lorenzini *et al.* 2002) ενώ στη Γερμανία, μόνο αυτά που θηρεύονται νόμιμα κάθε χρόνο αγγίζουν το ένα εκατομμύριο (Mitchell-Jones *et al.* 1999). Σύμφωνα με την IUCN ο πληθυσμός του είδους σήμερα προσεγγίζει τα 15 εκατομμύρια άτομα (Lovari *et al.* 2008), ενώ σύμφωνα με τους Mitchell-Jones *et al.* (1999) ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί μόνο στον πληθυσμό της κεντρικής Ευρώπης. Οι πολύ υψηλές πυκνότητες που έχουν παρατηρηθεί σε κάποιες περιοχές έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν προβλήματα σε καλλιέργειες και στην εμπορική δασοκομία λόγω

υπερβόσκησης (Putman 1996, Cederlund *et al.* 1998), υπαγορεύοντας την ανάγκη για έλεγχο του μεγέθους των τοπικών αυτών πληθυσμών.

Το μέγεθος του συνολικού πληθυσμού παρουσίασε κατά τους τελευταίους αιώνες σημαντικές διακυμάνσεις ως αποτέλεσμα των ανθρωπογενών παρεμβάσεων. Η τροποποίηση και η καταστροφή των ενδιαιτημάτων του ζαρκαδιού από τον 18^ο αιώνα στη δυτική και από τον 19^ο αιώνα στην ανατολική Ευρώπη, οδήγησε σε σταδιακή μείωση τόσο του εύρους κατανομής όσο και της αφθονίας του (Danilkin 1996). Η πίεση στους πληθυσμούς του ζαρκαδιού ενισχύθηκε από τη εντατικοποίηση της θήρευσης, με την εφεύρεση και χρήση αποτελεσματικότερων όπλων. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, σε αρκετές περιοχές της Κεντρικής και Δυτικής Ευρώπης, αντιμετώπισε το φάσμα της εξαφάνισης. Η επανάκαμψη των πληθυσμών στις περιοχές αυτές άρχισε από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα (Danilkin 1996) ως αποτέλεσμα του ελέγχου του κυνηγιού, της πρακτικής εμπλουτισμού πληθυσμών με μεταφορά ζώων και της συστηματικής εξόντωσης από τον άνθρωπο των μεγάλων σαρκοφάγων που αποτελούν τους σημαντικότερους φυσικούς θηρευτές του είδους (π.χ. λύκος, λύγκας, αλεπού). Κατά τη διάρκεια των μεγάλων πολέμων του 20^{ου} αιώνα οι πληθυσμοί υπέστησαν μια δεύτερη ξαφνική μείωση αλλά από τη δεκαετία του 1950 και μετά παρατηρείται μια συνεχής αυξητική τάση του συνολικού πληθυσμού.



Εικόνα 1.1.3 : Χάρτης κατανομής του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού.

Πηγή: IUCN (Lovari *et al.* 2008)

Ενδιατήματα

Σημαντικό στοιχείο που ερμηνεύει εν πολλοίς την ευρεία και επιτυχημένη εξάπλωση του ζαρκαδιού είναι η ικανότητά του να εποικίζει ποικιλία ενδιατημάτων. Κατά βάση θα μπορούσε να χαρακτηριστεί δασόβιο είδος αφού έχει βρεθεί σε όλα σχεδόν τα δασικά οικοσυστήματα της Ευρώπης, δηλαδή σε δάση πλατύφυλλων φυλλοβόλων, δάση κωνοφόρων και σε μεσογειακά ή μεικτά δάση. Φαίνεται ωστόσο ικανό να καταλαμβάνει ακόμη και υγρότοπους, θαμνώδεις εκτάσεις, ή ξηρά ημι-ερημικά οικοσυστήματα (Andersen *et al.* 1998). Μόνο οι αλπικές περιοχές μεγάλου υψομέτρου (πάνω από το δασόριο) και οι εκτεταμένες ανοιχτές χορτολιβαδικές εκτάσεις φαίνεται να χρησιμοποιούνται σπάνια ως ενδιατήματα. Η ανεκτικότητα του στην ανθρώπινη παρουσία (Linnell & Andersen 1995) έχει επιτρέψει στο ζαρκάδι να επιτύχει πρόσφατα ακόμη και τον εποικισμό «τεχνητών» ή τροποποιημένων από τον άνθρωπο οικοσυστημάτων, όπως φυτώρια και καλλιεργούμενα δάση, ανοιχτές εκτάσεις εντατικής καλλιέργειας στη δυτική και ανατολική Ευρώπη ακόμη και περιαστικά δάση και κήποι (Tufto *et al.* 1996, Hewison *et al.* 1998).

Η καταλληλότητα ενός ενδιατηματος για κάποιο είδος εξαρτάται από ένα σύμπλεγμα βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων και καθορίζεται από το αν και κατά πόσο η διαθεσιμότητα συγκεκριμένων πόρων καλύπτει τις απαιτήσεις του είδους (Miller & Harley 2001, Pullin 2002). Οι βασικές απαιτήσεις του ζαρκαδιού φαίνεται να είναι η τροφή και η κάλυψη προς αποφυγή της θήρευσης (Tufto *et al.* 1996, Duncan *et al.* 1998, Aanes *et al.* 1998). Η αναγκαιότητα για κάλυψη προκύπτει γιατί το ζαρκάδι δεν ανήκει στα «δρομευτικά» οπληφόρα (cursorial), δηλαδή δεν έχει τη δυνατότητα να διανύει γρήγορα μεγάλες αποστάσεις. Ως μικρόσωμο ζώο μπορεί όμως να χρησιμοποιεί περιορισμένα σε έκταση δασικά τμήματα (patches), θαμνώδεις συστάδες ακόμη και περιοχές με υψηλό γρασιδί για να κρυφτεί. Σε σχέση με τους κλιματικούς παράγοντες, παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα σε ακραίες συνθήκες, αφού ανέχεται μεγάλο εύρος τιμών θερμοκρασίας και υγρασίας: από το θερμό και ξηρό κλίμα της νότιας Ευρώπης και της Μέσης Ανατολής ως το πολικό κλίμα της βόρειας Σκανδιναβικής χερσονήσου. Μπορεί να ζήσει ακόμη και σε χιονοσκεπείς εκτάσεις με ύψος χιονιού μέχρι το ένα μέτρο (Aragón *et al.* 1995).

Παρά τη δυνητική χρήση πολλών ενδιατημάτων, το ζαρκάδι φαίνεται να προτιμά - όταν είναι διαθέσιμα - τα μεικτά σε ηλικία και σύνθεση δάση φυλλοβόλων-κωνοφόρων, με πλούσιο θαμνώδη υποόροφο, τα οποία διακόπτονται από ξέφωτα ή περιβάλλονται από λιβάδια (Danilkin 1996). Ο συγκεκριμένος τύπος δασικής διάπλασης του εξασφαλίζει ποικιλία τροφικών πόρων αλλά και τη δυνατότητα για κάλυψη και αποφυγή των θηρευτών του (Gill *et al.* 1996, Lovari & San Jose 1997, Mysterud *et al.* 1999).

Διατροφικές στρατηγικές και προσαρμογές

Ως προς τη διατροφή το είδος θα μπορούσε εξ αρχής να χαρακτηριστεί ως ένα μη εξειδικευμένο φυτοφάγο (generalist herbivore), αφού είναι ικανό να τραφεί με πληθώρα διαφορετικών φυτικών ειδών, αξιοποιώντας όλους τους ιστούς τους, από τις ρίζες έως τα άνθη και τους καρπούς (Tixier & Duncan 1996, Danilkin 1996, Duncan *et al.* 1998). Παρά την ιδιότητά του αυτή, οι αυξημένες ανάγκες για ενέργεια και θρεπτικά συστατικά, που υπάρχουν εξαιτίας του μικρού μεγέθους σώματος και της εντατικής μητρικής φροντίδας (βλ. Αναπαραγωγή), εξαναγκάζουν το ζαρκάδι να υιοθετεί μια στρατηγική τροφοληψίας που περιγράφεται ως «επικεντρωμένα επιλεκτική» (concentrate selector) και συνίσταται στην εστιασμένη κατανάλωση λίγων μόνο ειδών υψηλής θρεπτικής αξίας και όχι στην τυχαία βόσκηση όλων των διαθέσιμων ή των πιο κοινών προς βρώση ειδών (Andersen *et al.* 1998). Σε συνδυασμό με τη συγκεκριμένη στρατηγική έχουν αναπτυχθεί συμπεριφορικές, ανατομικές και φυσιολογικές πεπτικές προσαρμογές, οι οποίες το διαφοροποιούν τόσο σε σχέση με άλλα ελαφοειδή όσο και με μηρυκαστικά που είναι προσαρμοσμένα στη κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων χόρτου, πλούσιου σε φυτικές ίνες (grass feeders). Διαθέτει μικρό στομάχι, κοντά έντερα, μεγάλο συκώτι και σιελογόνους αδένες και πραγματοποιεί σύντομους κύκλους διατροφής (Geist 1999).

Η βασική πηγή τροφής που επιλέγεται συνήθως είναι τα πράσινα φύλλα των δικοτυλήδων φυτών ή γενικά φυτικά είδη (π.χ. πόες) και ιστοί τους με χαμηλή περιεκτικότητα σε ίνες (κυτταρίνη ή λιγνίνη) και υψηλή περιεκτικότητα σε υδρογονάνθρακες και νερό, ενώ αποφεύγονται είδη (π.χ. ποώδη αγροστώδη) και ιστοί (π.χ. ξυλώδης) με υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες (Tixier & Duncan 1996). Ως συνέπεια της στρατηγικής τροφοληψίας και των ιδιαίτερων προσαρμογών που έχει αναπτύξει, η διαίτα του επικαλύπτεται ελάχιστα με αυτή των τροφικών του ανταγωνιστών (Hearney & Jennings 1983, Putman 1996). Ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις, το ζαρκάδι εμφανίζεται εξαιρετικά ευαίσθητο στον ανταγωνισμό από μεγαλύτερα φυτοφάγα ζώα, ιδιαίτερα όταν τα τελευταία υπάρχουν σε υψηλές πυκνότητες ή η διαθεσιμότητα τροφής είναι χαμηλή (Henry 1978, Cederlund *et al.* 1980, Putman 1996, Latham *et al.* 1996, 1997). Σε ενδοειδικό επίπεδο, η εξειδίκευση σε υψηλής ποιότητας και συνήθως διασκορπισμένες τροφικές πηγές οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ανταγωνισμού ιδίως αν οι πληθυσμιακές πυκνότητες είναι υψηλές (Duncan *et al.* 1998).

Η ποιοτική (ποια φυτικά είδη και ιστοί) και ποσοτική (σε τι αναλογία) σύσταση της διαίτας του ποικίλει από περιοχή σε περιοχή στο εύρος της κατανομής του και πρακτικά καθορίζεται από το τι υπάρχει διαθέσιμο τη συγκεκριμένη εποχή και στο συγκεκριμένο ενδιαίτημα (Danilkin 1996, Duncan *et al.* 1998, Cornelis *et al.* 1999). Αντίθετα, δεν έχει παρατηρηθεί διαφοροποίηση της διαίτας ανάλογα με την ηλικία ή το φύλο.

Αναπαραγωγή και αναπαραγωγική φυσιολογία

Ένα από τα μοναδικά χαρακτηριστικά του ζαρκαδιού που το διαφοροποιούν ακόμη και σε σχέση με στενά συγγενικά του είδη των ελαφοειδών, είναι ο ξεχωριστός και ιδιαίτερος αναπαραγωγικός του κύκλος και οι προσαρμογές που έχει αναπτύξει στην αναπαραγωγική του φυσιολογία (Danilkin 1996, Geist 1999, Sempéré *et al.* 1998). Τα περισσότερα ελαφοειδή είναι εποχιακά πολυοιστρικά και ζευγαρώνουν το φθινόπωρο (Οκτώβριο με Δεκέμβριο). Αντίθετα τα ζαρκάδια είναι μονοοιστρικά (ωορρηξία μια φορά το χρόνο) και ο οίστρος συνήθως διαρκεί μόλις 36 ώρες στα τέλη του καλοκαιριού (Ιούλιο-Αύγουστο). Ο συγχρονισμός των αναπαραγωγικών κύκλων των δύο φύλων καθορίζεται από σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εσωτερικών ρυθμών και της φωτοπεριόδου και είναι τόσο ακριβής και αποδοτικός, ώστε παρά την ύπαρξη ενός οίστρου, το 98% των θηλυκών ατόμων σε έναν πληθυσμό γονιμοποιείται επιτυχώς (Sempéré *et al.* 1998, Gaillard *et al.* 1998), ενώ το 80% των συζεύξεων πραγματοποιείται μέσα σε ένα δεκαπενθήμερο στα τέλη του καλοκαιριού (Linnel *et al.* 1998).

Μετά τη γονιμοποίηση ξεκινά μια παρατεταμένη περίοδος κυοφορίας που διαρκεί συνολικά 9-10,5 μήνες και τα νεογνά γεννιούνται μεταξύ Απριλίου και Ιουλίου (Danilkin 1996). Το ζαρκάδι είναι το μοναδικό οπληφόρο που παρουσιάζει μια τέτοια πολύμηνη περίοδο κύησης, γεγονός που οφείλεται σε μια επίσης μοναδική μεταξύ των οπληφόρων προσαρμογή της αναπαραγωγικής φυσιολογίας: την καθυστερημένη εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα (delayed implantation) (Sempéré *et al.* 1996, Danilkin 1996). Η καθυστερημένη εμφύτευση είναι μία προσαρμογή με σημαντικές οικολογικές επιπτώσεις ως προς την επιτυχία του είδους, αφού έχει ως αποτέλεσμα, όχι μόνο να συμπίπτουν οι ενεργειακά δαπανηρές φάσεις του κύκλου των αρσενικών και θηλυκών ατόμων (περίοδος οίστρου και γαλουχία αντίστοιχα), αλλά και αυτές να λαμβάνουν χώρα το καλοκαίρι, όταν η τροφή καλής ποιότητας είναι άφθονη (Andersen *et al.* 1998).

Το ζαρκάδι συνήθως γεννά ένα με δύο και σπανιότερα τρία μικρά. Τα νεογνά κατά τη γέννησή τους ζυγίζουν 1-1,7 kg, φέρουν τρίχωμα και έχουν την όρασή τους. Η μητρική φροντίδα μπορεί να χαρακτηριστεί εντατική στους πρώτους δύο μήνες (πολλαπλοί ημερήσιοι θηλασμοί), με αποτέλεσμα την ταχύτατη ανάπτυξη των νεογνών. Μέχρι το φθινόπωρο καταφέρνουν να φθάσουν το 60-70% του σωματικού βάρους των ενήλικων ατόμων (Sempéré *et al.* 1996, Danilkin 1996).

Κοινωνική συμπεριφορά και οργάνωση

Ένα βασικό σχήμα κοινωνικής οργάνωσης παρατηρείται σε όλους τους πληθυσμούς που έχουν μελετηθεί. Ο ετήσιος κύκλος συνίσταται από ένα ως επί το πλείστον μοναχικό στάδιο κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, όταν τα θηλυκά απομονώνονται για να μεγαλώσουν τα μικρά τους (Linnell *et al.* 1998) και τα ενήλικα αρσενικά υπερασπίζονται τις περιοχές χωροκράτειας για ζευγάρι (Liberg *et al.* 1998). Προς το τέλος του φθινοπώρου και κυρίως κατά τη διάρκεια του χειμώνα, τα άτομα και των δύο φύλων σχηματίζουν συνήθως ασταθείς και ευμετάβλητες ομάδες, των οποίων η σύνθεση μπορεί να αλλάζει ταχύτατα (Danilkin 1996, Hewison *et al.* 1998). Την άνοιξη οι ομάδες αρχίζουν να διαλύονται και τα άτομα εγκαθίστανται στις αρχικές τους περιοχές ενδημίας, εισερχόμενα στο στάδιο της μοναχικότητας (Danilkin 1996).

Η επιτυχία του ζαρκαδιού ως είδος μπορεί να αποδοθεί εν μέρει και στην ικανότητά του να τροποποιεί εντυπωσιακά το βασικό αυτό σχήμα κοινωνικής οργάνωσης ανάλογα με το ενδιαίτημα. Ουσιαστικά αυτό που διαφοροποιείται είναι το μέγεθος των ομάδων που συγκροτούνται το χειμώνα, το οποίο ποικίλλει εντυπωσιακά και σχετίζεται με την πυκνότητα των πληθυσμών και το βαθμό δασικής κάλυψης (ανοικτό-κλειστό ενδιαίτημα). Για παράδειγμα, σε πολύ εκτεταμένες ανοικτές εκτάσεις, όπως είναι οι καλλιεργούμενες πεδιάδες της κεντρικής και ανατολικής Ευρώπης, οι χειμερινές ομάδες μπορεί να απαρτίζονται από 50 ή και περισσότερα άτομα, ενώ σε δασικά οικοσυστήματα με διάκενα (ξέφωτα ή λειβάδια) συνήθως παρατηρούνται μικρές ομάδες (5-10 άτομα) που σχηματίζονται όταν τα ζώα βγαίνουν στα ανοικτά ενδιαίτηματα για να βοσκήσουν (Hewison *et al.* 1998). Η συγκρότηση ομάδων θεωρείται γενικά μια αντιθηρευτική στρατηγική και φαίνεται να έχει σημαντικά οφέλη στην ένταση και την αποδοτικότητα της τροφοληψίας αφού μειώνει το χρόνο και την ενέργεια που κάθε άτομο δαπανά για να επιτηρεί την περιοχή βόσκησης (Linnell 1994, Sieber 1994).

Θηρευτές

Το μικρό μέγεθος τόσο του ενήλικου όσο κυρίως των νεογνών του ζαρκαδιού σε σχέση με τα μεγαλύτερα οπληφόρα (π.χ. βίσωνα, άλκη, ελάφι), το καθιστά συγκριτικά πιο ευάλωτο στη θήρευση από μια σειρά δυνητικών θηρευτών. Οι Aanes *et al.* (1998) στη βιβλιογραφική τους ανασκόπηση για τη θήρευση στο ζαρκάδι αναφέρουν 10 είδη τα οποία ευκαιριακά ή συστηματικά το συμπεριλαμβάνουν στη λεία τους. Η αγριόγατα (*Felis*

sylvestris), η οικιακή γάτα (*Felis catus*) και ο αγριόχοιρος (*Sus scrofa*) έχει βρεθεί ότι μπορούν να κυνηγούν και να σκοτώνουν μόνο νεογνά, ενώ ο σκύλος (*Canis familiaris*), ο χρυσαετός (*Aquila chrysaetos*), το κουνάβι (*Martes martes*), η αλεπού (*Vulpes vulpes*), ο αδηφάγος (*wolverine, Gulo gulo*), ο λύγκας (*Lynx lynx*) και ο λύκος (*Canis lupus*) έχουν αναφερθεί ως θηρευτές τόσο των ενήλικων όσο και των νεογνών. Παρά την ποικιλία δυνητικών θηρευτών, μόνο τρία είδη εμφανίζονται ικανά να σκοτώνουν σημαντικούς αριθμούς ζαρκαδιών: η αλεπού (κυρίως νεογνά), ο λύγκας και ο λύκος.

Ως κυριότερος θηρευτής του είδους θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ο άνθρωπος, ο οποίος το κυνηγά συστηματικά τόσο για το κρέας του όσο και ως τρόπαιο (trophy). Στοιχεία από τα τελευταία 20 χρόνια για 33 ευρωπαϊκές χώρες στις οποίες το ζαρκάδι θηρεύεται νόμιμα δείχνουν ότι τα άτομα που θανατώνονται από κυνηγούς σε ετήσια βάση αυξήθηκαν από 1,7 σε περίπου 2,7 εκατομμύρια (Burbaité & Csányi 2009), ακολουθώντας τις γενικότερες αυξητικές τάσεις της αφθονίας των πληθυσμών του είδους στις περισσότερες από αυτές τις χώρες.

Απειλές

Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση της IUCN, το είδος κατατάσσεται στην κατηγορία μειωμένου ενδιαφέροντος (Least Concern) ως προς την κατάσταση διατήρησης σε ευρωπαϊκό επίπεδο, δηλαδή εκτιμάται πως δεν αντιμετωπίζει κανένα κίνδυνο εξαφάνισης και είναι αρκετά κοινό και ευρέως διαδεδομένο. Σύμφωνα με τη ίδια έκθεση η κυριότερη απειλή για το ζαρκάδι στην Ευρώπη θεωρείται η αυξανόμενη γενετική ανάμειξη των πληθυσμών του, που προκαλείται από μετατοπίσεις ζώων για θηραματικούς σκοπούς (Lovari *et al.* 2008). Αναλύσεις μοριακών δεδομένων στην κεντρική και νότια Ευρώπη δείχνουν ότι η γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών έχει επηρεαστεί σημαντικά από πρακτικές εμπλουτισμών και άλλες διαχειριστικές δράσεις (Lorenzini *et al.* 2002, Randi *et al.* 2004). Οι κίνδυνοι από τη γενετική ανάμειξη είναι μεγαλύτεροι για γενετικά διακριτούς, περιφερειακούς πληθυσμούς όπως αυτοί της Πορτογαλίας, της νότιας Ιταλίας και ενδεχομένως της Ελλάδας (Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006).

Σε τοπικό επίπεδο και ανάλογα με τη δυναμική των πληθυσμών και τις ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν σε κάθε χώρα, έχουν αναφερθεί απειλές όπως το παράνομο κυνήγι, η καταδίωξη από άγρια σκυλιά ή η μείωση της έκτασης των ενδιαιτημάτων (Masseti 2000, Lorenzini *et al.* 2002).

Το ζαρκάδι στην Ελλάδα -πόσο καλά το γνωρίζουμε;

Η Ελλάδα είναι μια από τις περιοχές στις οποίες το ζαρκάδι ενδημεί εδώ και χιλιάδες χρόνια, γεγονός που τεκμαίρεται κυρίως από παλαιοντολογικά και αρχαιολογικά ευρήματα αλλά και από αναφορές σε έργα αρχαίων συγγραφέων. Το εύρος κατανομής και οι πληθυσμοί του παρουσίασαν σημαντική μείωση κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, ως αποτέλεσμα κυρίως της εντατικής του θήρευσης αλλά και του κατακερματισμού ή της υποβάθμισης των ενδιαιτημάτων του από τον άνθρωπο. Σταδιακά και ήδη από τις αρχές του αιώνα που πέρασε, το ζαρκάδι άρχισε να εκλείπει από μεγάλες περιοχές που ιστορικά φιλοξενούσαν σημαντικούς πληθυσμούς του (π.χ. Πελοπόννησος). Σήμερα αποτελεί τον τελευταίο εκπρόσωπο της οικογένειας των ελαφοειδών, που εξακολουθεί να διατηρεί έστω και με χαμηλές πυκνότητες φυσικούς αυτόχθονες πληθυσμούς σε ορεινά και ημιορεινά οικοσυστήματα της χώρας. Τα δύο άλλα είδη της οικογένειας, τα οποία κάποτε ήταν άφθονα στην ηπειρωτική Ελλάδα, δηλαδή το κόκκινο ελάφι (*Cervus elaphus*) και το πλατόνι (*Dama dama*) έχουν πρακτικά εκλείψει από τις περιοχές αυτές και διατηρούν ελάχιστους και γεωγραφικά πολύ περιορισμένους πληθυσμούς (Ποϊραζίδης και Παράσχη 1992, Ιωαννίδης & Μπούσμπουρας 1992, Σφουγγάρης 2009, Μερτζανίδου 2009).

Το ζαρκάδι δεν ακολούθησε τη μοίρα των άλλων ελαφοειδών, ίσως γιατί η λήψη μέτρων προστασίας στα τέλη της δεκαετίας του 1960 πρόλαβε μια μη αναστρέψιμη πορεία εξαφάνισης και του επέτρεψε να επιβιώσει, αξιοποιώντας όλα εκείνα τα συγκριτικά πλεονεκτήματα προσαρμογής που διαθέτει. Το κυνήγι του απαγορεύεται δια νόμου σε όλη την επικράτεια, εκτός από κάποιες ελεγχόμενες κυνηγετικές περιοχές (νομοθετικό διάταγμα 86/69, 1969). Αυτή ωστόσο είναι και η μόνη διαχειριστική πρακτική που έχει εφαρμοστεί για την προστασία του είδους, μιας και διαχρονικά απουσιάζουν προγράμματα συστηματικής παρακολούθησης (monitoring) και διατήρησης. Όσον αφορά την κατάσταση κινδύνου και με βάση τα κριτήρια της IUCN, το ζαρκάδι συμπεριελήφθη στην πρώτη έκδοση του Κόκκινου Βιβλίου των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας (Παράσχη, 1992) αλλά και στην πρόσφατη, αναθεωρημένη έκδοση (Σφουγγάρης & Τσαπάρης, 2009) χαρακτηριζόμενο ως «Τρωτό». Η περιορισμένη κατανομή, ο κατακερματισμός και οι χαμηλές πυκνότητες των πληθυσμών καθώς και η απουσία ουσιαστικής διαχείρισης, διαφοροποιούν την κατάσταση του είδους στην Ελλάδα σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρώπη.

Μια επιπλέον χαρακτηριστική ιδιαιτερότητα που μπορεί εύκολα να εντοπιστεί είναι η περιορισμένη επιστημονική έρευνα και τεκμηρίωση για θέματα βιολογίας-οικολογίας του είδους στην Ελλάδα, σε αντιδιαστολή με την εκτεταμένη ερευνητική ενασχόληση που παρατηρείται διεθνώς (Βοσνιάκου *et al.* 1997). Μια απλή αναζήτηση σε βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων αρκεί για να καταδείξει την ένδεια της παραγόμενης γνώσης για το ζαρκάδι στη

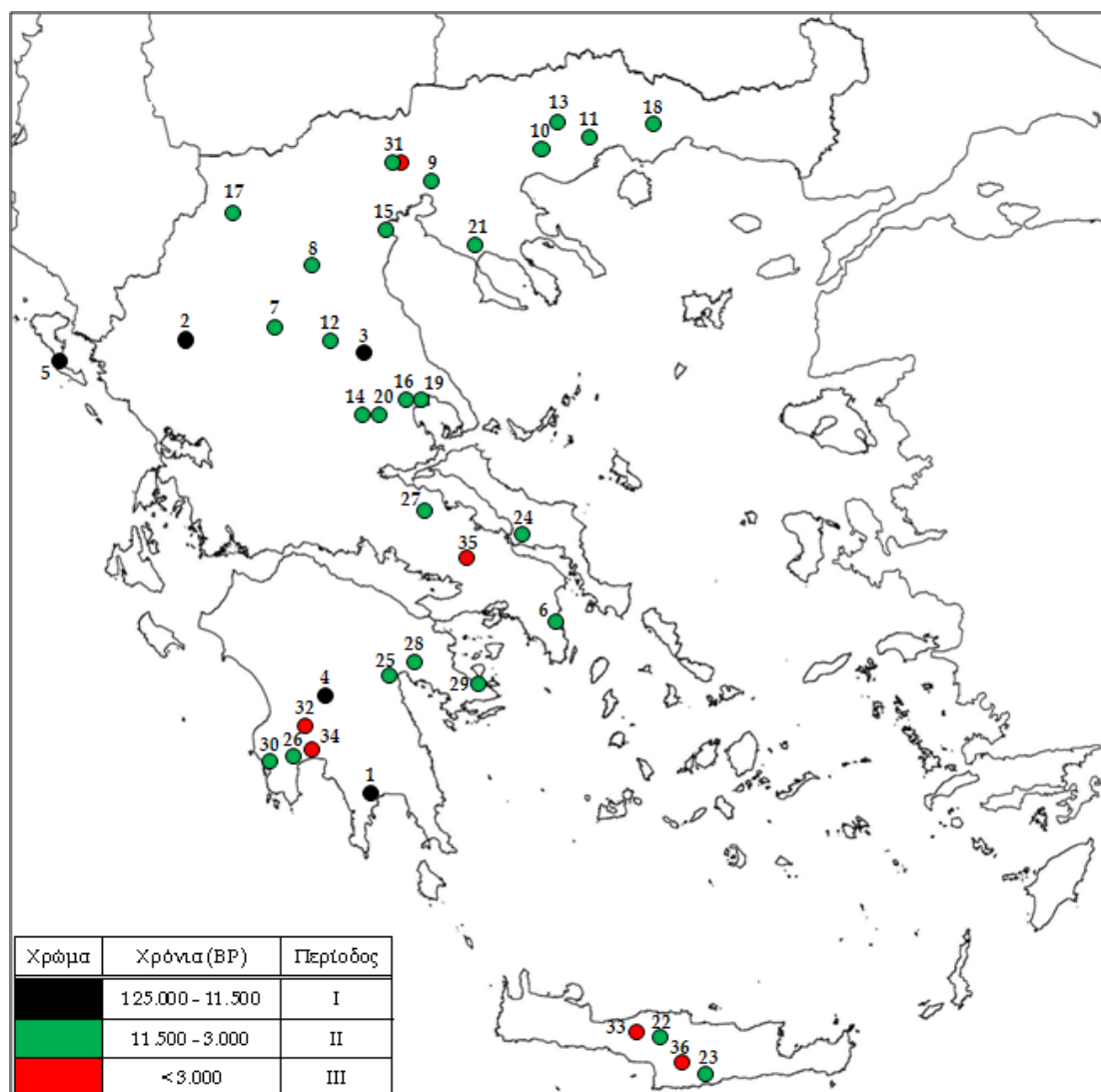
χώρα μας. Το περιορισμένο επιστημονικό ή ερευνητικό προσωπικό σε κλάδους, που ούτως ή άλλως αναπτύχθηκαν αργοπορημένα στην Ελλάδα (κυρίως από τη δεκαετία του 1970 και μετά), όπως η Οικολογία, η Βιολογία της Άγριας Ζωής (Wildlife Biology) και η Βιολογία της Διατήρησης (Conservation Biology), σε συνδυασμό με την ανυπαρξία πολιτικών χρηματοδότησης της έρευνας μπορούν να εξηγήσουν εν μέρει γιατί μια σειρά μεγάλων θηλαστικών δεν αποτέλεσαν μέχρι πρόσφατα αντικείμενο ενδελεχούς επιστημονικής μελέτης. Οι χαμηλές πληθυσμιακές πυκνότητες, η κρυπτική συμπεριφορά και η δυσκολία χειρισμού του ζαρκαδιού (σύλληψη, παρατήρηση στο πεδίο) είναι επιπλέον παράγοντες οι οποίοι το κατέστησαν ερευνητικά «μη ελκυστικό». Στις παραγράφους που ακολουθούν επιχειρούμε μια σύντομη ανασκόπηση της επιστημονικής γνώσης που υπάρχει για το είδος στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας βιβλιογραφικά δεδομένα από τις λιγοστές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, προσωπικές παρατηρήσεις και αδημοσίευτα στοιχεία.

Κατανομή στο παρελθόν

Σε μια προσπάθεια ανασύστασης της εικόνας που εμφάνιζε η κατανομή του ζαρκαδιού στον ελλαδικό χώρο κατά τη διάρκεια της μακράιωνης ιστορίας του είδους, προχωρήσαμε σε μια επισταμένη βιβλιογραφική έρευνα για την ανεύρεση θέσεων στις οποίες, σύμφωνα με δημοσιευμένες αρχαιολογικές και παλαιοντολογικές μελέτες, εντοπίστηκε οστεολογικό υλικό ζαρκαδιών που ποσοποιεί την παρουσία του σε συγκεκριμένες χρονολογικές περιόδους. Στην Εικόνα 1.2.1 παρουσιάζουμε εποπτικά τα αποτελέσματα της έρευνας ενώ στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος (σελ. 249) παραθέτουμε αναλυτικά στοιχεία και τις σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές.

Τα παλαιότερα τεκμήρια της παρουσίας του ζαρκαδιού που αναφέρονται, ανάγονται στο ανώτερο Πλειστόκαινο (125.000-11.000 χρόνια πριν από σήμερα) και εντοπίστηκαν σε περιοχές της Ηπείρου, της Πελοποννήσου, της Θεσσαλίας και της Κέρκυρας. Ιδιαίτερη αξία σχολιασμού έχει η επιβεβαίωση της παρουσία του στη θέση Καστρίτσα Ιωαννίνων, που χρονολογείται στα 21.000-20.000 χρόνια πριν από σήμερα (Bailey *et al.* 1983, Bailey & Gamble 1990). Το γεγονός ότι η χρονολογία αυτή βρίσκεται εντός της τελευταίας παγετώδους περιόδου (Last Glacial Maximum: 21-14,5 kyears BP) υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη περιοχή (βορειοδυτική Ελλάδα) αποτέλεσε ένα από τα πλειστοκαινικά καταφύγια των νοτίων Βαλκανίων για το είδος.

Η γεωγραφική διασπορά του συνόλου των θέσεων επιτρέπει τη διατύπωση της υπόθεσης ότι το ζαρκάδι παρουσίαζε ευρύτατη κατανομή και εξαπλωνόταν σε ολόκληρη σχεδόν την ελληνική επικράτεια (συμπεριλαμβανομένων και κάποιων νησιών) για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατά το παρελθόν.



Εικόνα 1.2.1 : Χάρτης θέσεων εύρεσης οστεολογικού υλικού ζαρκαδιών και χρονολογική τους ταξινόμηση. Η περίοδος I αντιστοιχεί στο ανώτερο Πλειστόκαινο, ενώ οι περιόδοι II και III στο Ολόκαινο. Το αυθαίρετο όριο διαχωρισμού των δύο τελευταίων (1000 π.Χ) διακρίνει τους προϊστορικούς (νεολιθική και εποχή του χαλκού) από τους ιστορικούς χρόνους.

Υπόμνημα : Για αναλυτικότερα στοιχεία και αναφορές βλ. Πίνακα 1 του Παραρτήματος.

- | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 1.Σπήλαιο Λακωνίς (Γύθειο) | 13.Σιταγροί (Δράμα) | 25.Λέρνα (Αργολίδα) |
| 2.Καστρίτσα (Ιωάννινα) | 14.Αχχίλειο (Φάρσαλα) | 26.Νιχώρια (Μεσσηνία) |
| 3.Κουλάδα Πηγειού (Λάρισα) | 15.Μακρόγυαλος (Πιερία) | 27.Καλαπόδι (Βοιωτία) |
| 4.Μεγαλόπολη (Αρκαδία) | 16.Σέσκλο (Μαγνησία) | 28.Τίρυνθα (Αργολίδα) |
| 5.Γράβα Αγ. Μαθθαίου (Κέρκυρα) | 17.Διοσηλίτ (Καστοριά) | 29.Αγ. Κωνσταντίνος (Μέθανα) |
| 6.Βραυρώνα (Αττική) | 18.Παράδεισος (Καβάλα) | 30.Παλάτι Νέστορα (Πύλος) |
| 7.Σπήλαιο Θεόπετρας (Τρίκαλα) | 19.Πευκάκια (Μαγνησία) | 31.Καστανάς (Θεσσαλονίκη) |
| 8.Σέρβια (Κοζάνη) | 20.Μαγούλα Άργισσας (Λάρισα) | 32.Μαυρομάτι (Μεσσηνία) |
| 9.Σταυρούπολη (Θεσσαλονίκη) | 21.Αγ. Μάμας (Χαλκιδική) | 33.Ελευθέρινα (Ρέθυμνο) |
| 10.Δήμητρα (Σέρρες) | 22.Σπήλαιο Σεντόνης (Ζωνιανά) | 34.Μεσσήνη (Μεσσηνία) |
| 11.Ντίκιλι Τας Φίλιπποι (Καβάλα) | 23.Πρινιάς (Ηράκλειο) | 35.Καβείριο ιερό (Θήβα) |
| 12.Μαγούλα Ζάρκου (Τρίκαλα) | 24.Καλογερόβρυση (Φύλλα Ευβοίας) | 36.Γόρτυς (Ηράκλειο) |

Σύγχρονη κατανομή και σημαντικές περιοχές εξάπλωσης

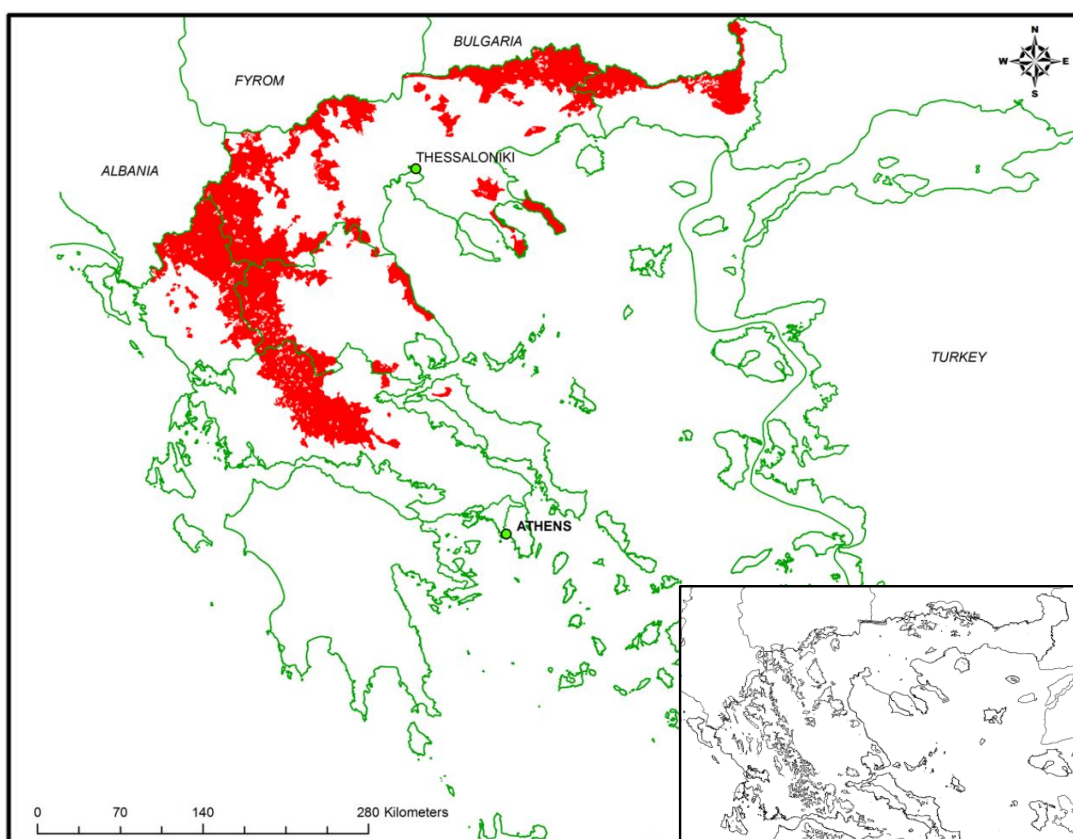
Η σύγχρονη εξάπλωση του είδους στην Ελλάδα δίνεται στο χάρτη της Εικόνας 1.2.2. Με βάση τις έως τώρα πληροφορίες οι Giannakopoulos *et al.* (2009a) υπολόγισαν τη συνολική έκταση στην οποία αυτό εξαπλώνεται σε 26.300 km² περίπου. Το ζαρκάδι είναι παρόν σήμερα κυρίως στη κεντρική και βόρεια Ελλάδα ενώ απουσιάζει από τη νησιωτική χώρα (πλην της βόρειας Εύβοιας) και από την Πελοπόννησο. Σύμφωνα με τους Adamakopoulos *et al.* (1991) το νοτιότερο άκρο της κατανομής του θεωρούνταν το όρος Γκιώνα στη Στερεά Ελλάδα (38°30' N, 22°21' E) αλλά πρόσφατες συχνές θεάσεις του είδους στην περιοχή του Παρνασσού και των Δελφών (Giannakopoulos *et al.* 2009a) μετατοπίζουν το σημείο νοτιοανατολικότερα (38°28' N, 22°30' E). Η αντιπαραβολή του χάρτη κατανομής με τον υψομετρικό χάρτη (ισοϋψείς 1000m) δείχνει έναν σαφή περιορισμό της εξάπλωσης κυρίως σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές. Κατά μήκος των οροσειρών της Πίνδου και της Ροδόπης εμφανίζεται συνεχή κατανομή ενώ πιο απομονωμένοι θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν οι πληθυσμοί που εντοπίζονται σε βουνά της Δυτικής και Κεντρικής Μακεδονίας (Βόρας, Όλυμπος, Πέρια όρη, Χολομώντας, Βερτίσκο), της Θεσσαλίας (Όσσα) και της Δυτικής Στερεάς (Οθρυς, Καλλίδρομο, Τελέθριο).

Η πρόσφατη επανεμφάνιση ζαρκαδιών σε κάποιες περιοχές της Πελοποννήσου (Πάρνωνας) και της Αττικής (Πάρνηθα), από τις οποίες θεωρούνταν εξαφανισμένο φαίνεται να οφείλεται στη μη ελεγχόμενη απελευθέρωση γεννητόρων από ιδιωτικές εκτροφές (Γιαννακόπουλος, προσωπική επικοινωνία) και όχι στη φυσική εξάπλωση των πληθυσμών του. Θα πρέπει να θεωρείται πολύ πιθανό ότι τα άτομα αυτά δεν ανήκουν στο αυτόχθονο ελληνικό ζαρκάδι αλλά έχουν προέλευση από εκτροφές του εξωτερικού (μάλλον κεντρική Ευρώπη). Αντίθετα ο πληθυσμός του Τελέθριου στη βόρεια Εύβοια είναι μάλλον ένας υπολειμματικός, απομονωμένος αυτόχθονος πληθυσμός που στο παρελθόν έφτασε στα όρια της εξαφάνισης και σήμερα παρουσιάζει στοιχεία επανάκαμψης. Σε κάθε περίπτωση και λόγω της απουσίας στοιχείων μόνο η γενετική ταυτοποίηση των ατόμων των προαναφερθέντων πληθυσμών θα μπορούσε να αποσαφηνίσει την προέλευση και την ιστορία τους.

Δυστυχώς η απουσία συστηματικών μετρήσεων της αφθονίας του ζαρκαδιού σε όλο το εύρος της κατανομής του δεν επιτρέπει μια σαφή και τεκμηριωμένη κατάταξη των σημαντικότερων πληθυσμών. Παρόλα αυτά η μόνιμη παρουσία, η συχνότητα θεάσεων και άλλα εμπειρικά στοιχεία ή προσωπικές παρατηρήσεις (π.χ. πληροφορίες από τοπικές δασικές υπηρεσίες, κυνηγετικές οργανώσεις και κατοίκους) καθώς και σχετικές αναφορές άλλων ερευνητών συνεκτιμήθηκαν, προκειμένου να οριοθετήσουμε τις περιοχές που θεωρούμε ότι συντηρούν σήμερα τους πιο σημαντικούς πληθυσμούς ζαρκαδιών. Ως τέτοιες αναφέρουμε τις Ελεγχόμενες Κυνηγετικές Περιοχές (ΕΚΠ) Κόζιακα, Όσσας, Λαϊλιά (Adamakopoulos *et al.* 1991) και Παρνασσίδα, το Εθνικό Πάρκο Βόρειας Πίνδου (Γιαννακόπουλος & Τσαπάρης 2008), τα βουνά Γράμμος (Adamakopoulos *et al.* 1991), Βόρας (Trakolis *et al.* 2000) και

Όλυμπος, την οροσειρά της Ροδόπης με κυριότερες περιοχές το δάσος Ελατιάς (Καράντερε) και το παρθένο δάσος Φρακτού, τα δάση της χερσονήσου του Άθω (Βαβαλέκας 1998) και τα δάση του Έβρου.

Κατά καιρούς μικροί πληθυσμοί ζαρκαδιών έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες αιχμαλωσίας σε ιδιωτικά ή δημόσια εκτροφεία ανά την Ελλάδα. Σημαντική περίπτωση, που αποτέλεσε και αντικείμενο της παρούσας μελέτης, είναι ο πληθυσμός που συντηρείται στο εκτροφείο Σουβάρδου του Δασαρχείου Καλαβρύτων. Ο πληθυσμός αυτός δημιουργήθηκε τεχνητά μετά από 5 συνεχόμενες εισαγωγές ζώων τα τελευταία 25 χρόνια (βλ. Πίνακα 2 Παραρτήματος). Στις τρεις πρώτες εισαγωγές μεταφέρθηκαν 16 ζαρκάδια από εκτροφεία Δασαρχείων της Βόρειας Ελλάδας (Κοζάνη, Αλεξανδρούπολη) ενώ δύο επιπλέον ζώα που προέρχονταν από φυσικούς πληθυσμούς εισήχθησαν στο εκτροφείο τη δεκαετία του '90. Η έκταση (περίπου 3.100 στρέμματα) και η απόλυτα φυσική διαμόρφωση του περιβάλλοντος του συγκεκριμένου εκτροφείου το καθιστούν μοναδικό μεταξύ αυτών που φιλοξενούν ζαρκάδια (για περισσότερα στοιχεία βλ. Κεφάλαιο 3.2).



Εικόνα 1.2.2 : Σύγχρονη κατανομή του ζαρκαδιού στην Ελλάδα.

Στον ένθετο χάρτη οι ισοϋψείς των 1000m.

Πηγή: Giannakopoulos et al. 2009a

Πληθυσμιακές πυκνότητες

Όσον αφορά στην αφθονία των πληθυσμών του ζαρκαδιού στην Ελλάδα, η έρευνα υπήρξε έως σήμερα εξαιρετικά περιορισμένη και ασυνεχής. Οι ελάχιστες πληθυσμιακές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (βλ. Πίνακα 1.2.1) είναι χρονικά σποραδικές, γεωγραφικά περιορισμένες και με διαφορετική κάθε φορά μεθοδολογία, καθιστώντας αδύνατη την πραγματοποίηση συγκρίσεων και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σε σχέση με τις τάσεις μεταβολής του μεγέθους τόσο του συνολικού όσο και κάποιων τοπικών πληθυσμών. Ωστόσο προσφέρουν μια σαφή ένδειξη χαμηλών πληθυσμιακών πυκνοτήτων σε σύγκριση με αυτές που έχουν αναφερθεί για πολλές άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Danilkin 1996).

Οι εκτιμήσεις που έχουν γίνει περιορίζονται στη βορειοδυτική Ελλάδα (κυρίως στην περιοχή της βόρειας Πίνδου) και δείχνουν σημαντική διακύμανση από 0,14 έως 2,22 άτομα/km². Οι μέγιστες πυκνότητες που υπολογίστηκαν από τους Σφουγγάρη & Γιαννακόπουλο (2005), θα πρέπει ωστόσο να θεωρηθούν υπερεκτιμημένες αφού οι δειγματοληψίες τους πραγματοποιήθηκαν το φθινόπωρο και το χειμώνα, σε περιόδους δηλαδή που τα ζαρκάδια παρουσιάζουν την τάση να συναθροίζονται σε μικρές ομάδες. Σε κάθε περίπτωση και λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιοχή της βόρειας Πίνδου φαίνεται ότι φιλοξενεί έναν από τους πλέον εύρωστους ελληνικούς πληθυσμούς, μπορούμε με ασφάλεια να ισχυριστούμε ότι οι τιμές πυκνοτήτων στην Ελλάδα είναι πολύ χαμηλές.

Πίνακας 1.2.1 : Εκτιμήσεις πληθυσμιακών πυκνοτήτων στην Ελλάδα και δημοσιευμένες τιμές από άλλες ευρωπαϊκές χώρες.

Αναφορά	Περιοχή	Περίοδος	Μέθοδος	Εκτιμώμενη πυκνότητα (άτομα/km ²)
Σφουγγάρης & Γιαννακόπουλος 2005	Ηπειρος	1998-2001	κλοιός (παγάνα)	1,82-2,22
Τσαπάρης & Λεγάκης 2004	Κεντρικό Ζαγόρι	2003-2004	συσσώρευση κοπρανοσωρών	0,14-0,39
Giannakopoulos <i>et al.</i> 2009a	Γρεβενά		κλοιός	0,58-1,72
Γιαννακόπουλος & Τσαπάρης 2008	Πάρκο Β. Πίνδου	2004-2008	δειγματοληψία αποστάσεων, συνεντεύξεις, συσσώρευση κοπρανοσωρών, GIS	0,22-0,71
Danilkin 1996	Αυστρία	μέσα δεκαετίας 1980	μέσες τιμές από εκτιμήσεις σε δασικά οικοσυστήματα	27
	Γερμανία			22,8
	Ιταλία			7,14
	Πολωνία			5,92
	Ρουμανία			4,52
	Σερβία			4,02
	Βουλγαρία			3,6
	Νορβηγία			2,08
	Σουηδία			1,56
	Ισπανία			0,5

Επιλογή και χρήση ενδιαιτήματος

Πολύ λίγα είναι και τα στοιχεία που έχουν προκύψει ερευνητικά σε σχέση με την επιλογή ενδιαιτήματος και αφορούν μόνο την περιοχή της Ηπείρου. Κοινός τόπος των μελετών είναι μια σαφής προτίμηση από το ζαρκάδι για δασικές διαπλάσεις και ιδίως για μεικτά δάση πλατύφυλλων φυλλοβόλων και κωνοφόρων (Σφουγγάρης & Γιαννακόπουλος 2005, Γιαννακόπουλος & Τσαπάρης 2008, Giannakopoulos *et al.* 2009b). Ως ιδιαίτερα σημαντική εκτιμήθηκε από τους ίδιους ερευνητές η ύπαρξη διακένων στις δασικές διαπλάσεις, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση ότι η παρουσία τους είναι παράμετρος καταλληλότητας των ενδιαιτημάτων (Kuijper *et al.* 2009). Η αυξημένη χρήση των διακένων είχε εμμέσως επιβεβαιωθεί παλαιότερα και από καταμετρήσεις κοπρανοσορών (Parageorgiou 1978). Αντίθετα πολύ χαμηλότερη χρήση παρατηρήθηκε σε κλειστούς θαμνώνες αείφυλλης, σκληροφυλλικής βλάστησης (μακί), σε καλλιεργούμενες και σε ανοιχτές λιβαδικές εκτάσεις.

Εκτός από τον τύπο της βλάστησης, η ένταση των ανθρώπινων δραστηριοτήτων και οι οχλήσεις που αυτές προκαλούν είναι επίσης παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την καταλληλότητα και τη χρήση των ενδιαιτημάτων από το ζαρκάδι (Danilkin 1996, Stankowich 2008). Έρευνες στην Ελλάδα υποστήριξαν ότι τα ζαρκάδια αποφεύγουν ζώνες αυξημένης όχλησης όπως είναι οι περιοχές γύρω από οικισμούς, τα ενδιαιτήματα που διαταράσσονται από πυκνό οδικό δίκτυο, και οι εκτάσεις στις οποίες παρατηρείται εντατική βόσκηση από οικόσιτα ζώα ή αυξημένη κυνηγετική δραστηριότητα (Γιαννακόπουλος & Τσαπάρης 2008, Τσαπάρης και Λεγάκης 2004, Giannakopoulos *et al.* 2009b).

Σε προηγούμενη παράγραφο επισημάνθηκε η συνάρτηση της κατανομής του είδους στην Ελλάδα με το υψόμετρο. Πράγματι, οι υψηλότερες πυκνότητες και η εντονότερη χρήση έχουν αναφερθεί σε περιοχές με υψόμετρα μεταξύ 900-1300 μέτρων (Σφουγγάρης & Γιαννακόπουλος 2005, Γιαννακόπουλος & Τσαπάρης 2008, Giannakopoulos *et al.* 2009b). Παρόλο που σε πεδινές και ημιορεινές εκτάσεις (<900m) τα τροφικά διαθέσιμα είναι αυξημένα εποχιακά (π.χ. καλλιέργειες σιτηρών, διαπλάσεις δρυός κ.ά.) και οι κλιματικές συνθήκες την ψυχρή περίοδο ευνοϊκότερες, τα ενδιαιτήματα θεωρούνται λιγότερο ελκυστικά κυρίως λόγω της σημαντικής όχλησης (Γιαννακόπουλος & Τσαπάρης 2008). Στις ορεινές περιοχές αντίθετα υπάρχει μικρότερη οικιστική ανάπτυξη και σαφώς μειωμένης έντασης ανθρώπινες δραστηριότητες. Στα πολύ μεγάλα υψόμετρα (>1300m) η δριμύτητα των φαινομένων κατά την ψυχρή περίοδο του έτους (π.χ. ύψος χιονιού) και η μειωμένη διαθεσιμότητα τροφής και κάλυψης (ιδίως πάνω από το δασοόριο) είναι περιοριστικοί παράγοντες που οδηγούν σε χαμηλότερη συχνότητα χρήσης (Aragón *et al.* 1995, Mysterud *et al.* 1997).

Απειλές

Η κυριότερη απειλή που εξακολουθεί να αντιμετωπίζει το είδος στην Ελλάδα είναι το παράνομο κυνήγι (Adamakopoulos *et al.* 1991, Παράσχη 1992, Σφουγγάρης & Τσαπάρης 2009, Giannakopoulos *et al.* 2009a). Η λαθροθηρία δεν είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί, ωστόσο μπορεί να θεωρηθεί ότι ασκείται με διαφορετική ένταση στο σύνολο της κατανομής του ζαρκαδιού και επηρεάζει αρνητικά τις πληθυσμιακές του πυκνότητες. Επιπρόσθετα, η υπερεντατική -νόμιμη κατά τα άλλα- θήρευση άλλων ειδών (αγριόχοιρου, λαγού, περωτών θηραμάτων) σε κάποιες περιοχές έχει επιπτώσεις στην επιβίωση και αύξηση των πληθυσμών του ζαρκαδιού. Η καταδίωξη από κυνηγόσκυλα θεωρείται ότι αποτελεί μια σημαντική απειλή που ασκεί αξιοσημείωτες πιέσεις κατά τη διάρκεια της κυνηγετικής περιόδου (Σφουγγάρης & Τσαπάρης, 2009). Εξαιτίας της όχλησης που προκαλείται από τη χρησιμοποίηση σκύλων καταδίωξης, το ζαρκάδι αναγκάζεται σε μετακινήσεις από την περιοχή χωροκρατικότητάς του και συνεπώς σε αλλαγή των θέσεων τροφοληψίας με ενδεχόμενα επακόλουθα την περιορισμένη αξιοποίηση των τροφικών πόρων και τη μείωση της αναπαραγωγικής του ικανότητας (Brown *et al.* 1999, Benhaiem *et al.* 2008, Stankowich 2008).

Επιπλέον σημαντική απειλή αποτελεί η υποβάθμιση των ενδιατημάτων του είδους που προκαλείται από τις πυρκαγιές, την υπέρμετρη ανάπτυξη υποδομών (π.χ. τουριστικές επιχειρήσεις) και την εντατικοποίηση των δραστηριοτήτων αναψυχής σε κάποιες περιοχές (Σφουγγάρης & Τσαπάρης, 2009). Στοιχείο υποβάθμισης θεωρείται και ο κατακερματισμός των ενδιατημάτων. Η υπερβολική διάνοιξη δασικών ή αγροτικών δρόμων έχει προκαλέσει την κατάτμηση μεγάλων αδιατάρακτων δασικών εκτάσεων ενώ παράλληλα διευκόλυνε την παράνομη θήρευση και όξυνε το πρόβλημα της όχλησης από τις ανθρώπινες δραστηριότητες. Η πρόσφατη κατασκευή μεγάλων οδικών αξόνων που διέρχονται από ορεινές και ημιορεινές περιοχές (π.χ. Εγνατία), ενδέχεται να θέτει εμπόδια στην ελεύθερη μετακίνηση των ζαρκαδιών και να οδηγήσει σε κατακερματισμό των ενδιατημάτων τους, ειδικά στις περιπτώσεις που δεν έχει ληφθεί μέριμνα για τη διατήρηση και επέκταση φυσικών περασμάτων (Giannakopoulos *et al.* 2009c). Ο κατακερματισμός των ενδιατημάτων έχει συνήθως πολύ σοβαρές οικολογικές επιπτώσεις, αφού προϊόντος του χρόνου μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της φέρουσας ικανότητας των επί μέρους τμημάτων, στη γενετική απομόνωση των πληθυσμών που ζουν σε αυτά και στη δημιουργία μικρών πληθυσμών απειλούμενων με εξαφάνιση εξαιτίας στοχαστικών φαινομένων (Saunders *et al.* 1991, Pullin 2002).

Σκοπός της διατριβής

Το ζαρκάδι στην Ελλάδα, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στις περισσότερες περιοχές εξάπλωσής του, αντιμετωπίζει ιδιαίτερες προκλήσεις διατήρησης, κυρίως λόγω της ελάττωσης των πληθυσμιακών του πυκνοτήτων και της έντασης των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων που απειλούν τόσο το ίδιο όσο και τα οικοσυστήματα στα οποία ζει. Αν λάβουμε υπόψη μας την οικολογική του αξία ως σημαντικού τροφικού πόρου για τα μεγάλα σαρκοφάγα, αλλά και το γεγονός ότι αποτελεί το τελευταίο ελαφοειδές που εξακολουθεί να επιβιώνει στα ορεινά οικοσυστήματα της ηπειρωτικής Ελλάδας, κατανοούμε πως η προστασία και η συστηματική παρακολούθηση των πληθυσμών του καθίσταται αναγκαία. Σε πλήρη αναντιστοιχία με την ανάγκη αυτή, η έρευνα σε θέματα που άπτονται της οικολογίας και της διατήρησης των ελληνικών πληθυσμών του ζαρκαδιού υπήρξε έως σήμερα εξαιρετικά αποσπασματική και περιορισμένη, με αποτέλεσμα η έλλειψη βασικής γνώσης και επιστημονικής τεκμηρίωσης να μην επιτρέπει την εκπόνηση στοχευμένων διαχειριστικών σχεδίων.

Η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας είναι μία από τις βασικές απειλές για την επιβίωση των φυσικών πληθυσμών ενός είδους και η διατήρησή της αποτελεί σημαντική προτεραιότητα στην προστασία της βιοποικιλότητας (McNeely *et al.* 1990, Frankham *et al.* 2002). Καμία έρευνα, ωστόσο, δεν έχει πραγματοποιηθεί για την περιγραφή της κατάστασης των ελληνικών πληθυσμών από γενετικής σκοπιάς, με αποτέλεσμα να αγνοούμε μια βασική πτυχή των κινδύνων που ενδεχομένως αντιμετωπίζουν. Επιπλέον, στην Ελλάδα δεν έχει εφαρμοστεί έως σήμερα κάποιο πρόγραμμα συστηματικής καταγραφής και παρακολούθησης της αφθονίας του ζαρκαδιού, με συνέπεια την έλλειψη αξιόπιστων πληθυσμιακών στοιχείων. Μια από τις αιτίες αυτής της διαχειριστικής ανεπάρκειας είναι η απουσία μελετών που θα περιέγραφαν, θα αξιολογούσαν τη δυνατότητα εφαρμογής και εντέλει θα πρότειναν σύγχρονες μεθοδολογικές προσεγγίσεις εκτίμησης της αφθονίας, προσαρμοσμένες στις ιδιαιτερότητες των ελληνικών οικοσυστημάτων.

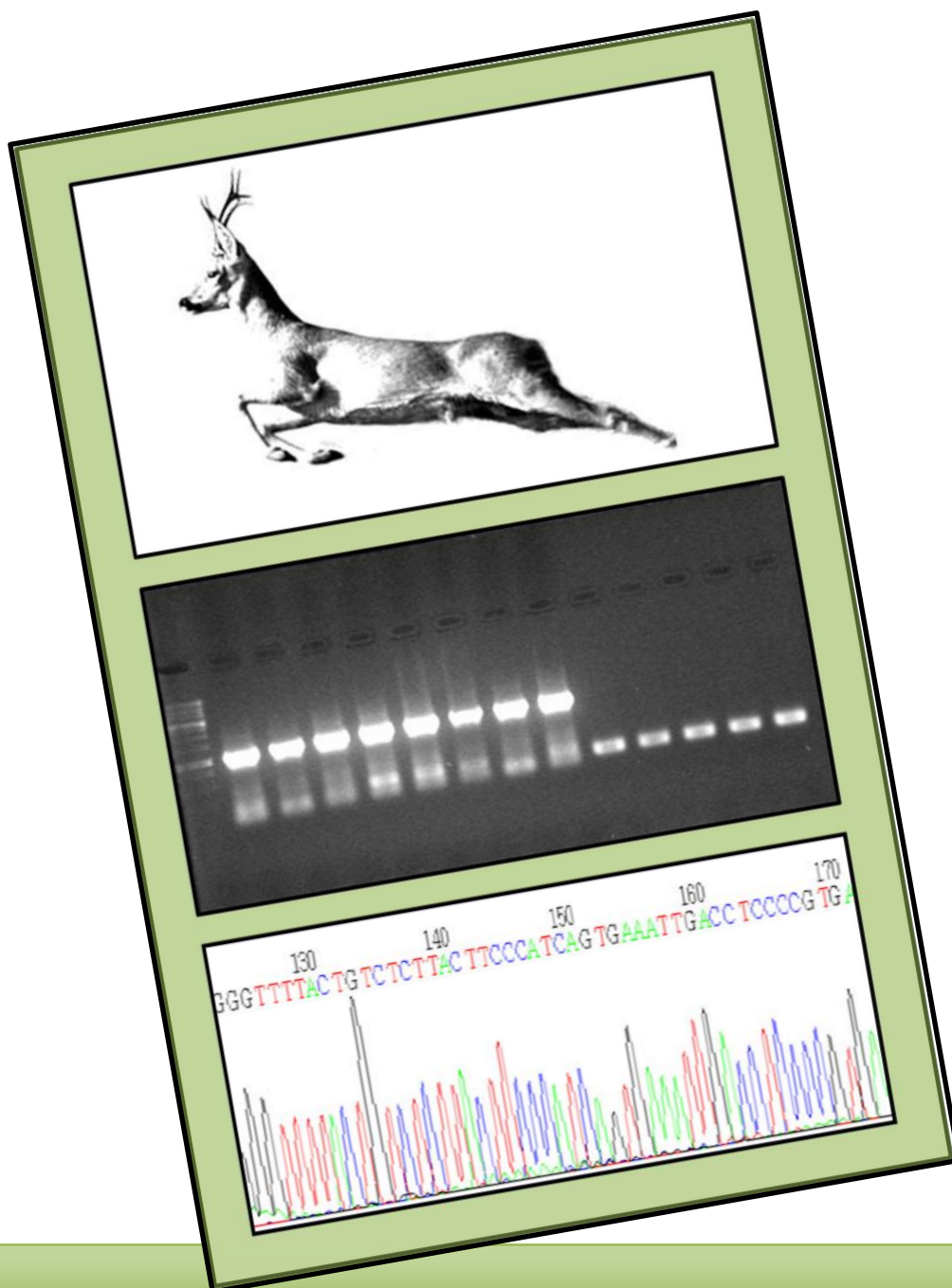
Η παρούσα διατριβή, η οποία είναι η πρώτη που εκπονείται για το ελληνικό ζαρκάδι (στοιχεία από Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης), περιλαμβάνει δύο θεματικές ενότητες. Στην πρώτη, θελήσαμε να εκτιμήσουμε το εύρος της γενετικής ποικιλότητας σημαντικών πληθυσμών του ζαρκαδιού και να διερευνήσουμε την ύπαρξη γεωγραφικών προτύπων διαφοροποίησης του είδους στην Ελλάδα (Κεφάλαιο 2). Στη δεύτερη, προσπαθήσαμε να ελέγξουμε, μέσω πιλοτικών εφαρμογών σε έναν κλειστό πληθυσμό, τη δυνατότητα χρήσης και το βαθμό αξιοπιστίας σύγχρονων μεθόδων εκτίμησης της πληθυσμιακής πυκνότητας, που στηρίζονται στην καταμέτρηση κοπρανοσωρών και δεν είχαν έως τώρα χρησιμοποιηθεί σε ορεινά μεσογειακά οικοσυστήματα (Κεφάλαιο 3). Ο κοινός σκοπός ήταν να συνεισφέρουμε,

Κεφάλαιο 1.3

μέσω της παραγόμενης γνώσης, στην αποτελεσματικότερη διαχείριση και τη διατήρηση του είδους στην Ελλάδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Γενετική ποικιλότητα του ζαρκαδιού στην Ελλάδα



Εισαγωγή

Η γενετική ποικιλότητα ως σημαντική συνιστώσα της βιοποικιλότητας

Η αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού και οι καταστροφικές σε πολλές περιπτώσεις επεμβάσεις του στο φυσικό περιβάλλον συνδέονται άρρηκτα με την κρίση της βιοποικιλότητας που παρατηρείται στη σύγχρονη εποχή. Η βιολογική ποικιλότητα υποβαθμίζεται τάχιστα ως άμεσο ή έμμεσο αποτέλεσμα των ανθρωπογενών δράσεων, σε σημείο μάλιστα που η συντελούμενη «έκτη εξαφάνιση» των ειδών να προσεγγίζει σε έκταση και δριμύτητα τις πέντε μαζικές εξαφανίσεις οι οποίες αποκαλύφθηκαν από το απολιθωματικό αρχείο (Leaky & Lewin 1995). Αν και κάθε μία από τις προηγούμενες μαζικές εξαφανίσεις θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μια φυσιολογική διαδικασία εξελικτικής διαδοχής, η σύγχρονη κρίση εγκυμονεί πρωτόγνωρους κινδύνους αφού ο ρυθμός με τον οποίο εξαφανίζονται ή κινδυνεύουν άμεσα να εξαφανισθούν αρκετά από τα υπάρχοντα είδη υπερβαίνει κατά πολύ το ρυθμό δημιουργίας νέων (Frankham *et al.* 2002).

Η καταστροφή και ο κατακερματισμός των ενδιαιτημάτων, η ρύπανση, η αλλαγή του κλίματος, η υπερεκμετάλλευση των ειδών, οι μετατοπίσεις ειδών σε περιοχές που δεν εξαπλώνονται φυσιολογικά (π.χ. ξενικά είδη) είναι μερικές από τις συνηθέστερες απειλές για τη βιοποικιλότητα, οι οποίες αποδίδονται ευθέως στην ανθρώπινη δραστηριότητα και ευθύνονται για την εξαφάνιση πολλών ειδών ή τη δραστική μείωση του μεγέθους των πληθυσμών τους (Primack *et al.* 2007). Δυσοίωνες προβλέψεις αναφέρουν ότι στις επόμενες δεκαετίες, χιλιάδες είδη και εκατομμύρια μοναδικών πληθυσμών αναμένεται να εξαφανιστούν (Levin 2001, Jackson 2002, Lawton & May 2005). Η διαπίστωση της έκτασης του προβλήματος και η αναγκαιότητα ανάσχεσής του σε συνδυασμό με τη δεδομένη οικολογική, εξελικτική, ηθική αλλά και οικονομική αξία της ποικιλομορφίας της έμβιας ύλης, οδήγησαν στην ανάπτυξη από τη δεκαετία του 1980 ενός νέου κλάδου διεπιστημονικής έρευνας, της Βιολογίας της Διατήρησης (Conservation Biology), που έχει ως κύριους στόχους τη μελέτη, την προστασία και την αποκατάσταση της βιολογικής ποικιλότητας (Soulé 1985).

Η γενετική ποικιλότητα συνιστά ένα από τα θεμελιώδη επίπεδα της βιοποικιλότητας (μαζί με την ποικιλότητα των ειδών και των οικοσυστημάτων) που χρήζουν προστασίας (McNeely *et al.* 1990). Η αναμφισβήτητη σημασία της γενετικής ποικιλότητας για την εξέλιξη και την επιβίωση των ειδών και η αναγνώριση των κινδύνων που ενέχει η υποβάθμισή της στο επίπεδο του είδους, του πληθυσμού ή του ατόμου, κατέστησε εξαρχής τη μελέτη και τη διατήρησή της μία εκ των βασικών επιδιώξεων και προτεραιοτήτων της Βιολογίας Διατήρησης (βλ. Frankel & Soulé 1981).

Δύο σημαντικοί λόγοι εξηγούν γιατί η ποικιλότητα του γενετικού υλικού είναι σημαντική και κατά συνέπεια η διατήρησή της αναγκαία. Κατά πρώτον, η γενετική ποικιλότητα είναι απαραίτητη για την προσαρμογή ενός είδους στις διαρκώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αντανακλά τη δυνατότητα εξέλιξής του. Είδη ή πληθυσμοί που έχουν υποστεί σημαντική υποβάθμιση της γενετικής τους ποικιλότητας στερούνται του απαραίτητου πρωτογενούς εξελικτικού δυναμικού πάνω στο οποίο δρα η φυσική επιλογή. Αναμένεται, επομένως, να έχουν μειωμένες πιθανότητες πλαστικής προσαρμογής και μακρόχρονης επιβίωσης (long term persistence) στην περίπτωση που περιβαλλοντικές μεταβολές ή στοχαστικά φαινόμενα, όπως η αλλαγή του κλίματος, η ρύπανση, η εμφάνιση νέων ασθενειών ή παρασίτων, η παρουσία νέων θηρευτών ή ανταγωνιστών κ.ά., διαφοροποιήσουν σημαντικά το περιβάλλον τους (Lande 1988, Mills & Smouse 1994, Hoffmann & Parsons 1997, Lacy 1997, Frankham *et al.* 2002, Spielman *et al.* 2004).

Κατά δεύτερον, χαρακτήρες οι οποίοι συνδέονται με την αρμοστικότητα (fitness), όπως είναι η αύξηση ή η ανάπτυξη, η γονιμότητα, η επιβίωση, η ανθεκτικότητα σε ασθένειες και η μεταβολική αποδοτικότητα, φαίνεται να συσχετίζονται άμεσα με τη γενετική ποικιλότητα (Allendorf & Leary 1986, Falconer & MacKay 1996). Η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αναπαραγωγικής αρμοστικότητας των ατόμων ή των πληθυσμών, γεγονός που θέτει σε κίνδυνο ακόμη και την άμεση (short term) επιβίωσή τους (Lacy 1997, Frankham & Ralls 1998, Coltman *et al.* 1999a, Hansson & Westerberg 2002, Reed & Frankham 2001, 2003).

Μια διαδικασία που οδηγεί σε μείωση της γενετικής ποικιλότητας και παρατηρείται συνήθως σε μικρούς, απομονωμένους πληθυσμούς είναι η ενδογαμία (inbreeding), δηλαδή η διασταύρωση συγγενικών ατόμων. Εμπειρικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μειωμένη αρμοστικότητα λόγω ενδογαμίας (ενδογαμική ύφεση, inbreeding depression) είναι υπαρκτό φαινόμενο σε μια ποικιλία ειδών (Crnokrak & Roff 1999, Hedrick & Kalinowski 2000). Στα μεγάλα θηλαστικά, για παράδειγμα, οι ενδογαμικές συζεύξεις φαίνεται να ευθύνονται για τη γέννηση ατόμων που είναι λιγότερο ανθεκτικά στα παράσιτα (Coltman *et al.* 1999b), που εμφανίζουν μειωμένη αναπαραγωγική επιτυχία κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Slate *et al.* 2000) ή που γεννιούνται με μικρό σωματικό βάρος και παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας σε νεαρές ηλικίες (Coltman *et al.* 1998).

Η αλματώδης τεχνολογική πρόοδος που συντελέστηκε τις τελευταίες δεκαετίες στη μοριακή βιολογία (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, νέοι πληροφοριακοί μοριακοί δείκτες, αξιόπιστη και γρήγορη αλληλούχιση του DNA) αλλά και στη στατιστική επεξεργασία της μοριακής πληροφορίας (δημιουργία εύχρηστων στατιστικών προγραμμάτων αυξημένης υπολογιστικής ισχύος, ανάπτυξη βιοπληροφορικής), επέτρεψε τη συστηματική αξιοποίηση μεγάλου όγκου γενετικών δεδομένων προκειμένου να απαντηθούν ερωτήματα οικολογίας, εξέλιξης ή συμπεριφοράς, τα οποία συνδέονται άρρηκτα με την διατήρηση των ειδών

(ενδεικτικά βλ. Jarne & Lagoda 1996, Luikart & England 1999, Sunnucks 2000, Deyoung & Honeycutt 2005, Excoffier & Heckel 2006). Η περιγραφή του εύρους και της κατανομής της γενετικής ποικιλότητας, η διάγνωση γενετικών προβλημάτων και ο εντοπισμός σημαντικών εξελικτικών ή διαχειριστικών μονάδων εντός των ειδών (Evolutionary Significant Units - ESUs, Management Units - MUs), κατέχουν πλέον κεντρική θέση στα προγράμματα διατήρησης πληθυσμών ζώων και φυτών που κινδυνεύουν με εξαφάνιση (Moritz 1994, Petit *et al.* 1998, Marshall *et al.* 1999, Hedrick 2001, Frankham 2005, Palsbøll *et al.* 2007, Schwartz *et al.* 2007).

Πληθυσμιακό μέγεθος και γενετική ποικιλότητα

Το μέγεθος των πληθυσμών και η δημογραφική τους ιστορία είναι παράγοντες που έχουν συνδεθεί άμεσα με τα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας (Nevo *et al.* 1984, Beebe & Rowe 2004, Lowe *et al.* 2006). Τα είδη ή οι πληθυσμοί που απειλούνται με εξαφάνιση και επομένως εξ ορισμού χαρακτηρίζονται από μικρές ή φθίνουσες αφθονίες παρουσιάζουν συνήθως και χαμηλότερα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας σε σχέση με συγγενικά μη απειλούμενα είδη (Frankham *et al.* 2002, Spielman *et al.* 2004).

Σε έναν πληθυσμό δεν συνεισφέρουν όλα τα άτομα εξίσου στη γενετική σύσταση της επόμενης γενιάς. Για το λόγο αυτό, το δραστικό μέγεθος ενός πληθυσμού (N_e) και όχι το πραγματικό μέγεθος (N) είναι αυτό που επηρεάζει τα επίπεδα της γενετικής ποικιλότητας. Το δραστικό μέγεθος αποτελεί μια σύνθετη θεωρητική έννοια της γενετικής πληθυσμών (βλ. Crandall *et al.* 1999, Leberg 2005), που πρακτικά αντιστοιχεί στον αριθμό των επιτυχώς αναπαραγόμενων ατόμων εντός του πληθυσμού. Τυπικά λοιπόν το δραστικό μέγεθος υπολείπεται του πραγματικού και μάλιστα σε βαθμό που ποικίλλει έντονα μεταξύ ειδών και πληθυσμών και εξαρτάται από παράγοντες όπως το μέγεθος των οικογενειών, η αναλογία των φύλων, το αναπαραγωγικό σύστημα, η μετανάστευση και τυχαία γεγονότα (Frankham 1995b). Για παράδειγμα, μελέτες σε είδη θηλαστικών έχουν δείξει ότι ο λόγος N_e/N κυμαίνεται μεταξύ 0,06 και 0,83 (Frankham 1995b). Οι μειώσεις του δραστικού μεγέθους μπορούν να επηρεάσουν τη γενετική ποικιλότητα μέσω της δράσης της γενετικής παρέκκλισης (genetic drift).

Η γενετική παρέκκλιση, δηλαδή η τυχαία διακύμανση των αλληλικών συχνοτήτων από γενιά σε γενιά εξαιτίας των διαφορών μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού στην επιβίωση και την αναπαραγωγική επιτυχία (Wright 1931), είναι μια διαδικασία που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια αλληλόμορφων από έναν πληθυσμό ή στην πιο ακραία μορφή σε απώλεια πολυμορφισμού για ένα γονίδιο με την εγκαθίδρυση ενός και μοναδικού

αλληλομόρφου εντός του πληθυσμού (fixed allele). Οι πληθυσμοί με μικρό δραστικό μέγεθος εμφανίζονται πιο ευάλωτοι στην αρνητική δράση της γενετικής παρέκκλισης με αποτέλεσμα να κινδυνεύουν με άμεση (μέσα σε λίγες γενιές) υποβάθμιση της γενετικής τους ποικιλότητας ακόμη και εξαιτίας τυχαίων γεγονότων (Frankham *et al.* 2002, DeYoung & Honeycutt 2005).

Όταν ένας μεγάλος πληθυσμός υφίσταται σημαντικές και απότομες μειώσεις του μεγέθους του, τότε διέρχεται από μια κατάσταση που ονομάζεται δημογραφική στενωπός (bottleneck). Η κατανόηση των επιδράσεων των στενωπών στη γενετική ποικιλότητα αποτελεί σημαντικό θέμα στη διατήρηση απειλούμενων ειδών ή πληθυσμών. Συνήθως η μείωση του πληθυσμιακού μεγέθους (και επομένως του δραστικού μεγέθους N_e) οδηγεί σε γενετικές στενωπές δηλαδή σε καταστάσεις απώλειας της γενετικής ποικιλότητας λόγω έντονης γενετικής παρέκκλισης, σε φαινόμενα ενδογαμίας και στην εγκαθίδρυση θνησιγόνων (deleterious) αλληλομόρφων, που με τη σειρά τους μειώνουν την ικανότητα προσαρμογής και αυξάνουν την πιθανότητα εξαφάνισης (Frankham 1995a, Cornuet & Luikart 1996). Επομένως, οι πληθυσμοί που έχουν πρόσφατα διέλθει από στενωπό είναι σημαντικό να εντοπίζονται ώστε να υπόκεινται σε ειδικές δράσεις διαχείρισης και διατήρησης.

Χαμηλή γενετική ποικιλότητα έχει παρατηρηθεί ωστόσο και σε είδη που σήμερα εμφανίζονται σχετικά άφθονα, όπως για παράδειγμα τα τσιτάχ (*Acinonyx jubatus*, O'Brien *et al.* 1983, Hedrick 1996) και οι θαλάσσιοι ελέφαντες (*Mirounga angustirostris*, Hoelzel *et al.* 1993). Σε αυτές τις περιπτώσεις δημογραφικά γεγονότα του παρελθόντος που επιβεβαιώνονται από ιστορικά στοιχεία φαίνεται ότι διαμόρφωσαν τα σύγχρονα επίπεδα ποικιλότητας. Πληθυσμοί δηλαδή που διήλθαν από στενωπό ή ιδρύθηκαν από μια μικρή ομάδα ατόμων (founder effect) στο παρελθόν, μπορεί σήμερα να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, ακόμη και στην περίπτωση που έχουν αυξηθεί σε μέγεθος.

Γενετική δομή και διατήρηση απειλούμενων πληθυσμών

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι σε ελάχιστα είδη υπάρχει ένας ενιαίος και γενετικά ομογενοποιημένος πληθυσμός (παμμικτικός) τα άτομα του οποίου διασταυρώνονται τυχαία (Balloux & Lugon-Moulin 2002). Η χωρική ασυνέχεια των ενδιατημάτων και η παρουσία αφιλόξενων ή επικινδυνών εκτάσεων μεταξύ τους, η αναπαραγωγική συμπεριφορά και η ικανότητα διασποράς των ατόμων του είδους καθώς και η ύπαρξη φυσικών φραγμάτων στη μετανάστευση είναι παράγοντες που μπορούν να εξηγήσουν την ύπαρξη ποικίλων πληθυσμιακών δομών (π.χ. τοπικοί πληθυσμοί, υποπληθυσμοί, κοπάδια, αποικίες, αγέλες) σε διάφορα επίπεδα γεωγραφικής κλίμακας (βλ. Warples & Gaggioti 2006)

Η πιο σημαντική γενετική επίπτωση της πληθυσμιακής υποδιαίρεσης είναι ότι τα άτομα των διακριτών πληθυσμών δεν μπορούν να αναπαράγονται ελεύθερα και τυχαία μεταξύ τους, με αποτέλεσμα οι τελευταίοι να οδηγούνται σταδιακά σε γενετική διαφοροποίηση και συγκεκριμένα πρότυπα γενετικής δομής. Η μετακίνηση γονιδίων από έναν πληθυσμό σε έναν άλλο είναι μια διαδικασία γνωστή ως γονιδιακή ροή και εξαρτάται από τους ρυθμούς μετανάστευσης των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών (Slatkin 1985, Page & Holmes 1998). Η γονιδιακή ροή δρα αντισταθμιστικά στις απώλειες γενετικής ποικιλότητας λόγω της τυχαίας παρέκκλισης ή της επιλογής, εισάγει πολυμορφισμό σε έναν πληθυσμό και είναι ένας παράγοντας που διατηρεί την ενδοειδική γενετική ποικιλότητα ομογενοποιώντας τους πληθυσμούς (Slatkin 1994). Πληθυσμοί οι οποίοι εμφανίζουν χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα γονιδιακής ροής αναμένεται να οδηγηθούν, προϊόντος του χρόνου, σε πολύ διαφορετικές αλληλικές συχνότητες εξαιτίας της γενετικής παρέκκλισης.

Ένα κλασικό και αναμενόμενο πρότυπο διαφοροποίησης και γενετικής δομής που παρατηρείται εξαιτίας της γεωγραφικά περιορισμένης γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών είναι η «απομόνωση λόγω απόστασης» (Wright 1943, Slatkin 1993). Όταν τα άτομα ενός είδους παρουσιάζουν μειωμένες ικανότητες διασποράς τότε ακόμη και σε μικρή γεωγραφική κλίμακα οι απομακρυσμένοι πληθυσμοί αναμένεται να είναι περισσότερο διαφοροποιημένοι σε σχέση με γειτονικούς. Αυτό οδηγεί σε θετική συσχέτιση των γενετικών και των γεωγραφικών αποστάσεων είτε εντός ενός συνεχώς κατανεμημένου είδους είτε μεταξύ πληθυσμών με διακριτή γεωγραφική θέση (Kimura & Weiss 1964, Sokal & Jacquez 1991).

Ο κατακερματισμός των ενδιαιτημάτων και η επακόλουθη υποδιαίρεση των πληθυσμών, που οφείλεται συχνά σε ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, έχει αναγνωριστεί ως μία από τις σημαντικότερες απειλές για τη γενετική ποικιλότητα των ειδών, καθώς μπορεί να επηρεάσει τόσο τη δημογραφική σύνθεση όσο και τα πρότυπα γενετικής δομής (Frankham *et al.* 2002). Ο περιορισμός ή η παύση της γονιδιακής ροής λόγω της δημιουργίας φραγμάτων για παράδειγμα αναμένεται να οδηγήσει σε γρήγορη απώλεια της γενετικής ποικιλότητας και σε φαινόμενα ενδογαμίας, ιδιαίτερα στην περίπτωση που οι προκείμενοι απομονωμένοι πληθυσμοί έχουν χαμηλό πληθυσμιακό μέγεθος (Frankham *et al.* 2002, Reed & Frankham 2003).

Προκειμένου να καταστρωθούν και να εφαρμοστούν κατάλληλες διαχειριστικές δράσεις για την προστασία της γενετικής ποικιλότητας είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την πληθυσμιακή δομή και το βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των υποπληθυσμών (π.χ. Rossiter *et al.* 2000, Eizirik *et al.* 2001). Ιδιαίτερα για τα απειλούμενα είδη ή εκείνα που εξαπλώνονται σε υποβαθμισμένα ή κατακερματισμένα ενδιαιτήματα, η γνώση της γενετικής δομής αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την αποτελεσματική διατήρησή τους. (Lande & Barrowclough 1987, Simberloff 1988, Hanski & Gilpin 1996, Marshall *et al.* 1999, Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005, Bergl & Vigilant 2007).

Η μελέτη της φυλογεωγραφίας στην υπηρεσία της διατήρησης και της διαχείρισης

Η φυλογεωγραφία ασχολείται με τη μελέτη των χωρικών κατανομών και των γεωγραφικών προτύπων που ακολουθούν οι γενεαλογικές γραμμές, κυρίως εντός του είδους, αλλά ακόμα και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών (Avisé *et al.* 1987, Avisé 2000). Βασικός σκοπός των φυλογεωγραφικών ερευνών είναι η περιγραφή της παρατηρούμενης γενετικής ποικιλότητας και της διαφοροποίησης μεταξύ των σύγχρονων πληθυσμών καθώς και η αποκάλυψη των ιστορικών και εξελικτικών διεργασιών που τις διαμόρφωσαν.

Πληθώρα τέτοιων ερευνών έχει πραγματοποιηθεί για είδη του βόρειου ημισφαιρίου, των οποίων οι κατανομές και τα πρότυπα γενετικής διαφοροποίησης έχουν επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από τον κύκλο των πλειστοκαινικών παγετωνικών επεισοδίων. Οι κλιματικές αλλαγές που συνέβησαν κατά τη διάρκεια του Τεταρτογενούς (εναλλασσόμενες παγετώδεις και μεσοπαγετώδεις περιόδους) τροποποίησαν έντονα το γεωμορφολογικό ανάγλυφο, τη φυσιολογία της βλάστησης και τα γεωγραφικά πρότυπα κατανομής της βιοποικιλότητας στην Παλαιαρκτική Ζώνη (Webb & Bartlein 1992, Hewitt 1999, 2000). Στην Ευρώπη, για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια των παγετώνων οι βόρειες περιοχές καλύπτονταν από εκτεταμένα στρώματα πάγου (permafrost), οι κεντρικές περιοχές μετατρέπονταν σε ψυχρές στέπες τούνδρας (steppe-tundra) ενώ τα φυλλοβόλα δάση περιοριζόνταν εν πολλοίς στις μεσογειακές χερσονήσους (Zagwijn 1992, Blondel 1995). Οι πληθυσμοί των θηλαστικών των εύκρατων δασών συρρικνώνονταν γεωγραφικά ακολουθώντας την αντίστοιχη συρρίκνωση της κατανομής των ενδιαιτημάτων τους και θεωρείται ότι κατά τα μέγιστα των παγετωνικών επεισοδίων επιβίωναν απομονωμένοι κυρίως στα νότια καταφύγια από όπου επανεποίκιζαν την κεντρική και βόρεια Ευρώπη κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους (Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 1999, 2001, Michaux *et al.* 2003). Οι κλιματικές αυτές αλλαγές καθόρισαν σε σημαντικό βαθμό τα σύγχρονα φυλογεωγραφικά πρότυπα των συγκεκριμένων ειδών και μπορούν να εξηγήσουν την αυξημένη γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών των νότιων έναντι των βόρειων περιοχών εξάπλωσης αλλά και τη γενετική ομοιότητα πολύ απομακρυσμένων περιοχών που συνδέονται με συγκεκριμένες οδούς επανεποίκισης (Hewitt 1999, 2000).

Ο εντοπισμός σημαντικών εξελικτικών γραμμών εντός του είδους, η ενδεχόμενη απώλεια των οποίων μπορεί να στερήσει σημαντικό μέρος της γενετικής του ποικιλότητας, είναι απαραίτητο βήμα για την εφαρμογή διαχειριστικών μέτρων κατά προτεραιότητα. Μετατοπίσεις και προγράμματα ενίσχυσης που αποσκοπούν στη διάσωση απειλούμενων πληθυσμών μπορεί να επιφέρουν τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα από τα επιδιωκόμενα σε περιπτώσεις όπου ο πληθυσμός προέλευσης είναι γενετικά έντονα διαφοροποιημένος σε σχέση με τον πληθυσμό αποδέκτη (Storfer 1999, Edmands 2002, McClelland & Naish 2007).

Γενετικοί δείκτες

Αρκετές μεθοδολογικές προσεγγίσεις έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί για την αποτίμηση με άμεσο ή έμμεσο τρόπο της ποικιλότητας του γενετικού υλικού. Η γενετική ποικιλότητα μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τη βοήθεια διάφορων χαρακτήρων, όπως είναι κάποια ποσοτικά χαρακτηριστικά του φαινοτύπου (π.χ. μορφομετρικές μετρήσεις), λειτουργικές πρωτεΐνες, γονίδια του πυρηνικού, του μιτοχονδριακού ή του χλωροπλαστικού DNA ή τα χρωμοσώματα (Avisé 1994, Hillis *et al.* 1996, Frankham *et al.* 2002). Οι μορφολογικοί χαρακτήρες αν και είναι εύκολο να παρατηρηθούν και να μετρηθούν δεν αποτελούν ιδανικούς δείκτες για τη μελέτη πληθυσμιακών και εξελικτικών διεργασιών καθώς μπορεί να επηρεάζονται από το περιβάλλον ή να τελούν υπό τον έλεγχο της φυσικής επιλογής (Beebe & Rowe 2004). Αντίθετα, η αξία των μοριακών δεικτών (πολυμορφικές πρωτεΐνες και αλληλουχίες DNA) στην περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας και στον εντοπισμό σημαντικών πληθυσμιακών δομών και εξελικτικών γραμμών έχει πλέον εμπεδωθεί στην έρευνα και την διαχειριστική πρακτική (βλ. Avisé 1994, Hillis *et al.* 1996, Sunnucks 2000). Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης επιλέχθηκαν δύο από τις πλέον χρησιμοποιούμενες κατηγορίες μοριακών δεικτών: η περιοχή ελέγχου (control region) του μιτοχονδριακού DNA και μικροδορυφορικοί τόποι του πυρηνικού DNA.

Περιοχή ελέγχου (control region D-loop) του μιτοχονδριακού DNA

Ο πολλαπλασιασμός γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA με τη βοήθεια συγκεκριμένων εκκινητών και η αλληλούχισή τους αποτελεί σήμερα τεχνική ρουτίνας και οδήγησε σε αλματώδη αύξηση των μελετών που αξιοποιούν τη μοριακή ποικιλότητα του συγκεκριμένου γονιδιώματος για την προσέγγιση θεμάτων μοριακής φυλογένεσης, πληθυσμιακής γενετικής και κυρίως φυλογεωγραφίας μεγάλου αριθμού ειδών ζώων. Το μιτοχονδριακό DNA διαθέτει χαρακτηριστικά που το έχουν καταστήσει έναν από τους πλέον χρησιμοποιούμενους δείκτες σε τέτοιου είδους μελέτες (βλ. Moritz *et al.* 1987, Harrison 1989, Avisé 1994, 2000).

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι απλοειδές και κατά κανόνα μητρικώς κληρονομούμενο και μη ανασυνδυαζόμενο (Harrison 1989, Avisé 1994). Ωστόσο, αποτελώντας στην ουσία έναν και μόνο γενετικό τόπο, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης μόνο της μητριαρχικής γενεαλογίας, η οποία θα μπορούσε κάλλιστα να είναι διαφορετική από αυτή των ειδών ή των πληθυσμών. Οι εξελικτικές αλλαγές που συμβαίνουν στο μιτοχονδριακό DNA και οδηγούν στη δημιουργία νέων απλοτύπων είναι κυρίως σημειακές μεταλλαγές ή μεταλλαγές μήκους (Brown 1985). Υψηλοί μεταλλακτικοί ρυθμοί (υψηλότεροι

σε σχέση με το πυρηνικό μη επαναλαμβανόμενο DNA, βλ. Wilson *et al.* 1985) μπορούν να παράξουν υψηλά επίπεδα ενδοειδικής ποικιλότητας και ισχυρή διαειδική διαφοροποίηση, ακόμη και σε σχετικά σύντομο εξελικτικά χρόνο (Avise *et al.* 1987). Το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος του μιτοχονδριακού DNA είναι κατά τέσσερις φορές μικρότερο σε σχέση το αντίστοιχο του πυρηνικού, με αποτέλεσμα να είναι ευαίσθητο στην επίδραση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (Birky *et al.* 1989).

Η περιοχή ελέγχου (control region ή D-loop), που αποτελεί μια μη κωδικοποιούσα περιοχή μήκους περίπου χιλίων βάσεων, χαρακτηρίζεται από τους ταχύτερους εξελικτικούς ρυθμούς σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA (Brown *et al.* 1993, Avise 2000, Hare 2001). Αυτό την καθιστά ιδιαίτερα πολυμορφική και επομένως κατάλληλο δείκτη για την περιγραφή των σχέσεων μεταξύ πληθυσμών εντός του είδους σε κλίμακα εκατοντάδων ή δεκάδων χιλιάδων χρόνων. Στα ελαφοειδή, η χρήση του συγκεκριμένου δείκτη είναι εκτεταμένη σε μελέτες φυλογένεσης, πληθυσμιακής γενετικής και φυλογεωγραφίας (ενδεικτικά βλ. Douzery & Randi 1997, Randi *et al.* 1998b, Skog *et al.* 2009).

Μικροδορυφορικοί τόποι

Οι μικροδορυφορικοί τόποι (microsatellite loci) είναι αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων μικρών νουκλεοτιδικών τμημάτων του DNA (1-6 νουκλεοτίδια) που βρέθηκαν κατανεμημένοι σε υψηλές συχνότητες κυρίως στο πυρηνικό γονιδίωμα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Litt & Luty 1989, Tautz 1989, Weber & May 1989, Selkoe & Toonen 2006). Η ποικιλομορφία στους συγκεκριμένους τόπους οφείλεται στη διαφορά του μήκους της αλληλουχίας που προκύπτει από την αύξηση ή τη μείωση του αριθμού των επαναλαμβανόμενων τμημάτων (Eisen 1999). Η δημιουργία νέων αλληλόμορφων σε κάθε μικροδορυφορικό τόπο θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα σφαλμάτων κατά την αντιγραφή («γλίστρημα αλυσίδας»=replication DNA slippage) ή ανασυνδυασμού μεταξύ των αλυσίδων του DNA (Tachida & Iizuka 1992, Harding *et al.* 1992, Li *et al.* 2002). Οι δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (π.χ. [CA]) αποτελούν την πλειονότητα των μικροδορυφορικών τόπων που έχουν βρεθεί σε πολλά είδη, ενώ ο αριθμός των επαναλήψεων συνήθως ποικίλλει μεταξύ πέντε και 40 (π.χ. [CA]₅-[CA]₄₀) (Li *et al.* 2002). Οι μικροδορυφορικοί τόποι χαρακτηρίζονται από υψηλούς μεταλλακτικούς ρυθμούς (10^{-2} - 10^{-6} μεταλλαγές ανά τόπο και ανά γενεά), οι οποίοι οδηγούν σε υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού (Schlötterer 2000).

Τα τελευταία χρόνια οι μικροδορυφορικοί τόποι έχουν αντικαταστήσει τα αλλοένζυμα ως οι πλέον χρησιμοποιούμενοι γενετικοί δείκτες για τη διερεύνηση της ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας και τη μελέτη της γενετικής δομής των πληθυσμών (Haig 1998, Hedrick 1999). Θεωρούνται ιδανικά εργαλεία για τέτοιου είδους αναλύσεις εξαιτίας του υψηλού πολυμορφισμού τους, της σχετική ευκολίας γονοτύπησης, της συγκυριαρχικής

κληρονόμησης που αντικατοπτρίζει με πολύ εύγλωττο τρόπο τη μενδελική κληρονομικότητα, αλλά και του μικρού τους μεγέθους που τα καθιστά ανθεκτικά σε φαινόμενα καταστροφής του DNA και άρα κατάλληλα για μελέτη δύσκολου υλικού (μη παρεμβατικές μέθοδοι) (για ανασκόπηση βλ. Zhang & Hewitt 2003, Selkoe & Toonen 2006). Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα των μικροδορυφόρων είναι ότι υπάρχουν πολλές χιλιάδες δείκτες κατά μήκος του γονιδιώματος (Neff & Gross 2001), οπότε μπορούν να επιλεγούν τόποι με ανεξάρτητη μεταξύ τους κληρονόμηση, αυξάνοντας έτσι κατά βούληση τη δυνατότητα ανάλυσης, την ανάκτηση γενεαλογικών δεδομένων και της σχέσης τους με δημογραφικά δεδομένα.

Η πλειονότητα των μικροδορυφορικών τόπων βρίσκεται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος με αποτέλεσμα οι τόποι αυτοί να μην υπόκεινται στη δράση της φυσικής επιλογής (Wren *et al.* 2000). Αν και η επιλεκτική τους ουδετερότητα αποτελεί σημείο διερεύνησης και αμφισβήτησης (βλ. Zhang & Hewitt 2003) εξακολουθούν να θεωρούνται ως επί το πλείστον ουδέτεροι δείκτες.

Γενετικές μελέτες του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού

Οι γενετικές μελέτες του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού υπήρξαν τα τελευταία είκοσι χρόνια πολυάριθμες και αφορούσαν διάφορα επίπεδα γεωγραφικής κλίμακας (Hartl *et al.* 1991, 1993, Lorenzini *et al.* 1993, 1997, 2002, 2003, Hewison 1995, Milosevic-Zlatanovic *et al.* 1997, Wiehler & Tiedemann 1998, Randi *et al.* 1998b, 2004, Wang & Schreiber 2001, Postma *et al.* 2001, Wang *et al.* 2002, Vernesi *et al.* 2002, Coulon *et al.* 2004, 2006, Nies *et al.* 2005, Zachos *et al.* 2006, Lorenzini & Lovari 2006, Thulin 2006, Kuehn *et al.* 2007, Royo *et al.* 2007, Gentile *et al.* 2009, Baker 2011). Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν -είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό- στις μελέτες αυτές ήταν κυρίως τα αλλοένζυμα, οι μικροδορυφορικοί τόποι του πυρηνικού DNA καθώς και αλληλουχίες της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA. Η ερευνητική στόχευση (δηλ. τα ακριβή ερωτήματα που τέθηκαν) και η μεθοδολογία ποσοτικοποίησης της γενετικής ποικιλότητας (π.χ. επιλογή μοριακού δείκτη) διέφεραν ανά περίπτωση. Αθροιστικά, ωστόσο, η προκύπτουσα πληροφορία επεξέτεινε τη γνώση ως προς την εξελικτική ιστορία και τη φυλογεωγραφία του είδους, αποκάλυψε την επίδραση ανθρωπογενών παραγόντων στη γενετική δομή και τη διαφοροποίηση των πληθυσμών του και έδωσε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη μεταναστευτική συμπεριφορά των δύο φύλων και την κοινωνική οργάνωση. Σταχυολογώντας τα κυριότερα ευρήματα των συγκεκριμένων μελετών μπορούμε να αναφέρουμε εν συντομία τα εξής:

Γενετική ποικιλότητα

Το ευρωπαϊκό ζαρκάδι χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, γεγονός που συνδέεται μάλλον με το ιστορικά μεγάλο δραστικό μέγεθος του συνολικού πληθυσμού του (Wiehler & Tiedemann 1998, Randi *et al.* 2004). Ως είδος δεν φαίνεται επομένως να αντιμετωπίζει προβλήματα γενετικής υποβάθμισης, τα οποία θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν ανησυχία και λήψη ιδιαίτερων διαχειριστικών μέτρων. Βέβαια σε τοπικό επίπεδο έχουν εντοπιστεί και πληθυσμοί που εμφανίζουν χαμηλή γενετική ποικιλότητα για συγκεκριμένους δείκτες ως αποτέλεσμα δημογραφικών γεγονότων (ιδρυτικά φαινόμενα) και ανθρωπογενών επιδράσεων (εντατική θήρευση, απομόνωση) (ενδεικτικά βλ. πληθυσμό Σουηδίας από Lorenzini & Lovari 2006, πληθυσμό Castelporziano από Vernesi *et al.* 2002).

Εξελικτική ιστορία και φυλογεωγραφία

Το ευρωπαϊκό ζαρκάδι αποτελεί τυπικό στοιχείο της πανίδας του Ολόκαινου (12.000 BP-σήμερα) αλλά η εμφάνισή του στον ευρωπαϊκό χώρο ανάγεται τουλάχιστον 600.000 χρόνια από σήμερα κατά το Μέσο Πλειστόκαινο (Lister *et al.* 1998). Το εκτεταμένο αρχείο απολιθωμάτων του (περισσότερες από 3000 καταγραφές, βλ. Sommer *et al.* 2009) δείχνει ότι αποτέλεσε ένα από τα πιο κοινά θηλαστικά στην Ευρώπη κατά το Ανώτερο Τεταρτογενές (120.000 BP-σήμερα).

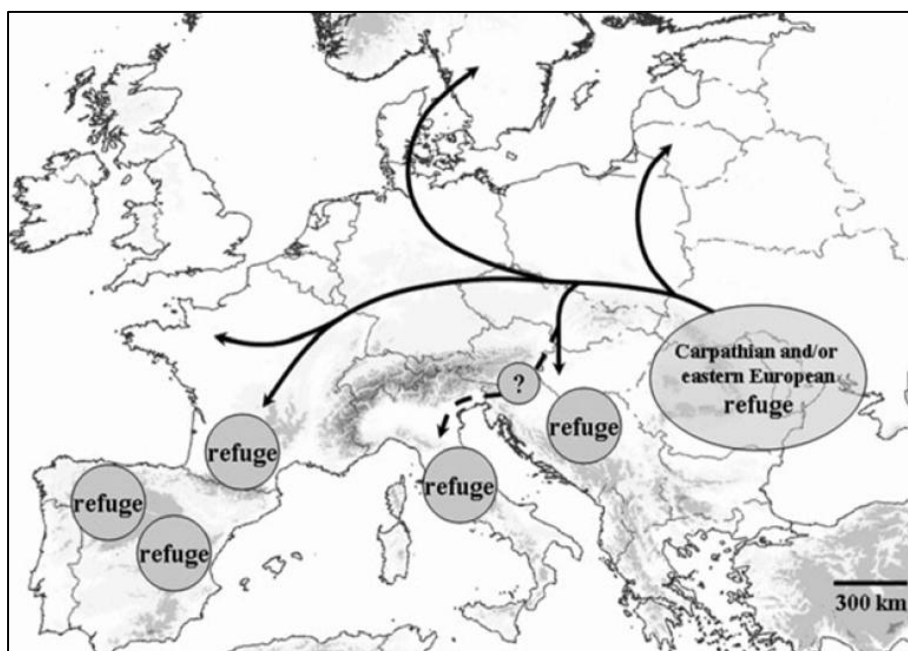
Η εξελικτική ιστορία και τα φυλογεωγραφικά πρότυπα του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού - ενός χαρακτηριστικού είδους των εύκρατων δασών (temperate species)- έχουν επηρεαστεί από τον κύκλο των πλειστοκαινικών παγετωνικών επεισοδίων. Κατά το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου (21-14,5 ky BP) οι πληθυσμοί του περιορίστηκαν στα τρία κλασικά καταφύγια (Ιβηρική, Ιταλική και Βαλκανική χερσόνησος) και ενδεχομένως και σε άλλα καταφύγια της κεντρικής και ανατολικής Ευρώπης (νότια Γαλλία, Καρπάθια) (Sommer *et al.* 2009). Μια σειρά από φυλογεωγραφικές μελέτες ευρείας δειγματοληπτικής κλίμακας έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να εξηγήσουν τα πρότυπα γεωγραφικής διαφοροποίησης των πληθυσμών του ζαρκαδιού και να προτείνουν τις βασικές διαδρομές επανεποίκισης της Ευρώπης μετά την υποχώρηση των παγετώνων (Wiehler & Tiedemann 1998, Vernesi *et al.* 2002, Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006, Royo *et al.* 2007, Baker 2011). Κοινό συμπέρασμα στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες, που στηρίχθηκαν κυρίως στη ανάλυση του πολυμορφισμού του μιτοχονδριακού DNA (περιοχή ελέγχου), είναι η ύπαρξη τριών γενεαλογικών γραμμών εντός του είδους (Ανατολικός, Δυτικός και Κεντρικός κλάδος) οι οποίες εμφανίζουν σαφή γεωγραφική κατανομή. Ο Ανατολικός και ο Δυτικός κλάδος περιορίζονται σε μεγάλο βαθμό στην νοτιανατολική Ευρώπη (κυρίως Βαλκάνια) και την Ιβηρική χερσόνησο αντίστοιχα και η προέλευσή τους θα πρέπει μάλλον να συνδεθεί με τα αντίστοιχα καταφύγια. Η προέλευση του Κεντρικού κλάδου, ο οποίος περιλαμβάνει

απλότυπους που εξαπλώνονται σε ολόκληρη σχεδόν την Ευρώπη εκτός από τις πιο νότιες περιοχές των τριών μεσογειακών χερσονήσων, εξακολουθεί να αποτελεί πεδίο επιστημονικής αντιπαράθεσης (για ανασκόπηση βλ. Sommer *et al.* 2009).

Πέραν των τριών βασικών κλάδων, σε κάποιες μελέτες αναγνωρίστηκαν σημαντικοί υποκλάδοι ή ανεξάρτητοι κλάδοι, οι οποίοι συνδέθηκαν με την ύπαρξη υπολειμματικών πληθυσμών ή επιπλέον καταφυγίων στην Ιβηρική (Randi *et al.* 2004, Royo *et al.* 2007) και την Ιταλική χερσόνησο (Vernesi *et al.* 2002, Randi *et al.* 2004, Gentile *et al.* 2009). Ένα σημαντικό στοιχείο που αξίζει να αναφερθεί και επισημαίνεται από πολλούς ερευνητές είναι ότι σε αρκετές περιπτώσεις οι μετατοπίσεις ζαρκαδιών για θηραματικούς σκοπούς, που έχουν ως αποτέλεσμα την ανάμειξη γηγενών και αλλόχθονων πληθυσμών, θολώνουν τη φυσική φυλογεωγραφική εικόνα και μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα (Sommer *et al.* 2009). Για παράδειγμα στην Ιταλία το γεγονός της επανεισαγωγής ζαρκαδιών τον προηγούμενο αιώνα από πληθυσμούς της κεντρικής και ανατολικής Ευρώπης μπορεί, αν αγνοηθεί, να δώσει εσφαλμένα την εντύπωση μιας αντίστροφης πορείας δηλαδή ότι οι ιταλικοί πληθυσμοί συνέβαλαν στην επανεποίκιση των περιοχών αυτών.

Οι Sommer *et al.* (2009) επαναξιολογώντας τη συσσωρευμένη γενετική πληροφορία από τις υπάρχουσες φυλογεωγραφικές μελέτες αλλά κυρίως χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη χρονολόγηση του απολιθωματικού αρχείου προσδιόρισαν την πιθανή γεωγραφική θέση των κυριότερων καταφυγίων και ένα συμβατό σενάριο των οδών επανεποίκισης μετά το τέλος της τελευταίας παγετώδους περιόδου (βλ. Εικόνα 2.1.1). Η κυρίαρχη πρόταση των συγκεκριμένων ερευνητών είναι ότι οι πληθυσμοί της Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης προήλθαν κυρίως από την διασπορά ζαρκαδιών από το καταφύγιο των Καρπαθίων ή και από καταφύγια ακόμη ανατολικότερα. Αντίθετα οι πληθυσμοί των μεσογειακών καταφυγίων παρέμειναν σχετικά περιορισμένοι γεωγραφικά ενώ η ύπαρξη απλοτύπων του Κεντρικού κλάδου στην Ιβηρική, την Ιταλική χερσόνησο και τα Βαλκάνια θα πρέπει να προέκυψε από την κάθοδο ζαρκαδιών από το βορά προς το νότο και όχι το αντίθετο.

Σε αντίθεση με την υπόλοιπη Ευρώπη, όπου έχει υπάρξει εκτεταμένη έρευνα και συγκέντρωση δειγμάτων από πολυάριθμους πληθυσμούς, στην Ελλάδα η δειγματοληψία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί περιορισμένη. Οι Randi *et al.* (2004) σε σύνολο 773 δειγμάτων και 44 πληθυσμών συνέλεξαν μόλις 16 δείγματα από έναν και μόνο ελληνικό πληθυσμό (Ζαγόρι) ενώ οι Lorenzini & Lovari (2006) σε σύνολο 376 δειγμάτων και 38 πληθυσμών μόλις 10 δείγματα από δύο ελληνικούς πληθυσμούς (Σέρρες, Φωκίδα). Και οι δύο ερευνητικές ομάδες τοποθετούν τους ελληνικούς πληθυσμούς στον Ανατολικό κλάδο.



Εικόνα 2.1.1 : Πλειστοκαινικά καταφύγια (refuges) και οδοί επανεποίκισης του ευρωπαϊκού ζαρκαδιού .

Πηγή: Sommer *et al.* 2009

Γενετική δομή και διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών

Το ζαρκάδι, παρά την ευρύτατη διασπορά του σε ολόκληρη σχεδόν την Ευρώπη, εμφανίζει σύνθετα πρότυπα χωρικής γενετικής δομής και διαφοροποίησης. Ανάλογα με τη γεωγραφική κλίμακα, τα πρότυπα αυτά φαίνεται ότι καθορίστηκαν τόσο από την εξελικτική ιστορία του είδους (π.χ. βικαριανιστικά φαινόμενα κατά τις παγετώδεις περιόδους στα νότια καταφύγια) όσο και από πιο πρόσφατα και τοπικά γεγονότα ανθρωπογενούς παρέμβασης. Ο κατακερματισμός των ενδιατημάτων του είδους και οι επακόλουθες απομονώσεις λόγω δημιουργίας τεχνητών φραγμάτων στη διασπορά, οι πληθυσμιακές στενωποί λόγω εντατικής θήρευσης και τα ιδρυτικά φαινόμενα κατά τη μετατόπιση αλλόχθονων πληθυσμών είναι οι κύριοι παράγοντες που σχετίζονται με την ανθρώπινη δραστηριότητα και επηρέασαν σημαντικά τη γενετική δομή του ζαρκαδιού (Randi *et al.* 2004).

Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής που εστιάστηκαν στην Ιβηρική και Ιταλική χερσόνησο έδειξαν ότι εντός των περιφερειακών αυτών περιοχών εξάπλωσης του είδους παρατηρήθηκε ισχυρή διαπληθυσμιακή διαφοροποίηση και έντονη γενετική δομή (Vernesi *et al.* 2002, Lorenzini *et al.* 2002, 2003, Royo *et al.* 2007, Gentile *et al.* 2009). Αντίθετα εντός της Κεντρικής Ευρώπης και της Σκανδιναβικής χερσονήσου οι πληθυσμοί εμφανίζονται λιγότερο διαφοροποιημένοι και με υψηλά ποσοστά γενετικής ανάμειξης (Hartl *et al.* 1991, Wang & Schreiber 2001, Nies *et al.* 2005, Zachos *et al.* 2006, Thulin 2006). Οι Wang & Schreiber (2001),

οι οποίοι ανέλυσαν τη γενετική ποικιλότητα και διαφοροποίηση ζαρκαδιών σε 27 περιοχές στην Ολλανδία, τη Γαλλία και τη Γερμανία με τη χρήση αλλοενζύμων και μικροδορυφορικών τόπων, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σε αυτή την περιοχή ο πληθυσμός θα μπορούσε να χαρακτηριστεί γενετικά ομογενοποιημένος (ουσιαστικά παμικτικός) και με χαμηλά επίπεδα πληθυσμιακής υποδιαίρεσης.

Το ζαρκάδι έχει τη δυνατότητα μετανάστευσης σε μεγάλες αποστάσεις (έως 120km/έτος βλ. Wahlström & Liberg 1995). Παρόλα αυτά συνήθως εμφανίζει έντονη φιλοπατρία και οι αποστάσεις διασποράς είναι της τάξης λίγων χιλιομέτρων (Linnell *et al.* 1998). Η συγκεκριμένη συμπεριφορά είναι δυνατόν να οδηγεί σε πρότυπα απομόνωσης λόγω απόστασης και να εξηγεί τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ υποπληθυσμών ακόμα και σε μικρή γεωγραφική κλίμακα (Kuehn *et al.* 2007). Ο κατακερματισμός των ενδιατημάτων και η ύπαρξη ανθρωπογενών ή φυσικών φραγμάτων έχει βρεθεί ότι μπορεί να επηρεάσει τη γενετική δομή των πληθυσμών των ζαρκαδιών και να οδηγήσει σε διαφοροποίηση μεταξύ γειτονικών πληθυσμών (Coulon *et al.* 2004, 2006, Kuehn *et al.* 2007).

Στόχοι και ερωτήματα

Η περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας του ελληνικού ζαρκαδιού (θα χρησιμοποιούμε στο εξής αυτόν τον όρο για το σύνολο των πληθυσμών της Ελλάδας) υπήρξε έως σήμερα εξαιρετικά περιορισμένη και αποσπασματική. Οι μόνες έρευνες, οι οποίες συμπεριέλαβαν δείγματα από την Ελλάδα (Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006), είχαν ως γενικότερο στόχο τη διερεύνηση της φυλογεωγραφίας του είδους και του ρόλου που έπαιξαν πρόσφατες ανθρωπογενείς παρεμβάσεις (π.χ. μετατοπίσεις, κυνήγι, υποβάθμιση ενδιατημάτων) στη διαμόρφωση της σύγχρονης κατανομής της γενετικής του ποικιλότητας στον ευρύτερο ευρωπαϊκό χώρο. Η διαφορετική χωρική κλίμακα και τα ερωτήματα που τέθηκαν από αυτούς τους ερευνητές, αναπόφευκτα, δεν επέτρεψαν μια ενδελεχή μελέτη του ελληνικού ζαρκαδιού, κυρίως λόγω του μικρού και γεωγραφικά περιορισμένου (λίγες περιοχές δειγματοληψίας) αριθμού δειγμάτων που συγκέντρωσαν.

Η ανυπαρξία μελετών που να περιγράφουν και να αξιολογούν το εύρος της γενετικής ποικιλότητας και τη γενετική δομή του ζαρκαδιού εντός της Ελλάδας έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη απαραίτητων στοιχείων για την ορθή διαχείριση και τη διατήρηση του είδους σε αυτή τη σημαντική περιοχή εξάπλωσής του. Χρησιμοποιώντας ως μοριακούς δείκτες την περιοχή ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA και 14 μικροδορυφορικούς δείκτες του πυρηνικού DNA επιχειρήσαμε να καλύψουμε το κενό αυτό δίνοντας απάντηση σε συγκεκριμένα ερωτήματα:

A. Ποια η ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλότητα σε μια σειρά σημαντικών φυσικών πληθυσμών αλλά και σε έναν εκτρεφόμενο; (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) Παρουσιάζεται μειωμένη σε σχέση με πληθυσμούς του είδους σε άλλες περιοχές της Ευρώπης;

B. Υπάρχει και σε ποιο βαθμό γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των φυσικών πληθυσμών ή μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το ζαρκάδι συγκροτεί έναν ενιαίο παμμικτικό πληθυσμό στην Ελλάδα;

Γ. Η πληθυσμιακή συρρίκνωση και ο περιορισμός της εξάπλωσής του στην Ελλάδα κατά τον περασμένο αιώνα άφησε γενετικά ίχνη; Μπορούμε να εντοπίσουμε πληθυσμούς που διήλθαν από πρόσφατες γενετικές στενωπούς ή παρουσιάζουν σημαντική γενετική απομόνωση;

Ως προς τη ευρύτερη φυλογεωγραφία του είδους επιχειρήσαμε να ελέγξουμε την ορθότητα προηγούμενων υποθέσεων, στηριζόμενοι στην ποικιλομορφία της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA. Η πληροφορία που προέκυψε από την κοινή ανάλυση των απλοτύπων που βρέθηκαν στην Ελλάδα και δημοσιευμένων απλοτύπων από την υπόλοιπη Ευρώπη χρησιμοποιήθηκε ώστε να διερευνηθεί αν το ελληνικό ζαρκάδι συνιστά μια διακριτή, γενετικά διαφοροποιημένη εξελικτική μονάδα εντός του είδους που χρήζει ιδιαίτερης διαχειριστικής προσοχής. Επιπλέον, ελέγχθηκε η συμβολή του ελληνικού ζαρκαδιού στην επανεποίκιση της κεντρικής Ευρώπης μετά το πέρας της τελευταίας παγετώδους περιόδου καθώς και το ενδεχόμενο διείσδυσης αλλόχθονων γενετικών δεξαμενών στους τοπικούς πληθυσμούς μέσω ανεξέλεγκτων εμπλουτισμών.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Δειγματοληψία

Για τη μελέτη της γενετικής ποικιλοότητας του ζαρκαδιού στον ελλαδικό χώρο συγκεντρώθηκαν συνολικά 96 δείγματα κατά το χρονικό διάστημα από τον Οκτώβριο του 2003 έως το Δεκέμβριο του 2007. Η δειγματοληψία οργανώθηκε κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να εξασφαλιστεί α) η κατά το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερη κάλυψη της περιοχής εξάπλωσης του είδους στην Ελλάδα και β) η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση δειγμάτων, σε συνάρτηση πάντα με τη διαθεσιμότητα οικονομικών πόρων, χρόνου και ανθρώπινου δυναμικού.

Με δεδομένη την αδυναμία λήψης δειγμάτων ιστού ή αίματος ύστερα από σύλληψη ζώων, εξετάστηκαν και τελικά εφαρμόστηκαν εναλλακτικές μέθοδοι. Πιο συγκεκριμένα, ως ασφαλέστερη πηγή συγκέντρωσης επαρκούς αριθμού δειγμάτων επιλέχθηκε η λήψη μυϊκού ή ηπατικού ιστού από θηρευθέντα ζώα σε περιοχές όπου το κυνήγι τους επιτρέπεται, δηλαδή στις Ελεγχόμενες Κυνηγετικές Περιοχές (ΕΚΠ) Κόζιακα, Όσσας, Λαϊλιά και Παρνασσίδας (βλ. Εικόνα 2.2.1). Οι πληθυσμοί των ζαρκαδιών που ζουν στις περιοχές αυτές είναι απόλυτα φυσικοί και μάλιστα θα μπορούσαν να θεωρηθούν από τους πλέον εύρωστους στην ελληνική επικράτεια. Ύστερα από συνεργασία με τα κατά τόπους Δασαρχεία και αξιοποιώντας διαδοχικές κυνηγετικές περιόδους καταφέραμε να συλλέξουμε συνολικά 65 δείγματα από τις προαναφερθείσες περιοχές. Ο αριθμός των ζώων που θηρεύονται ανά κυνηγετική περίοδο και περιοχή ποικίλλει και καθορίζεται από το οικείο Δασαρχείο σε ετήσια βάση. Δυστυχώς δεν έγινε κατορθωτό να ληφθούν δείγματα από όλα τα θηρευθέντα άτομα, είτε λόγω απροθυμίας των κυνηγών να επιτρέψουν τη λήψη τους, είτε λόγω ελλιπούς συνεννόησης και συνεργασίας με τους θηρευτές.

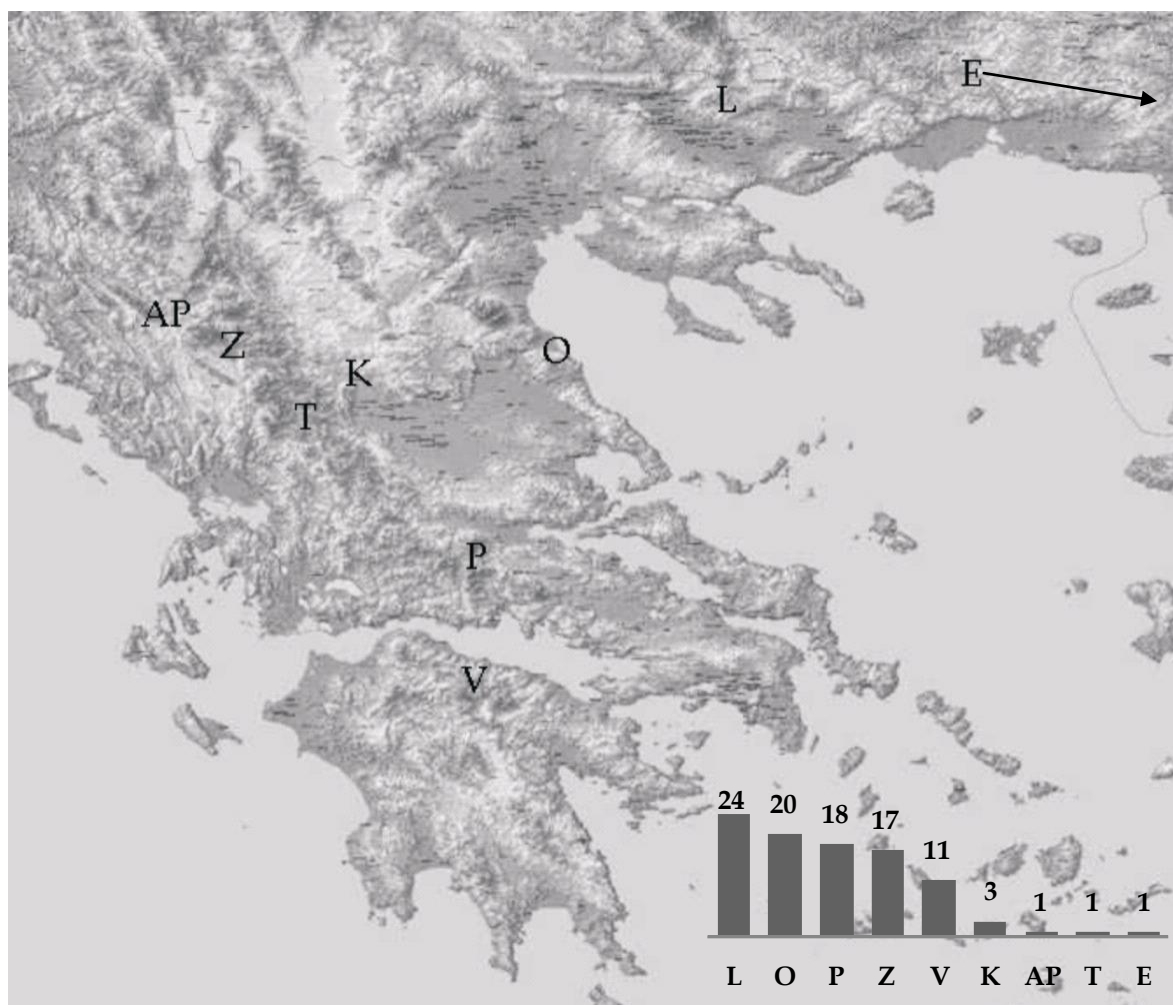
Αναλυτικά η διαδικασία λήψης και αποθήκευσης των ιστών περιελάμβανε:

- α) Τεμαχισμό τμήματος μυϊκού ή ηπατικού ιστού σε μέγεθος περίπου 2 cm³ και σε κατά το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες. Η αποφυγή επαφής του ιστού με γυμνά ανθρώπινα χέρια και η χρήση καθαρών οργάνων κοπής (νυστέρι, μαχαίρι), που είχαν απολυμανθεί με αιθυλική αλκοόλη (95%), εξασφάλισε την αποφυγή απομόνωσης «ξένου» DNA στα επόμενα στάδια.
- β) Καταγραφή συγκεκριμένων στοιχείων για κάθε δείγμα: φύλο, βάρος, περιοχή θήρευσης, ημερομηνία θήρευσης, είδος ιστού.
- γ) Αποθήκευση σε πλαστικούς σωλήνες όγκου 50ml που περιείχαν αιθυλική αλκοόλη (95%) ως μέσο συντήρησης. Αυτή η μέθοδος διατήρησης του ιστού είναι εύκολη (δεν απαιτείται ψύξη του υλικού), οικονομική, εξασφαλίζει εύκολη μεταφορά και επιτρέπει γενικά τη δίχως ιδιαίτερα προβλήματα εξαγωγή ολικού DNA (Kilpatrick 2002). Για να περιοριστεί η αποδόμηση του DNA ακολουθήθηκε μια σειρά πρακτικών χειρισμού των δειγμάτων όπως

συχνή αντικατάσταση της αιθανόλης στους σωλήνες, περαιτέρω τεμαχισμός των κομματιών ιστού και αποθήκευση στους 4°C.

Εκτός των δειγμάτων από τις ΕΚΠ συλλέχθηκαν οποραδικά δείγματα από πληθυσμούς ζαρκαδιών στις περιοχές Ζαγορίου, Τζουμέρκων και Πωγωνίου στην Ήπειρο, στην περιοχή της Ανατολικής Ροδόπης (Αλεξανδρούπολη) καθώς και στο εκτροφείο θηραμάτων Καλαβρύτων (βλ. Εικόνα 2.2.1). Στις περιπτώσεις αυτές πραγματοποιήθηκε «μη παρεμβατική» δειγματοληψία, δηλαδή συγκεντρώθηκε νεκρό οργανικό υλικό (κέρατα, τρίχες, οστά, δέρμα, κόπρανα) με απευθείας συλλογή στο πεδίο. Συνολικά συλλέχθηκαν 31 δείγματα με την πλειονότητα να προέρχεται από την περιοχή Ζαγορίου (17 δείγματα) και το εκτροφείο Καλαβρύτων (11 δείγματα). Ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων που συγκεντρώθηκε με μη παρεμβατική δειγματοληψία ήταν κέρατα που βρέθηκαν στο πεδίο. Κέρατα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, διαθέτουν μόνο τα αρσενικά ζαρκάδια, τα οποία με μια αποπρωτική διαδικασία τα αλλάζουν σε ετήσια βάση (Sempéré & Boissin 1983). Περιορισμένος αριθμός δειγμάτων προέρχονταν από κρανία και υπολείμματα δέρματος, που αποσιπάστηκαν από κουφάρια νεκρών ζώων ή τρίχες, που βρέθηκαν σε περιοχές φωλιάσματος (γιατάκια). Τόσο στην περίπτωση των κεράτων όσο και στην περίπτωση των κρανίων ακολουθήθηκε μια διαδικασία λήψης λεπτόκοκκης σκόνης, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του DNA. Πιο συγκεκριμένα, από διάφορα σημεία κάθε δείγματος και με τη χρήση ηλεκτρικού τρυπανιού, που δούλευε σε χαμηλές στροφές ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του ιστού και η επακόλουθη αποδόμηση του DNA, λήφθηκε σκόνη όγκου περίπου 2 cm³ και αποθηκεύτηκε σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf των 2 ml.

Αναλυτικές πληροφορίες (ημερομηνία και περιοχή συλλογής, είδος ιστού, φύλο κ.ά.) για το σύνολο των δειγμάτων δίνονται τον Πίνακα 3 του Παραρτήματος ενώ η γεωγραφική θέση των περιοχών δειγματοληψίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2.1. Οι μεταξύ των περιοχών χιλιομετρικές αποστάσεις (Πίνακας 2.2.1), δίνουν μια εικόνα της διασποράς των δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκαν σε αναλύσεις συσχέτισης των γεωγραφικών με τις γενετικές αποστάσεις. Προκειμένου οι συσχετίσεις αυτές να έχουν κάποιο βιολογικό νόημα, οι υπολογισμοί των αποστάσεων τροποποιήθηκαν ως εξής: α) στην περίπτωση που η ευθεία απόσταση μεταξύ δύο περιοχών διέρχεται από θαλάσσια τμήματα, υπολογίστηκε αντί αυτής η ελάχιστη απόσταση που συνδέει τις δύο περιοχές διαμέσου χερσαίων τμημάτων (π.χ. βλ. απόσταση μεταξύ Λαϊλιά και Όσσας) και β) ο μη φυσικός πληθυσμός των Καλαβρύτων εξαιρέθηκε.



Εικόνα 2.2.1 : Περιοχές δειγματοληψίας και αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκαν ανά περιοχή*

Πίνακας 2.2.1 : Χιλιομετρικές αποστάσεις μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας*.

km	E	L	O	P	T	K	Z
L	195						
O	390	210					
P	500	330	130				
T	485	310	155	130			
K	425	250	100	125	60		
Z	460	285	165	185	60	70	
AP	475	295	190	215	85	100	30

* E: Ανατολική Ροδόπη, L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, T: Τζουμέρκα, K: Κόζιακας, Z: Ζαγόρι, AP: Άνω Πωγώνι

2. Εξαγωγή και ποσοτικοποίηση DNA

Προκειμένου να εξαχθεί ολικό γενωμικό DNA από τα δείγματα μαλακού ιστού (μυς, ήπαρ, δέρμα) που είχαν διατηρηθεί σε αιθανόλη, χρησιμοποιήθηκε το kit απομόνωσης Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε για κάθε δείγμα 25-30 mg ιστού και ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στο εγχειρίδιο του kit πήραμε τελικά διάλυμα καθαρού DNA όγκου 100 μ L. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (5 mM Tris/Cl, pH 8.5). Ειδικό πρωτόκολλο του ίδιου kit χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή DNA από τρίχες (χρησιμοποιήθηκαν περίπου 10 ρίζες τριχών ανά δείγμα). Για τα δείγματα σκόνης από κέρατα ή οστά, καθώς και για όσα από τα δείγματα μαλακού ιστού η απομόνωση με kit δεν είχε επιτυχία, ακολουθήθηκε διαδικασία εξαγωγής με άλας βάσει τροποποιημένου πρωτοκόλλου (Miller 1988, Μερτζανίδου 2010). Η επιτυχία ή μη της εξαγωγής αλλά και η ποιότητα (βαθμός κατάτμησης) του DNA ελέγχονταν κάθε φορά με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του διαλύματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ύπαρξη ασθενών ζωνών ή η απουσία φθορισμού ήταν ενδεικτική της αναποτελεσματικής εξαγωγής DNA ενώ η εικόνα εκτεταμένου φθορισμού (smear) ενδεικτική της σοβαρής κατάτμησης του εξαγόμενου DNA.

Η ποσοτικοποίηση είναι ένα απαραίτητο βήμα πριν από οποιαδήποτε περαιτέρω προσπάθεια πολλαπλασιασμού αφού η συγκέντρωση του DNA που λειτουργεί ως μήτρα καθορίζει εν πολλοίς την επιτυχία των αντιδράσεων PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης). Μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τον μη ικανοποιητικό πολλαπλασιασμό, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις (πυκνό διάλυμα DNA) οδηγούν συνήθως σε προβληματικές αντιδράσεις PCR είτε λόγω αύξησης του πολλαπλασιασμού και μη ειδικών προϊόντων είτε λόγω της παρουσίας σε μεγάλη συγκέντρωση διάφορων αναστολέων. Οι αναστολείς είναι πιθανόν να έχουν παραμείνει στο διάλυμα του DNA κατά την εξαγωγή. Εμπειρικά αποδείχθηκε ότι συγκεντρώσεις 10-100ng/ μ L ήταν ικανοποιητικές για να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα των αντιδράσεων PCR. Η συγκέντρωση του DNA στα διαλύματα εξαγωγής μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Για δείγματα με υψηλή συγκέντρωση προχωρήσαμε στις κατάλληλες αραιώσεις ώστε η τελική συγκέντρωση να εμπίπτει στα επιθυμητά όρια.

3. Πολλαπλασιασμός και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ελέγχου (control region) του μιτοχονδριακού DNA

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής ελέγχου (control region) του μιτοχονδριακού DNA των ζαρκαδιών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Lcap-Pro και Hcap-Phe (Randi *et al.* 1998b, Πίνακας 2.2.2). Το συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών πολλαπλασιάζει ένα τμήμα του μιτοχονδριακού DNA μήκους 985 ζευγαριών βάσεων περίπου, που αποτελεί το σύνολο της περιοχής ελέγχου. Σε κάποια δείγματα, στα οποία ο κερματισμός του DNA δεν επέτρεπε τον πολλαπλασιασμό ολόκληρης της περιοχής, χρησιμοποιήθηκαν οι εσωτερικοί εκκινητές Lcap-362 και Hcap-493 (Randi *et al.* 1998b) σε συνδυασμό με τους εξωτερικούς (Lcap-362 με Hcap-Phe, Lcap-Pro με Hcap-493).

Πίνακας 2.2.2 : Αλληλουχίες εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής ελέγχου mtDNA

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')
Lcap-Pro	CGT CAG TCT CAC CAT CAA CCC CCA AAGC
Hcap-Phe	GGG AGA CTC ATC TAG GCA TTT TCA GTG
Lcap-362	AAT CAC CAT GCC GCG TGA AACC
Hcap-493	TGA GAT GGC CCT GAA GAA AGA ACC

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματο κυκλοποιητή (Biorad MyCycler) με το πρόγραμμα θερμοκρασιακού προφίλ που παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.3. Ο όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 20 μ L και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που προέκυψαν ύστερα από βελτιστοποίηση της αντίδρασης δίνονται στον Πίνακα 2.2.4. Ο καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης πολυμερισμού έγινε με τη μέθοδο κατακρήμνισης με αιθανόλη (ethanol/sodium acetate precipitation).

Πίνακας 2.2.3 : Πρόγραμμα αντίδρασης PCR

Στάδιο	Θ (°C)	Χρόνος (sec)	Κύκλοι
Προεπώαση	94	180	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	94	45	35
Σύνδεση (Annealing)	60	45	
Επιμήκυνση (Extension)	72	45	
Τελικό βήμα επιμήκυνσης	72	300	1

Πίνακας 2.2.4 : Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
Taq DNA πολυμεράση (Finnzymes)	0,04 u/ μ L
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq	1 X
MgCl ₂	3 mM
Εκκινητής 1	0,5 μ M
Εκκινητής 2	0,5 μ M
dNTP's (dATP,dCTP,dGTP, dTTP)	0,2 mM
DNA μήτρα	1 μ L (10-100 ng/ μ L) σε αντίδραση όγκου 20 μ L

Αντίδραση αλληλούχισης (sequencing)

Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR ποσοτικοποιήθηκαν με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop1000 και με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη 1% και σύγκριση με DNA marker γνωστής συγκέντρωσης. Κατόπιν έγινε η αντίδραση αλληλούχισης με τη διδεόξυ μέθοδο του Sanger χρησιμοποιώντας το κιτ BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems). Το κιτ αυτό περιέχει μείγμα απλών δεοξυνουκλεοτιδίων και διδεοξυνουκλεοτιδίων σημασμένων με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, μαζί με DNA πολυμεράση. Η αντίδραση αλληλούχισης έγινε μέσω PCR, όπου στους διαδοχικούς κύκλους επιμηκώνεται η αλυσίδα του DNA στόχου (το προϊόν της αρχικής PCR) από τη μία άκρη με χρήση ενός εκκινητή. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται θραύσματα όλων των μηκών (από τον εκκινητή συν μία βάση μέχρι το συνολικό μήκος του αρχικού DNA στόχου) που στο 3' άκρο τους έχουν ενσωματώσει ένα διδεοξυνουκλεοτιδίο, το οποίο και παρεμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας.

Η αντίδραση αλληλούχισης έγινε σε τελικό όγκο 10 μL και περιλάμβανε 2 μL μείγμα BigDye v3.1, 1 μL BigDye buffer 5X, 0.5 μL εκκινητή 10 μM , 20-40 ng DNA στόχο (για μήκος αλληλουχίας 500 – 1000 βάσεων) και dH_2O . Το πρόγραμμα θερμοκρασιακού προφίλ της αντίδρασης παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.5. Η μετάβαση από τη μία θερμοκρασία στην άλλη έγινε με ρυθμό 1 $^{\circ}\text{C}/\text{sec}$.

Πίνακας 2.2.5 : Πρόγραμμα αντίδρασης αλληλούχισης

Στάδιο	Θ ($^{\circ}\text{C}$)	Χρόνος (sec)	Κύκλοι
Προεπώαση	95	300	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	95	30	50
Σύνδεση (Annealing)	50	10	
Επιμήκυνση (Extension)	60	240	
Τελική διατήρηση	4	∞	1

Μετά την PCR, η αντίδραση καθαρίστηκε από τα μη ενσωματωμένα διδεοξυνουκλεοτίδια με κατακρήμνιση με αιθανόλη όπως και στην περίπτωση των προϊόντων PCR. Στο τέλος το προϊόν της αντίδρασης διατηρήθηκε ξηρό στους -20 $^{\circ}\text{C}$ και τελικά διαλύθηκε σε 10 μL φορμαμίδιο υψηλής καθαρότητας (HiDi formamide), αποδιάταχθηκε με θέρμανση στους 95 $^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά και απότομη ψύξη και ηλεκτροφορήθηκε στον αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών (sequencer) ABI 3700 (Applied Biosystems). Κατά την ηλεκτροφόρηση τα θραύσματα εκτίθενται σε δέσμη laser καθώς περνούν διαδοχικά μπροστά από ειδική κάμερα που καταγράφει τον φθορισμό που παράγουν οι χρωστικές που φέρουν τα διδεοξυνουκλεοτίδια. Με αυτό τον τρόπο παράγεται ένα χρωματογράφημα (βλ. για παράδειγμα την εικόνα στη σελ. 25) που αντιπροσωπεύει την υπό μελέτη αλληλουχία.

4. Αναλύσεις μιτοχονδριακού DNA

Επεξεργασία αλληλουχιών - Απλότυποι

Πριν από οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία, κάθε χρωματογράφημα που αντιπροσώπευε μια αντίδραση αλληλούχισης, εισήχθη για ανάγνωση και οπτικό έλεγχο στο πρόγραμμα MEGA v.4 (Tamura, Dudley, Nei and Kumar 2007) ώστε να προσδιοριστεί με ακρίβεια η αλληλουχία. Η ένταση, η καθαρότητα και η οξύτητα των κορυφών του χρωματογραφήματος συνεκτιμήθηκαν για να αποσαφηνιστεί η πρωτοδιάταξη του τμήματος DNA που αλληλουχίστηκε. Όπως προαναφέρθηκε, για κάθε δείγμα πραγματοποιήσαμε τουλάχιστον δύο αντιδράσεις αλληλούχισης οπότε προέκυψαν αντίστοιχα τουλάχιστον δύο αναγνώσεις της αλληλουχίας. Στοιχίζοντας με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) το σύνολο των αλληλουχιών για κάθε δείγμα, οδηγηθήκαμε με βεβαιότητα στη τελική αλληλουχία της περιοχής ελέγχου του mtDNA του συγκεκριμένου δείγματος. Το μήκος της αλληλουχίας που προσδιορίστηκε για κάθε δείγμα κυμαίνονταν ανάλογα με την ποιότητα των αρχικών χρωματογραφημάτων.

Το σύνολο των τελικών αλληλουχιών (όλα τα δείγματα) στοιχίστηκαν εκ νέου με το πρόγραμμα CLUSTAL W και με έναν δημοσιευμένο απλότυπο που αντιστοιχεί σε ολόκληρη την περιοχή ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA του ζαρκαδιού (Κωδικός GenBank Z70318, Randi *et al.* 1998b), ώστε να προκύψει η τελική στοιχιστή (alignment) και να προσδιοριστεί το μέγιστο δυνατό ομόλογο τμήμα των αλληλουχιών. Με βάση την τελική στοιχιστή εντοπίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις και προσδιορίστηκαν οι διακριτοί απλότυποι. Η αντιστοίχιση των αλληλουχιών σε απλότυπους έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος DAMBE (Xia & Xie 2001). Οι απλότυποι που προέκυψαν κατατέθηκαν στη βάση γενετικών δεδομένων GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Γενετική ποικιλότητα

Για κάθε πληθυσμό αλλά και συνολικά για την Ελλάδα υπολογίσαμε με το πακέτο στατιστικών προγραμμάτων ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) τους τυπικούς δείκτες γενετικής ποικιλότητας, όπως την απλοτυπική (H_d) και τη νουκλεοτιδική (π) ποικιλότητα και τη μέση τιμή των διαφορών των ζευγών απλοτύπων (k). Επίσης, υπολογίσαμε την παράμετρο θ ως ένα δείκτη ποικιλότητας που αποκαλύπτει στοιχεία της δημογραφίας των πληθυσμών.

Ο υπολογισμός της απλοτυπικής ποικιλότητας στηρίζεται στον αριθμό και τη συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών απλοτύπων σε έναν πληθυσμό σύμφωνα με τη σχέση (Nei 1987):

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 \right)$$

όπου n είναι ο αριθμός των ατόμων που αλληλουχήθηκαν, a ο αριθμός των απλοτύπων και p_i η συχνότητα κάθε απλότυπου στον πληθυσμό. Η απλοτυπική ποικιλότητα δεν αποκαλύπτει το βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των αλληλουχιών αφού δεν εμπεριέχει πληροφορίες για τον αριθμό και τη συχνότητα των μεταλλαγών που έχουν συσσωρευθεί.

Η μέση τιμή των διαφορών των ζευγών απλοτύπων (mean number of pairwise differences) εκφράζει την απόκλιση μεταξύ των απλοτύπων με βάση τον αριθμό των συσσωρευμένων μεταλλαγών. Υπολογίζεται με τη σχέση (Tajima 1983):

$$k = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^a p_i p_j d_{ij}$$

όπου d_{ij} είναι ο αριθμός των μεταλλαγών που συνέβησαν κατά την απόκλιση των απλοτύπων i και j και p_i, p_j οι συχνότητες των απλοτύπων.

Η νουκλεοτιδική ποικιλότητα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση μεταξύ των απλοτύπων (Nei 1987) και ουσιαστικά δίνει την ποικιλότητα στο μοριακό επίπεδο του DNA. Συνδέεται με την παράμετρο k με τη σχέση:

$$\pi = \frac{k}{L}$$

όπου L το μήκος σε νουκλεοτίδια των αλληλουχιών που συγκρίνονται.

Η παράμετρος $\theta = 2N_e m$, όπου N_e το δραστικό μέγεθος πληθυσμού (δηλ. ο μέσος αριθμός ατόμων που αναπαράγονται επιτυχώς σε κάθε γενιά) και m ο μεταλλακτικός ρυθμός ανά γενεά, υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των διακριτικών θέσεων (segregating sites) S και σύμφωνα με τη σχέση (Watterson 1975):

$$\theta = \frac{s}{a_1}$$

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} (1/i)$$

Ο παράγοντας a_1 είναι ένας παράγοντας διόρθωσης που χρησιμοποιείται για να ενσωματώσει στον υπολογισμό το μέγεθος του δείγματος. Στις διακριτικές θέσεις, δηλαδή στις πολυμορφικές θέσεις, δεν συμπεριλαμβάνονται οι ελλείψεις.

Ο έλεγχος για στατιστικά σημαντικές διαφορές των εκτιμώμενων δεικτών ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών έγινε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) που ακολουθήθηκε από έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (multiple range tests) στο πρόγραμμα Statgraphics 4.0.

Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Για να εκτιμήσουμε τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των απλοτύπων και των πληθυσμών, επιλέξαμε αρχικά την πιο απλή μέτρηση του βαθμού της νουκλεοτιδικής διαφοροποίησης που είναι το ποσοστό p των νουκλεοτιδικών θέσεων στις οποίες οι αλληλουχίες διαφέρουν (απόσταση p , p -distance). Η προσέγγιση αυτή αποτυπώνει τις διαφορές ανάμεσα στις αλληλουχίες αγνοώντας το ενδεχόμενο να έχουν συμβεί παραπάνω από μία αλλαγές στην ίδια θέση (ομοπλασία). Με την ανάπτυξη σειράς μοντέλων έχει επιχειρηθεί να προκύψουν διορθωμένες γενετικές αποστάσεις με βάση το ειδικό πρότυπο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που παρατηρείται στις υπό εξέταση αλληλουχίες. Το μοντέλο των Tamura και Nei (TrN, 1993), που έχει εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί σε μελέτες της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA ελαφοειδών (π.χ. Randi *et al.* 1998b, Randi *et al.* 2004, Xiao *et al.* 2007), ενσωματώνει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του προτύπου εξέλιξης που εμφανίζει το συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Πιο αναλυτικά, υπολογίζει τις γενετικές αποστάσεις (d) λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη άνισων συχνοτήτων μεταξύ των νουκλεοτιδίων ($g_A \neq g_T \neq g_C \neq g_G$), διαφορετικών ρυθμών υποκατάστασης (ρυθμός μεταπτώσεων \neq ρυθμός μεταστροφών, ρυθμός μεταπτώσεων πουρινών $[A \leftrightarrow G] \neq$ ρυθμός μεταπτώσεων πυριμιδινών $[T \leftrightarrow C]$) και ρυθμού υποκατάστασης που ποικίλλει ανάλογα με τη θέση στη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Υπολογίσαμε λοιπόν τις γενετικές αποστάσεις και με το συγκεκριμένο μοντέλο θεωρώντας ότι ο ρυθμός υποκαταστάσεων ποικίλλει ανάλογα με τη θέση (ακολουθεί γ κατανομή) και χρησιμοποιώντας τη δημοσιευμένη τιμή της παραμέτρου $\alpha=0,28$ (Vernesi *et al.* 2002).

Για τη σύγκριση μεταξύ των πληθυσμών χρησιμοποιήσαμε και στις δύο προσεγγίσεις (p -distance και TrN93-distance) τη διορθωμένη για την ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα απόσταση (net average nucleotide divergence, net D), η οποία προκύπτει από τη σχέση:

$$net D = d_{XY} - \frac{(dX - dY)}{2}$$

όπου d_{XY} είναι η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των πληθυσμών X και Y και dX , dY οι μέσες αποστάσεις μεταξύ των ατόμων κάθε πληθυσμού. Όλες οι αποστάσεις εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια του φυλογενετικού προγράμματος MEGA v.4 (Tamura, Dudley, Nei and Kumar 2007). Επειδή στο συγκεκριμένο πρόγραμμα οι θέσεις των ελλείψεων δεν συνυπολογίζονται ως πολυμορφικές θέσεις και προκειμένου να μην απολέσουμε μέρος της παρατηρούμενης γενετικής ποικιλότητας, θεωρήσαμε για τους υπολογισμούς μας ότι οι ελλείψεις λογίζονται ως μεταστροφές (Zachos *et al.* 2006, Vernezi *et al.* 2002)

Γενετική δομή και διαφοροποίηση μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών

Η γενετική δομή των πληθυσμών έχει παραδοσιακά μελετηθεί με τη χρήση των εκτιμητών του Wright (Wright 1951,1965) που είναι γνωστοί στη βιβλιογραφία με τον όρο *F-statistics* και οι οποίοι χρησιμοποιούν τις αποκλίσεις των αλληλικών συχνοτήτων από τις αναμενόμενες σε έναν παμμικτικό πληθυσμό προκειμένου να εκτιμήσουν το βαθμό διαφοροποίησης. Διάφορες τεχνικές έχουν προταθεί για την ανάλυση πολυμορφισμών με τη χρήση των *F-statistics* (για λεπτομερείς αναφορές βλ. Excoffier *et al.*1992) αλλά λίγες από αυτές προσπάθησαν να μεταφράσουν τη μοριακή πληροφορία σε εκτίμηση του μεγέθους της ενδοειδικής υποδιαίρεσης (Takahata and Palumbi 1985, Lynch and Crease 1990).

Η προσέγγισή μας στηρίχθηκε στη μεθοδολογία της ανάλυσης μοριακής διακύμανσης (AMOVA), η οποία προτάθηκε από τους Excoffier, Smouse και Quattro (1992) ως ένα εναλλακτικό πλαίσιο για αναλύσεις μοριακών δεδομένων αρκετά ευέλικτο ώστε να εφαρμόζεται σε ποικίλους μοριακούς δείκτες (αλληλουχίες DNA, ισοενζυμικά συστήματα, μικροδορυφορικοί δείκτες, RFLPs κ.ά) και η οποία χρησιμοποιεί τη μοριακή πληροφορία που συγκεντρώνεται σε μια πληθυσμιακή μελέτη προκειμένου να διερευνήσει τη γενετική διαφοροποίηση των υπό εξέταση πληθυσμών. Η AMOVA είναι μια ιεραρχική ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance) που έχει ως στόχο να ανακαλύψει και να περιγράψει την ιεραρχική δομή ενός συνόλου δειγμάτων, διαιρώντας τη συνολική παρατηρούμενη διακύμανση της ποικιλότητας σε συνιστώσες συνδιακύμανσης (covariance components) που οφείλονται σε διαφορές τόσο εντός όσο και ανάμεσα σε προκαθορισμένες ομαδοποιήσεις των δειγμάτων (Excoffier *et al.* 2005). Η διαφορά της σε σχέση με παραδοσιακές προσεγγίσεις ιεραρχικής ανάλυσης (βλ. Weir and Cockerham 1984) έγκειται στο γεγονός ότι για τον προσδιορισμό των διαφορών ποικιλότητας δεν περιορίζεται στη συχνότητα γονιδίων αλλά συνοπολογίζει τη μοριακή διαφοροποίηση (γενετική απόσταση) μεταξύ των δειγμάτων.

Σχηματικά μια ανάλυση AMOVA περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προσδιορισμός της μοριακής ταυτότητας των δειγμάτων. Στην περίπτωση της χρήσης αλληλουχιών DNA (sequences), προσδιορίζεται η ακριβής αλληλουχία (απλότυπος) για κάθε δείγμα.

2. Υπολογισμός ενός πίνακα γενετικών αποστάσεων μεταξύ των απλοτύπων με τη χρήση κάποιας από τις συνήθεις μετρήσεις (π.χ. αριθμός συσσωρευμένων μεταλλαγών).

3. *A priori* ομαδοποίηση των δειγμάτων. Ξεκινώντας από ένα αρχικό σύνολο δειγμάτων (ατόμων), αυτά μπορούν να κατανεμηθούν μεταξύ διαφορετικών ομάδων, κάθε μια από τις οποίες περιλαμβάνει μια σειρά πληθυσμών και κάθε πληθυσμός μια σειρά ατόμων. Η ομαδοποίηση μπορεί να γίνει π.χ. με γεωγραφικά κριτήρια ανάλογα με τις περιοχές δειγματοληψίας. Πρακτικά η ομαδοποίηση συνιστά την περιγραφή μιας υποτιθέμενης πληθυσμιακής δομής που θα ελεγχθεί ή αλλιώς τη διατύπωση μιας υπόθεσης

για τον διαμερισμό της παρατηρούμενης διακύμανσης της ποικιλότητας. Η συνολική διακύμανση της μοριακής ποικιλότητας σ^2 που παρατηρείται είναι το άθροισμα της συνιστώσας συνδιακύμανσης που οφείλεται σε διαφορές ανάμεσα στους απλότυπους εντός ενός πληθυσμού (σ_c^2), της συνιστώσας συνδιακύμανσης που οφείλεται σε διαφορές ανάμεσα στους απλότυπους από διαφορετικούς πληθυσμούς εντός μιας ομάδας (σ_b^2) και της συνιστώσας συνδιακύμανσης που οφείλεται σε διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (σ_a^2). Με την AMOVA υπολογίζεται (Excoffier *et al.* 1992) το ποσοστό κατά το οποίο η κάθε συνιστώσα συνεισφέρει στη συνολική διακύμανση. Με βάση τις συνιστώσες της διακύμανσης υπολογίζονται οι συντελεστές Φ (fixation indices) που συνοψίζουν το βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμιακών διαιρέσεων και αποτελούν μοριακά ανάλογα των συντελεστών F (F -statistics, Wright 1965):

$$\Phi_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2}, \quad \Phi_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}, \quad \Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2}$$

Ο δείκτης Φ_{CT} μετρά τη διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων πληθυσμών, ο Φ_{SC} μεταξύ των πληθυσμών εντός των ομάδων και ο Φ_{ST} μεταξύ των πληθυσμών σε ολόκληρο το σύνολο δειγμάτων. Οι τιμές των συντελεστών κυμαίνονται από μηδέν (0) που σημαίνει πρακτικά καμία διαφοροποίηση, έως τη μονάδα (1) που είναι μια θεωρητική τιμή μέγιστης διαφοροποίησης.

4. Έλεγχος της υποθετικής ομαδοποίησης. Η στατιστική ισχύς των συντελεστών Φ ουσιαστικά καθορίζει και την αποδοχή ή την απόρριψη της αρχικής υπόθεσης ομαδοποίησης. Τα επίπεδα σημαντικότητας των συντελεστών Φ εκτιμώνται με τη χρήση ελέγχων μη παραμετρικής αντιμετάθεσης (non-parametric permutation tests) όπως περιγράφονται από τους Excoffier *et al.* (1992). Συνήθως απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός αντιμεταθέσεων (permutations) για να επιτευχθεί υψηλή ακρίβεια στην τελική πιθανότητα (>1000 αντιμεταθέσεων σύμφωνα με τους Excoffier *et al.* 2005). Η διαφορά της AMOVA σε σχέση με την κλασική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έγκειται ακριβώς στο ότι οι υποθέσεις ομαδοποιήσεων ελέγχονται με μεθόδους αντιμετάθεσης έτσι ώστε να παρακάμπτεται η υπόθεση της κανονικής κατανομής (που δεν ισχύει για μοριακά δεδομένα).

Στην έρευνά μας εφαρμόσαμε τη μεθοδολογία της AMOVA όπως περιλαμβάνεται στο στατιστικό πρόγραμμα ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) προκειμένου να ελέγξουμε την ύπαρξη γενετικής δομής στο ελληνικό ζαρκάδι. Στις αναλύσεις χρησιμοποιήσαμε τα δείγματα από τις τέσσερις βασικές περιοχές δειγματοληψίας (Ζαγόρι, Όσσα, Λαϊλιάς, Παρνασσίδα) αφού μόνο γι αυτές ο αριθμός των δειγμάτων ήταν αρκετά μεγάλος ώστε να υπάρχει η έννοια του πληθυσμού αλλά και στατιστική υποστήριξη των αποτελεσμάτων. Εκτός από την υπόθεση διαφοροποίησης μεταξύ των τεσσάρων αυτών πληθυσμών ελέγχθηκαν διάφορα επίπεδα ομαδοποίησης με γεωγραφικά κριτήρια (ανατολική-δυτική ομάδα, βόρεια-νότια, κά.). Για τον υπολογισμό των πινάκων γενετικής απόστασης χρησιμοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις (αριθμός συσσωρευμένων μεταλλαγών και απόσταση υπό το μοντέλο Tamura-

Nei), ενώ τα επίπεδα σημαντικότητας των συντελεστών Φ εκτιμήθηκαν με 30000 τυχαίες αντιμεταθέσεις. Με τη βοήθεια του προγράμματος ARLEQUIN και με τις δύο προσεγγίσεις γενετικής απόστασης υπολογίσαμε επίσης τις τιμές Φ_{st} ανά ζεύγος πληθυσμών (pairwise Φ_{st}).

Φυλογεωγραφική ανάλυση

Για τη διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων και της θέσης των ελληνικών πληθυσμών στη γενικότερη φυλογεωγραφία του ζαρκαδιού ήταν απαραίτητη η επεξεργασία και η ανάλυση ενός ευρύτερου συνόλου δεδομένων, που θα περιελάμβανε όσο το δυνατόν περισσότερη γενετική πληροφορία από εκτεταμένες περιοχές της γεωγραφικής εξάπλωσης του είδους. Για το σκοπό αυτό επιλέξαμε να στηριχθούμε στην πρόσφατη και περιεκτική εργασία των Randi *et al.* (2004), που διερεύνησαν τη φυλογεωγραφία του ζαρκαδιού αναλύοντας την αλληλουχία 704 νουκλεοτιδίων της περιοχής ελέγχου του mtDNA σε 617 δείγματα από 44 περιοχές της Ευρώπης. Εκτός λοιπόν από τις αλληλουχίες που προέκυψαν από τη δική μας μελέτη χρησιμοποιήσαμε 81 δημοσιευμένους απλότυπους (Randi *et al.* 2004) για τους οποίους είχαμε στοιχεία σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης και την περιοχή προέλευσής τους (βλ. Πίνακα 4 Παραρτήματος). Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται δύο απλότυποι (H10, H11) που σύμφωνα με τους συγγραφείς προέρχονται από δειγματοληψία στην περιοχή του Ζαγορίου. Οι νέες αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τις αλληλουχίες των δικών μας δειγμάτων και προσδιορίστηκαν οι απλότυποι που προέκυψαν για το κοινό τμήμα (704 bp).

Η αναπαράσταση των φυλογενετικών σχέσεων στο ενδοειδικό επίπεδο με τη χρήση δεδομένων όπως η ποικιλότητα του μιτοχονδριακού DNA είναι συχνά μια απαιτητική εργασία κυρίως εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των δειγμάτων και των μικρών γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων. Η προσέγγιση με παραδοσιακές μεθόδους φυλογενετικής ανάλυσης [π.χ. μέγιστη πιθανοφάνεια (maximum likelihood), μέγιστη φειδωλότητα (maximum parsimony), ελάχιστη εξέλιξη (minimum evolution)] δεν μπορεί να αποτυπώσει μια σειρά φαινομένων που συμβαίνουν στο επίπεδο του πληθυσμού και τα οποία παραβιάζουν μερικές από τις υποθέσεις των μεθόδων αυτών (Posada & Crandall 2001). Αυτό οδηγεί σε ανεπαρκή ανάλυση ή απεικόνιση των γενεαλογικών σχέσεων. Πιο συγκεκριμένα:

- Η χαμηλή απόκλιση που παρατηρείται μεταξύ ατόμων που ανήκουν στο ίδιο είδος στην ουσία συνεπάγεται την ύπαρξη περιορισμένων χαρακτήρων κατάλληλων για φυλογενετική ανάλυση και επομένως ελαττωμένη στατιστική ισχύ των παραδοσιακών μεθόδων φυλογένεσης.
- Στη γενετική δεξαμενή των φυσικών πληθυσμών αναμένεται να συνυπάρχουν τόσο προγονικοί απλότυποι όσο και απλότυποι που έχουν παραχθεί ως αποτέλεσμα

μεταλλαγών (απόγονοι). Ένας προγονικός απλότυπος συνήθως παράγει πολλαπλούς απλότυπους και μάλιστα σύμφωνα με τη γενεαλογική θεωρία (coalescence theory) όσο πιο παλιός είναι τόσο περισσότεροι «απόγονοι» απλότυποι θα συνδέονται μαζί του (Crandall & Templeton 1993), δημιουργώντας ακτινωτές συνδέσεις (multifurcations) και καταλαμβάνοντας ενδιάμεσες θέσεις. Στις παραδοσιακές μεθόδους φυλογενετικής ανάλυσης όμως η απεικόνιση των σχέσεων στηρίζεται σε διχαλωτά δένδρα (bifurcating trees) και όλοι οι απλότυποι καταλαμβάνουν τις άκρες των κλάδων και όχι ενδιάμεσους κόμβους.

- Οι εξελικτικές διαδικασίες που συνήθως δρουν στο επίπεδο των πληθυσμών, όπως ο ανασυνδυασμός και οι ομοπλασίες, παράγουν πολύπλοκες, κυκλικές σχέσεις (loops) μεταξύ των απλοτύπων. Οι ομοπλασίες, για παράδειγμα, που είναι ομοιότητες οι οποίες οφείλονται σε αντίστροφες, συγκλίνουσες ή παράλληλες μεταλλαγές και δεν δηλώνουν κοινή εξελικτική ιστορία, είναι φαινόμενα που δεν απεικονίζονται με τις παραδοσιακές μεθόδους φυλογενετικής ανάλυσης. Στην περίπτωση της μεθόδου μέγιστης φειδωλότητας λόγου χάρη η αντιμετώπιση των ασαφειών που προκύπτουν λόγω ομοπλασίας αντιμετωπίζονται με την επιλογή του δένδρου εκείνου που ελαχιστοποιεί τον αριθμό των υποθέσεων παράλληλης, αντίστροφης ή συγκλίνουσας μετάλλαξης, χωρίς να αποκαλύπτεται πού μπορεί αυτές οι μεταλλαγές να συνέβησαν.

Φαίνεται από τα παραπάνω ότι οι παραδοσιακές μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης δεν είναι πολλές φορές επαρκείς για την περιγραφή της ενδοειδικής φυλογένεσης. Οι σημαντικότερες σύγχρονες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν προκειμένου να επιλύσουν αυτό το «πρόβλημα» είναι οι μέθοδοι φυλογενετικών δικτύων (phylogenetic networks). Τα δίκτυα, σε αντίθεση με τα διχαλωτά δένδρα των παραδοσιακών μεθόδων, είναι γραφήματα που επιτρέπουν την ύπαρξη κυκλικών σχέσεων (loops), ακτινωτών συνδέσεων (multifurcations) και την κάλυψη ενδιάμεσων κόμβων από προγονικούς, σωζόμενους απλότυπους (για ανασκόπηση των μεθόδων δικτύων βλ. Posada & Crandall 2001). Μπορούν επομένως να εξηγήσουν τις διαδικασίες που συμβαίνουν στο επίπεδο του είδους και να επιλύσουν ενδεχόμενες ασάφειες ενσωματώνοντας προβλέψεις (Posada & Crandall 2001) με βάση τη θεωρία της γενετικής πληθυσμών και κυρίως τη θεωρία γενεαλογίας (coalescence theory). Οι περισσότερες από τις μεθόδους δικτύων είναι μέθοδοι αποστάσεων με την έννοια ότι ελαχιστοποιούν (με κάποιους περιορισμούς) τις αποστάσεις (δηλ. τον αριθμό των μεταλλάξεων) μεταξύ των απλοτύπων.

Η φυλογεωγραφία του ζαρκαδιού στη μελέτη μας αναλύθηκε με ένα δίκτυο διάμεσης σύνδεσης (Median-Joining network, Bandelt *et al.* 1999) που κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος NETWORK v.4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltd., Suffolk, UK, <http://www.fluxus-engineering.com>). Η μέθοδος δικτύων διάμεσης σύνδεσης ξεκινά συνδέοντας τα δένδρα «ελάχιστης ανάπτυξης» (minimum-spanning trees) σε ένα απλό δίκτυο

και στη συνέχεια προσθέτει σε αυτό με κριτήρια φειδωλότητας ενδιάμεσα σημεία, που αντιπροσωπεύουν απλότυπους που λείπουν (προγονικοί απλότυποι που έχουν εξαφανιστεί ή δεν εντοπίστηκαν με τη δειγματοληψία). Ως δένδρο ελάχιστης ανάπτυξης αναφέρεται το γράφημα που συνδέει απλότυπους χωρίς κυκλικές σχέσεις και προγονικούς κόμβους, με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται το συνολικό μήκος των κλάδων, δηλ. το άθροισμα των αποστάσεων μεταξύ των απλοτύπων. Η ακριβής διαδικασία κατασκευής ενός δικτύου διάμεσης σύνδεσης με τη χρήση των κατάλληλων αλγορίθμων περιγράφεται αναλυτικά στην εργασία των Bandelt *et al.* (1999). Η ανάλυση με το πρόγραμμα NETWORK έγινε χρησιμοποιώντας τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις, δηλαδή ίσα σταθμά απόστασης για όλες τις μεταλλαγές (τιμή 10), σταθμά μεταπτώσεων/μεταστροφών 1:1 και παράμετρο $\epsilon=0$ ώστε να προκύψει το δίκτυο ελάχιστης ανάπτυξης- minimum spanning network.

5. Πολλαπλασιασμός μικροδορυφορικών δεικτών και γονοτύπηση των δειγμάτων

Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία και τις διάφορες μελέτες γενετικής πληθυσμών που έχουν πραγματοποιηθεί σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς ζαρκαδιών, επιλέξαμε αρχικά για την ανάλυσή μας 25 μικροδορυφορικούς δείκτες (βλ. Πίνακα 2.2.8). Σε πρώτη φάση πραγματοποιήσαμε δοκιμαστικές αντιδράσεις PCR σε μικρό αριθμό (8-16) αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, ώστε να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της αντίδρασης (T_m , συγκέντρωση μαγνησίου), με απώτερο σκοπό τη χρήση όσο το δυνατόν περισσότερων δεικτών για τις αναλύσεις μας. Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματο κυκλοποιητή (Biorad MyCycler) με το πρόγραμμα θερμοκρασιακού προφίλ που παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.6. Ο όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 10 μ L και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που προέκυψαν ύστερα από βελτιστοποίηση της αντίδρασης δίνονται στον Πίνακα 2.2.7. Οι πρόσθιοι εκκινητές (Forward) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σημασμένοι με τις φθορίζουσες χρωστικές TAMRA (μαύρο χρώμα), HEX (πράσινο χρώμα), ROX (κόκκινο χρώμα) ή FAM (μπλε χρώμα) (Πίνακας 2.2.8). Καταφέραμε επιτυχώς να πολλαπλασιάσουμε 21 γενετικούς τόπους.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR αναλύθηκαν σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών (sequencer) ABI 3700 (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μεγέθους (size standard) την κλίμακα Genescan 500-LIZ (Applied Biosystems). Το μέγεθος των

αλληλομόρφων εκτιμήθηκε από τα χρωματογραφήματα που παρήχθησαν για κάθε άτομο με τη βοήθεια του προγράμματος STRand v. 2.3.94 (Veterinary Genetics Laboratory, University of California, Davis). Η γονοτύπηση του συνόλου των δειγμάτων μας έγινε για 14 τόπους, αφού μόνο αυτοί εμφάνισαν πολυμορφισμό στις δοκιμαστικές αντιδράσεις (βλ. Πίνακα 2.2.8).

Πίνακας 2.2.6 : Πρόγραμμα αντίδρασης PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (sec)	Κύκλοι
Προεπίωση	94	120	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	94	45	35
Σύνδεση (Annealing)	T _a (βλ. Πίνακα 2.2.6)	45	
Επιμήκυνση (Extension)	72	45	
Τελικό βήμα επιμήκυνσης	72	300	1

Πίνακας 2.2.7 : Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της αντίδραση PCR

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
Taq DNA πολυμεράση (Gennaxon)	0,04 u/ μ L
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq	1 X
MgCl ₂	1,5-3 mM (βλ. Πίνακα 2.2.6)
Εκκινητής F (Πρόσθιος)	0,5 μ M
Εκκινητής R (Ανάστροφος)	0,5 μ M
dNTP's (dATP,dCTP,dGTP, dTTP)	0,2 mM
DNA μήτρα	1 μ L (10-100 ng/ μ L) σε αντίδραση όγκου 10 μ L

Πίνακας 2.2.8 : Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη. (F: forward, R: reverse, Tα: θερμοκρασία σύνδεσης, Td: touchdown PCR)

	Δείκτης	Εκκινητές (5'→3')	Αναφορές	Χρωστική	Tα (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Πολυμορφισμός
1	<u>SR-CRSP1</u>	F: TGCAAGAAGTTTTCCAGAGC R: CATTCTCAGGAAACTCTGAAAC	Vial <i>et al.</i> 2003	FAM	53	2,5	+
2	<u>ILST011</u>	F: GCTTGCTACATGGAAAGTGC R: CTA AAAATGCAGAGCCCTACC	Vial <i>et al.</i> 2003, Royo <i>et al.</i> 2007	FAM	55	2,5	+
3	<u>RT1</u>	F: TGCCTTCTTTCATCCAACAA R: CATCTCCCATCCTCTTAC	Poetsch <i>et al.</i> 2001	HEX	55	2,5	+
4	RT6	F: TTCCTCTTACTCATTCTTGG R: CGGATTTTGACACTGTAC		FAM	49	3	Μονομορφικός
5	<u>RT7</u>	F: CCGTTCCTACTCTTCTCTC R: ACTTTTCACGGGCACCTGGTT	Poetsch <i>et al.</i> 2001, Lorenzini <i>et al.</i> 2002, Lorenzini <i>et al.</i> 2003	TAMRA	55	2,5	+
6	RT9	F: TGAAGTTTAATTCCACTCT R: CAGTCACTTTCATCCACAT	Poetsch <i>et al.</i> 2001	ROX	55	2,5	Μονομορφικός
7	RT23	F: GGCCATTGGGTAGTCTCC R: AGCCTCCCTGAGTGCTCT		FAM	55	2,5	Μονομορφικός
8	RT27	F: CCAAAGACCCAACAGATG R: TTGTAACACAGCAAAAGCATT		TAMRA	56	2,5	Μονομορφικός
9	RT30	F: CACTTGGCTTTTGGACTTA R: CTGGTGTATGTATGCACACT		ROX	Αδυναμία πολλαπλασιασμού		?
10	BM757	F: TGGAAACAATGTA AACCTGGG R: TTGAGCCACCAAGGAACC	Vial <i>et al.</i> 2003, Galan <i>et al.</i> 2003, Coulon <i>et al.</i> 2004, Royo <i>et al.</i> 2007	FAM	58	2	Μονομορφικός
11	OarFCB304	F: CCCTAGGAGCTTCAATAAAGAATCGG R: CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	Galan <i>et al.</i> 2003, Coulon <i>et al.</i> 2004	HEX	Αδυναμία πολλαπλασιασμού		?
12	<u>OMHC1</u>	F: ATCTGGTGGGCTACAGTCCATG R: GCAATGCTTTCTAAATTCTGAGGAA	Groth & Weatherall 1994, Vial <i>et al.</i> 2003	HEX	Td* 60→50	2,5	+

Πίνακας 2.2.8 : Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη. (F: forward, R: reverse, T_a: θερμοκρασία σύνδεσης, T_d: touchdown PCR)

	Δείκτης	Εκκινήτες (5'→3')	Αναφορές	Χρωστική	T _a (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Πολυμορφισμός
13	<u>NVHRT16</u>	F: ATTCTAAGCCCAAATAATCTT R: TCTAAGGGGTCTGTGTCTT	Røed & Midthjell 1998, Poetsch <i>et al.</i> 2001, Lorenzini <i>et al.</i> 2002, Lorenzini <i>et al.</i> 2003, Royo <i>et al.</i> 2007	TAMRA	55	2,5	+
14	<u>NVHRT21</u>	F: GCAGCGGAGAGGAACAAAAG R: GGGGAGGAGCAGGGAAATC		ROX	52	1,5	+
15	<u>NVHRT24</u>	F: TGTGGACTATAGGGAGC R: GTGTACAAAAAGTGATTGAGT		Røed & Midthjell 1998, Lorenzini <i>et al.</i> 2002, Lorenzini <i>et al.</i> 2003	HEX	55	2,5
16	<u>NVHRT30</u>	F: GTGGAGCATTGTGTATGTGT R: GCCCCCACTGTGTTTT	ROX		55	2,5	+
17	<u>NVHRT71</u>	F: GAGTIGGCAGGTGTAAGG R: CAGTGGGGGAAATGATG	FAM		55	2,5	+
18	<u>NVHRT73</u>	F: CTTGCCCATTTAGTGTCTTCT R: TGCGTGTCAATTGAATAGGAG	Røed & Midthjell 1998, Poetsch <i>et al.</i> 2001, Vial <i>et al.</i> 2003	ROX	55	2,5	+
19	<u>Roe1</u>	F: AAATTGGCTCTGCAATCGG R: ACACAAAAGCCACCCAATAC	Fickel & Reinsch 2000, Lorenzini <i>et al.</i> 2002, Vial <i>et al.</i> 2003	ROX	54	3	+
20	Roe3	F: TAACCTCCTCACTGGGGCGCG R: CCCAAATCCATAGGCCAG	Fickel & Reinsch 2000, Vial <i>et al.</i> 2003	HEX	Αδυναμία πολλαπλασιασμού		?
21	Roe5	F: TAATATGAATCACTTGGATG R: TCCACCTCCCAGCCTGCATC	Fickel & Reinsch 2000, Lorenzini <i>et al.</i> 2002, Vial <i>et al.</i> 2003	TAMRA	Αδυναμία πολλαπλασιασμού		?
22	<u>Roe6</u>	F: GTTCCTAGCCCAGTGCTC R: TGCAGACCTGGCAGAC	Fickel & Reinsch 2000, Lorenzini <i>et al.</i> 2002, Lorenzini <i>et al.</i> 2003, Vial <i>et al.</i> 2003	HEX	49	2	+
23	<u>Roe8</u>	F: AAGCCGCGCTTGAAGGAG R: ATCAAGCTCCCCTCTTCG		FAM	49	3	+
24	<u>Roe9</u>	F: TTGGCGTCATTCCAACAGAG R: TCACAGCAGAAATGTCATCTG		ROX	51	3	+
25	Roe10	F: GAAGACCCTGTGCGATC R: TGAGGTGCTCCAAGTGTC	Fickel & Reinsch 2000	FAM	45	3	Μονομορφικός

6. Αναλύσεις μικροδορυφορικών δεικτών

Γενετική ποικιλότητα

Έχοντας προσδιορίσει τους γονότυπους των ατόμων του ζαρκαδιού, επιχειρήσαμε να περιγράψουμε -με τη βοήθεια μιας σειράς δεικτών- την παρατηρούμενη γενετική ποικιλότητα τόσο σε κάθε πληθυσμό ξεχωριστά (για πληθυσμούς με τουλάχιστον πέντε δείγματα) όσο και στο σύνολο των δειγμάτων. Καταρχάς λοιπόν υπολογίσαμε την συχνότητα κάθε αλληλομόρφου σε κάθε γενετικό τόπο και για κάθε πληθυσμό με τη βοήθεια του προγράμματος GenAlEx v6.3 (Peakall & Smouse 2006).

Ο απλούστερος δείκτης που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η αλληλική ποικιλότητα A , δηλαδή ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο. Ο δείκτης επηρεάζεται από το δειγματοληπτικό μέγεθος, ιδίως όταν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών. Για να έχουμε μια πιο αμερόληπτη εκτίμηση και κυρίως για να εντοπίσουμε σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, υπολογίσαμε και τη διορθωμένη τιμή A_u (αλληλική ποικιλότητα ανεξάρτητη από το δειγματοληπτικό μέγεθος) η οποία προκύπτει με αναγωγή στον μικρότερο αριθμό ατόμων που γονοτυπήθηκαν για έναν συγκεκριμένο τόπο (πρόγραμμα FSTAT, Goudet 1995, 2002).

Η ποικιλότητα μπορεί επίσης να περιγραφεί με τους δείκτες ετεροζυγωτίας. Η μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία H_o εκφράζει το ποσοστό των ετερόζυγων ατόμων σε έναν πληθυσμό για το σύνολο των γενετικών τόπων ενώ η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία H_e το ποσοστό των ετερόζυγων ατόμων με την προϋπόθεση ότι ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για την αποτύπωση της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας χρησιμοποιήθηκε η αμερόληπτη ετεροζυγωτία $H_{e,u}$ που αποτελεί διορθωμένη εκτίμηση για μικρό αριθμό δείγματος (Nei 1978). Οι υπολογισμοί των δεικτών ετεροζυγωτίας έγιναν με το πρόγραμμα GenAlEx v6.3 (Peakall & Smouse 2006). Με το ίδιο πρόγραμμα υπολογίσαμε τέλος τον μέσο αριθμό ιδιωτικών αλληλομόρφων ανά τόπο και ανά πληθυσμό N_{id} . Τα ιδιωτικά αλληλόμορφα (αλληλόμορφα που περιορίζονται σε έναν μόνο από τους εξεταζόμενους πληθυσμούς) έχουν χρησιμοποιηθεί ως ένας επιπλέον δείκτης ποικιλότητας (π.χ. βλ. Hmwe *et al.* 2006).

Ο έλεγχος για στατιστικά σημαντικές διαφορές των εκτιμώμενων δεικτών ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών έγινε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) που ακολουθήθηκε από έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (multiple range tests) στο πρόγραμμα Statgraphics 4.0

Έλεγχος για ισορροπία *Hardy-Weinberg*

Το θεώρημα *Hardy-Weinberg*, ο θεμελιώδης λίθος της γενετικής πληθυσμών, αναπτύχθηκε στην προσπάθεια διερεύνησης του τρόπου με τον οποίο οι αλληλικές συχνότητες αλλάζουν στο χρόνο και τον χώρο. Σύμφωνα με το θεώρημα, σε έναν πληθυσμό ενός διπλοειδούς και φυλετικά αναπαραγόμενου είδους, οι γονοτυπικές και αλληλικές συχνότητες των αυτοσωμικών γονιδίων διατηρούνται σταθερές από γενιά σε γενιά (ισορροπία *Hardy-Weinberg*), στην περίπτωση που πληροῦται μια σειρά προϋποθέσεων (Page & Holmes 1998) : α) ο πληθυσμός έχει άπειρο μέγεθος, β) τα άτομα του πληθυσμού διασταυρώνονται τυχαία (παμμεικτικός πληθυσμός), γ) απουσιάζει η επίδραση μεταλλαγών και επιλογής, δ) απουσιάζει η μετανάστευση ατόμων από και προς τον πληθυσμό (γονιδιακή ροή). Όταν κάποια από αυτές τις προϋποθέσεις πάψει να ισχύει –γεγονός πολύ πιθανό στους φυσικούς πληθυσμούς– οι αλληλικές συχνότητες αλλάζουν. Η αναζήτηση, επομένως, για αποκλίσεις των συχνοτήτων από αυτές που θα αναμένονταν στην περίπτωση που ο πληθυσμός βρισκόταν σε ισορροπία *Hardy-Weinberg*, είναι ένα πρώτο βήμα για την εξέταση της εξέλιξης των γονιδίων εντός του πληθυσμού. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις που παρατηρείται ισορροπία δεν μπορούμε αβίαστα να συμπεράνουμε ότι ισχύουν όλες οι προϋποθέσεις που θέτει το θεώρημα. Οι Lewontin και Cockerham (1959), για παράδειγμα, έδειξαν πως συγκεκριμένα πρότυπα επιλογής μπορούν να οδηγήσουν σε ισορροπημένες γονιδιακές συχνότητες.

Οι εκτιμήσεις της παρατηρούμενης (H_o) και αναμενόμενης ($H_{e,u}$) ετεροζυγωτίας και ο έλεγχος για αποκλίσεις από την ισορροπία πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά για κάθε τόπο και κάθε πληθυσμό, αλλά και στο σύνολο των τόπων και των πληθυσμών με τη χρήση του λογισμικού πακέτου GENEPOP v.4 (Rousset 2007). Το συγκεκριμένο πρόγραμμα χρησιμοποιεί για τον υπολογισμό των τιμών σημαντικότητας (p values) τον αλγόριθμο αλληλουχιών Markov (Markov chain method) των Guo και Thompson (1992) και πραγματοποιεί ακριβείς δοκιμασίες (Fisher exact tests). Επιλέξαμε τον έλεγχο πιθανότητας (probability test) προκειμένου να ελέγξουμε για την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών αποκλίσεων από την ισορροπία HW, εφαρμόζοντας τις προτεινόμενες ρυθμίσεις για τις αλληλουχίες Markov (dememorization:10000, batches: 20, iterations per batch: 10000). Τα επίπεδα σημαντικότητας για την απόρριψη των υποθέσεων απόκλισης ($p=0,05$) σε κάθε τόπο στο σύνολο των πληθυσμών και σε κάθε πληθυσμό στο σύνολο των τόπων (Fisher exact tests) διορθώθηκαν με τη διαδικασία Bonferroni (Rice 1989).

Έλεγχος για γονοτυπική ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium)

Όταν δυο γενετικοί τόποι βρίσκονται πολύ κοντά σε ένα χρωμόσωμα (φυσική σύνδεση) ή συνδέονται λειτουργικά ή υφίστανται τη δράση της φυσικής επιλογής, τότε μπορεί να μεταφέρονται στους απογόνους ως μία μονάδα. Η μη τυχαία συσχέτιση αλληλομόρφων μεταξύ γενετικών τόπων αναφέρεται ως γονοτυπική ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium, Frankham *et al.* 2002). Η ανισορροπία δημιουργεί ψευδείς επαναλήψεις (pseudo-replication) σε αναλύσεις στις οποίες οι γενετικοί τόποι θεωρούνται ανεξάρτητα δείγματα του γονιδιώματος (Selkoe & Toonen 2006). Για να αποφευχθούν μεγάλα σφάλματα τύπου I (type I errors) οι τόποι που εμφανίζουν ανισορροπία σύνδεσης θα πρέπει να εξαιρούνται από τέτοιες αναλύσεις.

Προκειμένου να εξετάσουμε αν οι 14 πολυμορφικοί τόποι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη εμφανίζουν ανά ζεύγη ανισορροπία σύνδεσης, πραγματοποιήσαμε τη διαδικασία ελέγχου που ενσωματώνεται στο πρόγραμμα GENEPOP v.4 (Rousset 2007), η οποία αναζητά συσχετίσεις μεταξύ των αλληλομόρφων σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Ο έλεγχος στηρίζεται σε ακριβείς δοκιμασίες (Fisher exact tests) εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο αλληλουχιών Markov (Markov chain method). Οι συγκεκριμένες ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλληλουχίες Markov ήταν οι προτεινόμενες από τους δημιουργούς του προγράμματος (dememorisation: 10000, batches: 100, iterations per batch: 5000) ενώ τα επίπεδα σημαντικότητας διορθώθηκαν με τη διαδικασία Bonferroni (Rice 1989).

*Γενετική δομή**A. Ανάλυση F-statistics*

Η διερεύνηση της γενετικής δομής του ζαρκαδιού στην Ελλάδα προσεγγίστηκε με τον υπολογισμό των βασικών στατιστικών δεικτών της γενετικής πληθυσμών, που ανήκουν σε μια ομάδα στατιστικών εργαλείων τα οποία αναπτύχθηκαν από τον Wright (1951) και επεκτάθηκαν από τον Cockerham (1969) και τα οποία αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως *F-statistics*. Ο σημαντικότερος δείκτης, που συνήθως χρησιμοποιείται ως μέτρο της γενετικής διαφοροποίησης και υποδιαίρεσης των πληθυσμών, είναι ο συντελεστής «συγκαταγωγής» F_{ST} (fixation index ή coancestry coefficient), ο οποίος περιγράφει τη μείωση της ετεροζυγωτίας εντός των υποπληθυσμών σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό εξαιτίας της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης

(genetic drift). Η ελάχιστη τιμή που μπορεί θεωρητικά να λάβει ο δείκτης είναι μηδέν και συμβαίνει στην περίπτωση ενός παμμεικτικού πληθυσμού, τα άτομα του οποίου διασταυρώνονται τυχαία. Αντίθετα, όταν ο πληθυσμός διαιρείται σε απομονωμένους υποπληθυσμούς με πρακτικά μηδενική γονιδιακή ροή μεταξύ τους, ο F_{ST} λαμβάνει τη θεωρητικά μέγιστη τιμή του που ισούται με τη μονάδα. Ο συντελεστής ενδογαμίας F_{IS} (inbreeding coefficient) περιγράφει την απόκλιση της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας από την αναμενόμενη σε κάθε υποπληθυσμό εξαιτίας μη τυχαίας διασταύρωσης των ατόμων εντός του υποπληθυσμού. Μπορεί να λάβει θεωρητικές τιμές από -1 όταν όλα τα άτομα του υποπληθυσμού είναι ετερόζυγα έως +1 όταν όλα τα άτομα είναι ομόζυγα. Ο συνολικός συντελεστής ενδογαμίας F_{IT} (overall inbreeding coefficient) αποτελεί ουσιαστικά το μέτρο της μείωσης της ετεροζυγωτίας στα άτομα ενός πληθυσμού σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό, που οφείλεται στη μη τυχαία διασταύρωση των ατόμων αφενός εντός των υποπληθυσμών (F_{IS}) και αφετέρου μεταξύ των υποπληθυσμών (F_{ST}).

Στην παρούσα μελέτη θεωρήσαμε εκ των προτέρων ότι άτομα που γονοτυπήθηκαν για κάθε γεωγραφική περιοχή αποτελούσαν ανεξάρτητους υποπληθυσμούς, συνιστώσες του συνολικού πληθυσμού του ζαρκαδιού της Ελλάδας. Για την εκτίμηση των F -statistics χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Weir και Cockerham (1984), που στηρίζεται στην ιεραρχική ανάλυση διακόμανσης των αλληλικών συχνοτήτων θεωρώντας ότι οι υποπληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία μετάλλαξης-γενετικής παρέκκλισης (mutation-drift equilibrium) και μοιράζονται τον ίδιο χρόνο απόκλισης από έναν κοινό προγονικό πληθυσμό. Οι εκτιμήσεις των F_{ST} , F_{IS} , F_{IT} (που αντιστοιχούν στους εκτιμητές θ , f και F των Weir και Cockerham) βασίζονται στη διακόμανση της ποικιλότητας μεταξύ των υποπληθυσμών, μεταξύ των ατόμων εντός των υποπληθυσμών και μεταξύ των αλληλομόρφων εντός των ατόμων αντίστοιχα. Η μέθοδος λαμβάνει υπόψη το μέγεθος των δειγμάτων (αριθμός ατόμων από κάθε υποπληθυσμό) γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη αξιοπιστία των εκτιμήσεων.

Με το πρόγραμμα FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2002), που ενσωματώνει τη μέθοδο των Weir και Cockerham, υπολογίσαμε τους δείκτες F για κάθε γενετικό τόπο στον συνολικό πληθυσμό του ζαρκαδιού στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας στις αναλύσεις μόνο τα δείγματα από τους τέσσερις βασικούς φυσικούς υποπληθυσμούς (Οσσας, Παρνασσίδας, Ζαγορίου και Λαϊλιά). Οι δείκτες για το σύνολο των γενετικών τόπων και τα επίπεδα σημαντικότητάς τους εκτιμήθηκαν με τις διαδικασίες jackknifing και bootstrap αντίστοιχα, (για λεπτομέρειες βλ. Weir 1996), οπότε προέκυψαν οι μέσες τιμές, τα τυπικά σφάλματα και τα όρια εμπιστοσύνης για επίπεδο σημαντικότητας 95%.

Με το ίδιο πρόγραμμα υπολογίσαμε σε κάθε σημαντικό υποπληθυσμό (>5 δείγματα) τις τιμές των συντελεστών ενδογαμίας (F_{IS}) για κάθε γενετικό τόπο ξεχωριστά και για το σύνολο των

τόπων, με σκοπό να εξετάσουμε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική απόκλιση από την ετεροζυγωτία λόγω μη τυχαίας διασταύρωσης των ατόμων μέσα σε κάθε υποπληθυσμό. Ο έλεγχος σημαντικότητας έγινε με 3000 αντιμεταθέσεις (permutations) των αλληλομόρφων μεταξύ των ατόμων κάθε υποπληθυσμού και τα επίπεδα σημαντικότητας διορθώθηκαν με τη διαδικασία Bonferroni (Rice 1989).

Οι τιμές του δείκτη F_{ST} ανά ζεύγος πληθυσμών (pairwise F_{ST}) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέτρο της γενετικής διαφοροποίησης και της γονιδιακής ροής μεταξύ δύο πληθυσμών (Frankham *et al.* 2002) και παρέχουν αξιόπιστες μετρήσεις της γενετικής απόστασης όταν η πραγματική απόκλιση μεταξύ των πληθυσμών οφείλεται στη γενετική παρέκκλιση (Reynolds *et al.* 1983) υπό τη συνθήκη του μοντέλου εξέλιξης IAM (Infinite Alleles Model, Kimura & Crow 1964) των μικροδορυφορικών τόπων. Με τη βοήθεια του προγράμματος GENETIX v. 4.03 (Belkhir *et al.* 1999) και με τη μέθοδο των Weir και Cockerham (1984), υπολογίσαμε τις μεταξύ των κυριότερων πληθυσμών (>5 δείγματα) τιμές του δείκτη F_{ST} και ελέγξαμε τη στατιστική τους ισχύ εφαρμόζοντας 3000 αντιμεταθέσεις (permutations).

B. Έλεγχος για την ύπαρξη ευρύτερων γεωγραφικών προτύπων γενετικής δομής

Προκειμένου να διερευνήσουμε την ύπαρξη ευρύτερων γεωγραφικών ομάδων με σημαντική γενετική διαφοροποίηση, σε σχέση με τους κύριους, φυσικούς πληθυσμούς που αναλύθηκαν στη μελέτη μας, ελέγξαμε διάφορα επίπεδα ομαδοποίησης χρησιμοποιώντας την ανάλυση AMOVA και το πρόγραμμα ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Οι πίνακες μοριακών αποστάσεων μεταξύ των γονοτύπων υπολογίστηκαν με βάση τον αριθμό των διαφορετικών αλληλομόρφων ενώ τα επίπεδα σημαντικότητας των συντελεστών Φ εκτιμήθηκαν με 30000 τυχαίες αντιμεταθέσεις.

Γ. Αναλύσεις ομαδοποιήσεων (clustering)

Στο σύνολο των αναλύσεων που προηγήθηκαν υιοθετήθηκε η παραδοσιακή προσέγγιση ορισμού των πληθυσμιακών ομάδων, δηλαδή άτομα που συλλέχθηκαν σε διακριτές περιοχές αποτέλεσαν ξεχωριστούς πληθυσμούς. Είναι σαφές, ότι η *a priori* ομαδοποίηση των δειγμάτων σε πληθυσμούς, στηριζόμενη αποκλειστικά και μόνο στο υποκειμενικό κριτήριο της γεωγραφικής θέσης, είναι δυνατόν να περιορίσει σημαντικά τη δυνατότητα αποκάλυψης της πραγματικής γενετικής δομής ή ακόμα και να οδηγήσει σε παραπλανητικά αποτελέσματα (Balloux & Lugon-

Moulin 2002). Η ύπαρξη, για παράδειγμα, άγνωστων ή απροσδιόριστων φραγμάτων στη γονιδιακή ροή, στα πλαίσια μιας κατά τα άλλα ενιαίας γεωγραφικά περιοχής μπορεί να δημιουργεί μικρότερες πληθυσμιακές υπομονάδες, τις οποίες αποτυγχάνουμε να εντοπίσουμε θεωρώντας εκ των προτέρων ότι το σύνολο των δειγμάτων από την περιοχή αυτή συνιστούν έναν και μόνο πληθυσμό. Από την άλλη, το γεγονός της διακριτής γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων δεν εξασφαλίζει κατ' ανάγκη και τη γενετική διαφοροποίησή τους, αφού συνεχής και σημαντική γονιδιακή ροή μεταξύ απομακρυσμένων περιοχών μπορεί να συντηρεί στην ουσία έναν ενιαίο παμμικτικό πληθυσμό.

Σε μια προσπάθεια να ελέγξουμε την ορθότητα της υπόθεσής μας περί διακριτών πληθυσμών στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές, εφαρμόσαμε δύο μεθόδους ομαδοποίησης (clustering) των ατόμων που γονοτυπήθηκαν στην παρούσα μελέτη, οι οποίες δεν προϋποθέτουν τον προκαθορισμό πληθυσμιακής «ταυτότητας» στα δείγματα.

1. Παραγοντική Ανάλυση αντιστοιχιών (Factorial Correspondence Analysis, FCA)

Η φύση των δεδομένων μιας ανάλυσης μικροδορυφορικών δεικτών επιτρέπει τη χρήση της μεθόδου FCA (Benzécri 1973) για τη γραφική απεικόνιση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων. Η πολυπαραγοντική στατιστική αυτή μέθοδος συνοψίζει μεγάλες ομάδες δεδομένων σε μικρότερες πληροφοριακές ομάδες που αντιπροσωπεύουν τις τάσεις των πρωταρχικών δεδομένων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ενός πίνακα αριθμητικών δεδομένων (ενός πίνακα συνάφειας) σε μια γραφική απεικόνιση, στην οποία κάθε γραμμή και κάθε στήλη απεικονίζονται με ένα σημείο. Στην περίπτωση γονοτυπικών δεδομένων, οι γονότυποι των ατόμων μετατρέπονται σε ένα σύνθετο πίνακα συνάφειας (multiple contingency table) αφού για κάθε άτομο προκύπτει ένα αριθμητικό προφίλ ανάλογα με τις τιμές που παίρνει για κάθε αλληλόμορφο σε κάθε γενετικό τόπο (π.χ. 0 όταν δεν φέρει το συγκεκριμένο αλληλόμορφο, 1 όταν το φέρει σε ετερόζυγη κατάσταση, 2 όταν το φέρει σε ομόζυγη κατάσταση). Στη συνέχεια, το σύνολο των ατόμων απεικονίζονται ως ένα νέφος σημείων σε έναν πολυδιάστατο χώρο (hyperspace), που έχει τόσες διαστάσεις όσα τα αλληλόμορφα σε όλους τους διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Το κάθε σημείο απέχει από το κέντρο του χώρου (δηλ. το μέσο αριθμητικό προφίλ) κατά μια απόσταση (X^2 απόσταση). Το τετράγωνο της απόστασης αυτής πολλαπλασιασμένο με τον αριθμό των ατόμων που υπάρχουν στο συγκεκριμένο σημείο διαμορφώνει ένα μέγεθος που, κατ' αναλογία με τη φυσική, ονομάζεται αδράνεια (inertia). Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται εντοπίζει τις διαστάσεις του πολυδιάστατου χώρου στις οποίες είναι μέγιστη η συνολική αδράνεια του νέφους και επομένως παρατηρείται η μεγαλύτερη διασπορά των ατόμων. Οι διαστάσεις αυτές, που ορίζονται από τα ιδιοδιανύσματα του πίνακα,

συνιστούν ένα σύνολο παραγοντικών αξόνων (factor axes) και κατά συνθήκη ο πρώτος άξονας είναι αυτός που συνεισφέρει περισσότερο στη συνολική αδράνεια. Με βάση τη συνεισφορά του κάθε ατόμου σε κάθε άξονα ορίζεται και η θέση του σε αυτόν.

Η Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (FCA) των δεδομένων μας έγινε με το πρόγραμμα GENETIX v. 4.03 (Belkhir *et al.* 1999) με σκοπό να αποτυπώσουμε γραφικά σε τρισδιάστατα και δυσδιάστατα γραφήματα (plots) τη θέση των γονοτύπων στον χώρο (με βάση τις μεταξύ τους αποστάσεις) και να διερευνήσουμε εάν τα άτομα ακολουθούν κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο ομαδοποίησης συμβατό με τη γεωγραφική τους προέλευση.

2. Ανάλυση Μπεϋζιανής ομαδοποίησης (Structure)

Μια εναλλακτική μέθοδος μοντέλων (model based) για να οριοθετηθούν ομάδες ατόμων με βάση τους γονότυπούς τους, προτάθηκε από τους Pritchard *et al.* (2000) και ενσωματώνεται στο πρόγραμμα STRUCTURE. Πρόκειται στην ουσία για μια μπεϋζιανή (Bayesian) στατιστική προσέγγιση που επιχειρεί να ομαδοποιήσει τα άτομα που μοιάζουν γενετικά αντιστοιχώντας τα σε ένα προκαθορισμένο αριθμό γενετικών ομάδων K (clusters), κάθε μία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες αλληλικές συχνότητες για κάθε τόπο. Η αντιστοίχιση πραγματοποιείται με τη χρήση ενός αλγόριθμου Markov chain Monte Carlo (MCMC) και υπό τη συνδυαστική συνθήκη μοντέλων γενεαλογίας (ancestry models) και αλληλικής συχνότητας (allele frequency models), ώστε να επιτευχθεί ισορροπία Hardy-Weinberg και ισορροπία σύνδεσης μέσα σε κάθε ομάδα (Pritchard *et al.* 2000). Για κάθε αριθμό ομάδων K και για το συγκεκριμένο δείγμα ατόμων (X) υπολογίζεται μια τιμή πιθανοφάνειας (posterior probability) $Pr(X/K)$. Ο αριθμός με τη μέγιστη πιθανοφάνεια θεωρείται ότι περιγράφει καλύτερα την υπάρχουσα, πραγματική, γενετική δομή. Βασική προϋπόθεση για την ορθή εφαρμογή της μεθόδου είναι να μην παρατηρείται ανισορροπία σύνδεσης και Hardy-Weinberg στους γενετικούς τόπους που χρησιμοποιούνται.

Χρησιμοποιήσαμε λοιπόν το πρόγραμμα STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2007) προκειμένου να εξετάσουμε την ύπαρξη ή μη σαφούς γενετικής δομής στα δείγματά μας αγνοώντας την περιοχή προέλευσής τους. Η ανάλυση έγινε με τη συνδυασμένη χρήση του μοντέλου ανάμειξης (admixture model) και του μοντέλου εξαρτημένων αλληλικών συχνοτήτων (correlated allele frequencies model). Η χρήση του μοντέλου ανάμειξης επιτρέπει την υπόθεση κάθε άτομο να έχει μεικτή καταγωγή, δηλ. να μην ανήκει αποκλειστικά σε μια ομάδα. Το συγκεκριμένο μοντέλο προτείνεται ως μοντέλο γενεαλογίας για τη μελέτη των σύνθετων φυσικών πληθυσμών ζώων που δεν συνιστούν διακριτές και απομονωμένες γενετικές μονάδες (Pritchard *et al.* 2000). Η ικανότητα διασποράς και γονιδιακής ροής ή η κοινή καταγωγή έχει ως αποτέλεσμα

τα άτομα να έχουν συνήθως ένα σύνθετο γονιδίωμα που μπορεί να προέρχεται από διαφορετικές γενετικές δεξαμενές. Με αυτό το μοντέλο, αφού προσδιοριστούν τα όρια κάθε ομάδας και αντιστοιχηθούν τα άτομα σε κάθε μια από αυτές, εκτιμάται πιθανολογικά (probabilistically) και για κάθε άτομο η παράμετρος q (membership coefficient, συντελεστής συμμετοχής). Η q εκφράζει ουσιαστικά το ποσοστό με το οποίο κάθε μία από τις ομάδες (clusters) συμμετέχει στον γονότυπο του ατόμου. Με βάση το μοντέλο εξαρτημένων αλληλικών συχνοτήτων (Falush *et al.* 2003) θεωρείται ότι οι συχνότητες στις διαφορετικές ομάδες δεν είναι ανεξάρτητες αλλά είναι πιθανόν να μοιάζουν, κυρίως εξαιτίας της μετανάστευσης και της κοινής καταγωγής. Ο βαθμός εξάρτησης περιγράφεται από την παράμετρο λ (παράμετρος κατανομής Dirichlet), την οποία υπολογίσαμε για $K=1$ χρησιμοποιώντας το μοντέλο ανεξάρτητων αλληλικών συχνοτήτων σύμφωνα με τις οδηγίες των Falush *et al.* (2003). Την τιμή αυτή της παραμέτρου λ χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια για τις υπόλοιπες αναλύσεις.

Πρακτικά, για το σύνολο των ατόμων ζαρκαδιού (άτομα από όλες τις περιοχές) και με τις επιλογές μοντέλων που προαναφέρθηκαν, πραγματοποιήσαμε μια σειρά αναλύσεων με το πρόγραμμα STRUCTURE για να υπολογίσουμε την πιθανοφάνεια για κάθε έναν από τους αριθμούς ομάδων ($K=1$ έως $K=9$). Για κάθε K η ανάλυση περιελάμβανε 750000 επαναλήψεις (MCMC iterations) εκ των οποίων οι πρώτες 250000 αγνοήθηκαν ως περίοδος αστάθειας των τιμών πιθανοφάνειας (burn-in) και η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε πέντε φορές με στόχο να ελεγχθεί η συνέπεια των αποτελεσμάτων. Η επιλογή του πιο πιθανού αριθμού ομάδων (K) έγινε με τη βοήθεια της στατιστικής διαδικασίας υπολογισμού του δείκτη ΔK (*ad-hoc statistic*), που προτάθηκε από τους Evanno *et al.* (2005) ως ένας αξιόπιστος και αμερόληπτος τρόπος ο οποίος λαμβάνει υπόψη όχι μόνο την τιμή της πιθανοφάνειας αλλά και τη διακύμανσή της μεταξύ διαδοχικών τιμών του K . Για τον υπολογισμό του ΔK χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό πρόγραμμα Structure Harvester v.0.56.4 (Earl 2010). Για κάθε άτομο υπολογίστηκε η τιμή του συντελεστή συμμετοχής (q) και αντιστοιχίστηκε σε μία από τις προτεινόμενες ομάδες στην περίπτωση που το ποσοστό του γονότυπού του που αντιστοιχούσε στη συγκεκριμένη ομάδα ήταν μεγαλύτερο από το υποκειμενικό όριο του 75% (Lorenzini & Lovari 2006).

Για να ελέγξουμε την υπόθεση ότι τουλάχιστον οι τέσσερις μεγάλοι πληθυσμοί που *a priori* είχαμε ορίσει (Λαϊλιάς, Παρνασσίδα, Ζαγόρι, Όσσα) αποτελούν διακριτές γενετικές ομάδες, εκτιμήσαμε έναν συντελεστή Q που είναι ανάλογος της q για το επίπεδο του πληθυσμού. Η παράμετρος Q εκφράζει το ποσοστό συμμετοχής κάθε ομάδας στη γενετική δεξαμενή του πληθυσμού και ισούται με τη μέση τιμή των συντελεστών συμμετοχής (q) των ατόμων που απαρτίζουν τον συγκεκριμένο πληθυσμό.

Γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών

Εκτός από τη χρήση των ανά ζεύγος τιμών F_{ST} ως «αποστάσεων», αρκετές άλλες προσεγγίσεις έχουν προταθεί για την εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ πληθυσμών με βάση δεδομένα από την ανάλυση μικροδορυφορικών τόπων και υπό τη συνθήκη συγκεκριμένων υποθέσεων και μοντέλων εξέλιξης (π.χ. για ανασκόπηση βλ. Goldstein *et al.* 1995, Takezaki & Nei 1996, Paetkau *et al.* 1997, Balloux & Lugon-Moulin 2002). Επιλέξαμε τη χρησιμοποίηση δύο - επιπλέον του F_{ST} - προσεγγίσεων για να υπολογίσουμε τη μεταξύ των πληθυσμών της μελέτης μας γενετική απόσταση, με σκοπό να ελέγξουμε αν παρατηρείται ένα κοινό πρότυπο διαφοροποίησης ανεξάρτητο από τη μέθοδο εκτίμησής της:

1. Η πρότυπη γενετική απόσταση D του Nei (1972)

Ο υπολογισμός της πρότυπης γενετικής απόστασης του Nei στηρίζεται στην ύπαρξη ενός συγκεκριμένου μοντέλου εξέλιξης των μικροδορυφορικών τόπων (Infinite Alleles Model) και ουσιαστικά με την συγκεκριμένη απόσταση εκτιμάται η ομοιότητα μεταξύ ζευγών πληθυσμών με βάση τις αλληλικές συχνότητες. Έστω δύο πληθυσμοί X και Y και έστω ότι για ένα δεδομένο γενετικό τόπο υπάρχουν m αλληλόμορφα με συχνότητα p_i το καθένα. Η πιθανότητα δύο αλληλόμορφα, τυχαία επιλεγμένα μέσα από έναν πληθυσμό, να είναι ίδια δίνεται από τις σχέσεις:

$$j_x = \sum_{i=1}^m p_{ix}^2 \text{ για τον πληθυσμό } X \quad \text{και} \quad j_y = \sum_{i=1}^m p_{iy}^2 \text{ για τον πληθυσμό } Y.$$

Η πιθανότητα δύο αλληλόμορφα να είναι όμοια αν επιλεγούν τυχαία μέσα από τους δύο πληθυσμούς δίνεται από τη σχέση:

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^m p_{ix} p_{iy}$$

Η απόσταση D δίνεται από τη σχέση: $D = -\ln(I_N) = -\ln \left[J_{xy} / (J_x J_y)^{\frac{1}{2}} \right]$

όπου I_N ο δείκτης γενετικής ομοιότητας του Nei και J_{xy} , J_x , J_y οι αριθμητικοί μέσοι των j_{xy} , j_x και j_y αντίστοιχα, για το σύνολο των γενετικών τόπων στην περίπτωση που υπάρχουν περισσότεροι του ενός. Όταν οι συχνότητες των αλληλομόρφων στους δύο πληθυσμούς είναι παρόμοιες ($p_{ix} \approx p_{iy}$) ο δείκτης ομοιότητας προσεγγίζει τη μονάδα και η γενετική απόσταση το μηδέν. Αντίθετα, όταν οι πληθυσμοί δεν μοιράζονται κοινά αλληλόμορφα ο δείκτης ομοιότητας προσεγγίζει το μηδέν και η γενετική απόσταση μεγιστοποιείται (θεωρητικά τείνει στο άπειρο).

2. Η απόσταση «χορδής» D_c των Cavalli-Sforza και Edwards (1967)

Ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων με τη μέθοδο αυτή δεν προϋποθέτει την ύπαρξη κάποιου μοντέλου εξέλιξης ή άλλων βιολογικών υποθέσεων. Τέτοιες μέθοδοι συνήθως περιγράφονται με τον όρο «γεωμετρικές αποστάσεις» και αντιμετωπίζουν τα γενετικά δεδομένα (π.χ. τις αλληλικές συχνότητες) ως απλούς αριθμούς. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η απόσταση «χορδής», μετρά την απόσταση μεταξύ των πληθυσμών σε σχέση με τη θεωρητική τους θέση στην επιφάνεια μιας «υπερ-σφαίρας» (σφαίρα με περισσότερες από τρεις διαστάσεις) με μοναδιαία ακτίνα. Η θέση των πληθυσμών καθορίζεται από τη συχνότητα των αλληλομόρφων (οι τετραγωνικές ρίζες των συχνοτήτων χρησιμοποιούνται ως συντεταγμένες). Αν λοιπόν έχουμε δύο πληθυσμούς P και Q και θ είναι η γωνία που σχηματίζουν οι γραμμές που ενώνουν τις θέσεις των δύο πληθυσμών στην επιφάνεια με το κέντρο της σφαίρας τότε μπορούμε να υπολογίσουμε:

$$\cos(\theta) = \sum_{i=1}^k \sqrt{p_i q_i}$$

όπου p_i και q_i οι συχνότητες του i αλληλομόρφου στους πληθυσμούς P και Q αντίστοιχα. Η απόσταση των Cavalli-Sforza και Edwards (1967) είναι η απόσταση της χορδής του τόξου που συνδέει τους πληθυσμούς και δίνεται από τη σχέση:

$$D_c = \sqrt{[2 - 2 \cos(\theta)]}$$

Προφανώς όταν οι δύο πληθυσμοί μοιράζονται κοινά αλληλόμορφα με ίδιες συχνότητες η $\cos(\theta)$ προσεγγίζει τη μονάδα (η γωνία θ προσεγγίζει το μηδέν) και η απόσταση D_c τείνει στο μηδέν.

Με τη χρήση του προγράμματος GENETIX v. 4.03 (Belkhir *et al.* 1999) υπολογίστηκαν οι ανά ζεύγος γενετικές αποστάσεις (D και D_c) μεταξύ των κυριότερων πληθυσμών της μελέτης μας, οπότε προέκυψαν δύο τριγωνικοί πίνακες αποστάσεων.

Διερεύνηση στενωπών (bottlenecks)

Οι στενωποί, όταν δεν επιβεβαιώνονται από ιστορικά δεδομένα μετρήσεων του πληθυσμιακού μεγέθους, είναι δύσκολο να εντοπιστούν. Οι Cornuet & Luikart (1996) πρότειναν μια μέθοδο για τον εντοπισμό πρόσφατων στενωπών, που στηρίζεται στην ανάλυση των αλληλικών συχνοτήτων πολυμορφικών μικροδορυφορικών τόπων. Σε έναν φυσικό πληθυσμό, ο

οποίος βρίσκεται σε ισορροπία *Hardy-Weinberg*, ο αριθμός των αλληλομόρφων και η ετεροζυγωτία σε ουδέτερους τόπους είναι αποτέλεσμα μιας ισορροπίας ανάμεσα στη δράση των μεταλλάξεων και της γενετικής παρέκκλισης. Οι παράμετροι αυτής της ισορροπίας είναι ο μεταλλακτικός ρυθμός (m) και το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού (N_e). Η ετεροζυγωτία που αναμένεται για έναν τόπο σε έναν πληθυσμό που βρίσκεται σε ισορροπία (H_{eq}) μπορεί να υπολογιστεί από τον αριθμό των αλληλομόρφων που παρατηρούνται και από το δειγματοληπτικό μέγεθος, δηλ. τον αριθμό των ατόμων του πληθυσμού που συλλέχθηκαν. Σε πληθυσμούς που δεν έχουν διέλθει στενωπό και οι οποίοι προσεγγίζουν την ισορροπία μετάλλαξης-γενετικής παρέκκλισης η H_{eq} θα ισούται με την αναμενόμενη ετεροζυγωτία υπό τη συνθήκη της ισορροπίας *Hardy-Weinberg* (H_e). Αν ωστόσο - στα πλαίσια μιας στενωπού - το δραστικό μέγεθος ενός πληθυσμού έχει υποστεί σημαντική μείωση, τότε η ισορροπία μετάλλαξης-γενετικής παρέκκλισης έχει προσωρινά διαταραχθεί και η H_e , που υπολογίζεται από τις συχνότητες των αλληλομόρφων θα είναι μεγαλύτερη από την H_{eq} , που υπολογίζεται από τον αριθμό των αλληλομόρφων (Watterson 1984, Maruyama & Fuerst 1985, Cornuet & Luikart 1996). Αυτό συμβαίνει γιατί η ταχύτητα με την οποία χάνονται τα αλληλόμορφα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ταχύτητα με την οποία μειώνεται η ετεροζυγωτία κατά τη διάρκεια μιας στενωπού. Στην ουσία τα σπάνια αλληλόμορφα (αυτά με μικρή συχνότητα) εξαφανίζονται άμεσα από τον πληθυσμό αλλά η απώλειά τους δεν επηρεάζει σημαντικά τη συχνότητα των υπόλοιπων αλληλομόρφων και επομένως την ετεροζυγωτία (Hedrick *et al.* 1986).

Η μέθοδος που περιγράφηκε ενσωματώνεται στο πρόγραμμα BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999), το οποίο υπολογίζει για έναν πληθυσμό με διάφορα μοντέλα εξέλιξης των μικροδορυφορικών τόπων (Infinite allele model, Stepwise mutation model, Two phase model), την παράμετρο H_{eq} για κάθε τόπο ξεχωριστά. Στη συνέχεια με διάφορα τεστ (βλ. Piry *et al.* 1999) ελέγχεται αν ο υπό εξέταση πληθυσμός παρουσιάζει στατιστικά σημαντικό πλεόνασμα της H_e έναντι της H_{eq} και επομένως έχει πρόσφατα διέλθει από στενωπό. Οι βασικές προϋποθέσεις για την ισχύ της μεθόδου είναι (Cornuet & Luikart 1996): α) ο υπό εξέταση πληθυσμός πρέπει να μην παρουσιάζει εσωτερική δομή και μεταναστεύσεις, β) οι γενετικοί τόποι να είναι επιλεκτικά ουδέτεροι (selectively neutral) και πρακτικά ασύνδετοι (linkage equilibrium) γ) να μην υπάρχουν αλληλόμορφα που δεν εντοπίζονται (null alleles).

Στην παρούσα μελέτη ελέγξαμε με τη βοήθεια του προγράμματος BOTTLENECK αν οι τέσσερις σημαντικοί φυσικοί πληθυσμοί (Λαϊλιάς, Όσσα, Παρνασίδα, Ζαγόρι) έχουν διέλθει από στενωπό κατά το πρόσφατο παρελθόν. Ακολουθώντας τις οδηγίες των συγγραφέων (Piry *et al.* 1999) για αξιόπιστα αποτελέσματα, επιλέξαμε ως μοντέλο εξέλιξης το μοντέλο δύο φάσεων (Two phase model με ρυθμίσεις: 95% SMM, 5% multistep changes, 10000 επαναλήψεις) και το τεστ Wilcoxon, που προτείνεται όταν ο αριθμός των τόπων είναι μικρότερος από 20. Επιπρόσθετα

εφαρμόσαμε το τεστ ποιοτικού ελέγχου «παραμόρφωσης» των αλληλικών συχνοτήτων (βλ. Luikart *et al.* 1998) σύμφωνα με το οποίο αν αποτυπωθεί γραφικά η κατανομή των αλληλικών συχνοτήτων στο σύνολο των τόπων σε κλάσεις (0-10% /10-20% /.../90-100%) τότε σε ένα πληθυσμό που διήλθε από στενωπό θα προκύψει μια διαφοροποιημένη εικόνα του ιστογράμματος σε σχέση με την αναμενόμενη φυσιολογική (σχήματος L).

7. Αναλύσεις συσχέτισης

Συσχέτιση μεταξύ μιτοχονδριακών και μικροδορυφορικών γενετικών αποστάσεων

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ τεσσάρων φυσικών πληθυσμών του ζαρκαδιού στην Ελλάδα (Λαϊλιά, Όσσας, Παρνασσίδας και Ζαγορίου) ποσοτικοποιήθηκε με διάφορες εκτιμήσεις των μεταξύ τους γενετικών αποστάσεων που στηρίχθηκαν στη χρήση τόσο μιτοχονδριακών (περιοχή ελέγχου) όσο και πυρηνικών (μικροδορυφορικών) δεικτών (βλ. Κεφάλαια 2.3.4 και 2.3.6 αντίστοιχα). Προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα αν οι εκτιμήσεις αυτές συνηγορούν σε ένα κοινό πρότυπο διαφοροποίησης, ανεξάρτητο της μεθοδολογικής προσέγγισης, πραγματοποιήσαμε μια σειρά ελέγχων συσχέτισης (correlation tests). Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόσαμε ελέγχους Mantel (Mantel tests), για να υπολογίσουμε αν υπάρχει και σε ποιο βαθμό στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ γενετικών αποστάσεων που προέκυψαν με τις διαφορετικές αναλύσεις.

Οι έλεγχοι Mantel (Mantel 1967, Sokal & Rohlf 1995) αποτελούν μια στατιστική προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τη συσχέτιση (correlation) δύο πινάκων αποστάσεων οι οποίοι συνοψίζουν τις ανά ζεύγος διαφορές μεταξύ κάποιων οντοτήτων (π.χ. μεταξύ ατόμων, μεταξύ πληθυσμών ή μεταξύ περιοχών). Με τους ελέγχους αυτούς μπορεί, για παράδειγμα, να ελεγχθεί ο βαθμός συσχέτισης που παρουσιάζουν οι ανά ζεύγος γενετικές αποστάσεις μεταξύ πληθυσμών με τις ανά ζεύγος γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των ίδιων πληθυσμών. Κάθε πίνακας θα πρέπει να είναι συμμετρικός (π.χ. η απόσταση μεταξύ των πληθυσμών α και β να είναι ίση με την απόσταση μεταξύ β και α). Οι αποστάσεις σε κάθε έναν από τους πίνακες δεν είναι ανεξάρτητες η μία από την άλλη αφού η αλλαγή της «θέσης» ενός πληθυσμού αλλάζει τις αποστάσεις του με όλους τους υπόλοιπους. Επομένως δεν μπορούμε να προσδιορίζουμε τη σχέση μεταξύ των δύο πινάκων και κυρίως να εκτιμήσουμε τη στατιστική της ισχύ με μία από τις

κλασικές μεθόδους συσχέτισης (linear regression ή Spearman rank correlation) αφού αυτές υποθέτουν την ανεξαρτησία μεταξύ των τιμών μέσα σε κάθε σύνολο (Sokal & Rohlf 1995). Με τον έλεγχο Mantel αντίθετα υπολογίζεται η συσχέτιση των πινάκων (συνήθως εκτιμώντας το συντελεστή r -Pearson product-moment correlation coefficient) και ελέγχεται η στατιστική της ισχύ, με τη βοήθεια μιας σειράς τυχαίων αντιμεταθέσεων (random permutations) στις γραμμές και τις στήλες του ενός πίνακα (για αναλυτική περιγραφή των ελέγχων στατιστικής σημαντικότητας βλ. Sokal & Rohlf 1995).

Οι έλεγχοι Mantel εφαρμόστηκαν ανά ζεύγος σε όλους τους πίνακες γενετικών αποστάσεων (Φ_{ST} , p , d TrN93, F_{ST} , D , D_c) μεταξύ των τεσσάρων βασικών πληθυσμών με τη χρήση του προγράμματος MANTEL v.2 (Liedloff 1999) και πραγματοποιώντας 1000 αντιμεταθέσεις (permutations). Για κάθε ζεύγος πινάκων υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης r , ενώ το επίπεδο σημαντικότητας για την απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης (καμία συσχέτιση) καθορίστηκε στο $p=0,05$.

Συσχέτιση γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων

Ένα από τα βασικά μοντέλα που προτάθηκε από τον Wright (1943) για να ερμηνεύσει τη χωρική κατανομή της γενετικής ποικιλότητας στους φυσικούς πληθυσμούς, είναι γνωστό με τον όρο «απομόνωση λόγω απόστασης» (isolation by distance-IBD). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό και υπό τη συνθήκη μιας σειράς βασικών υποθέσεων, δύο πληθυσμοί με μεγάλη γεωγραφική απόσταση μεταξύ τους χαρακτηρίζονται από αυξημένη γενετική διαφοροποίηση σε σχέση με δύο γειτονικούς πληθυσμούς, δηλαδή αναμένουμε μια θετική συσχέτιση των γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων.

Ελέγξαμε αν οι τέσσερις φυσικοί πληθυσμοί του ζαρκαδιού που ερευνήθηκαν στη μελέτη μας ακολουθούν το πρότυπο της απομόνωσης λόγω απόστασης πραγματοποιώντας ελέγχους Mantel μεταξύ των πινάκων των γενετικών αποστάσεων και του πίνακα των μεταξύ τους γεωγραφικών αποστάσεων (βλ. Πίνακα 2.2.1) με το πρόγραμμα MANTEL v.2 (Liedloff 1999).

Αποτελέσματα

1. Απομόνωση DNA

Από τα 96 συνολικά συλλεχθέντα δείγματα, τα 88 έδωσαν ολικό DNA ικανοποιητικής ποσότητας και ποιότητας που μπόρεσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για γενετικές αναλύσεις (βλ. Πίνακα 3 Παραρτήματος). Το ποσοστό επιτυχούς εξαγωγής ήταν συνολικά 92%, παρόλο που διαφοροποιείται ελαφρώς μεταξύ παρεμβατικής και μη παρεμβατικής δειγματοληψίας. Πιο συγκεκριμένα, επιτυχή απομόνωση είχαμε στο 94% (61/65) των δειγμάτων μαλακών ιστών που συγκεντρώθηκαν από ζαρκάδια που είχαν θηρευθεί και στο 84% (26/31) των δειγμάτων από νεκρό οργανικό υλικό.

2. Μιτοχονδριακό DNA

Απλότυποι

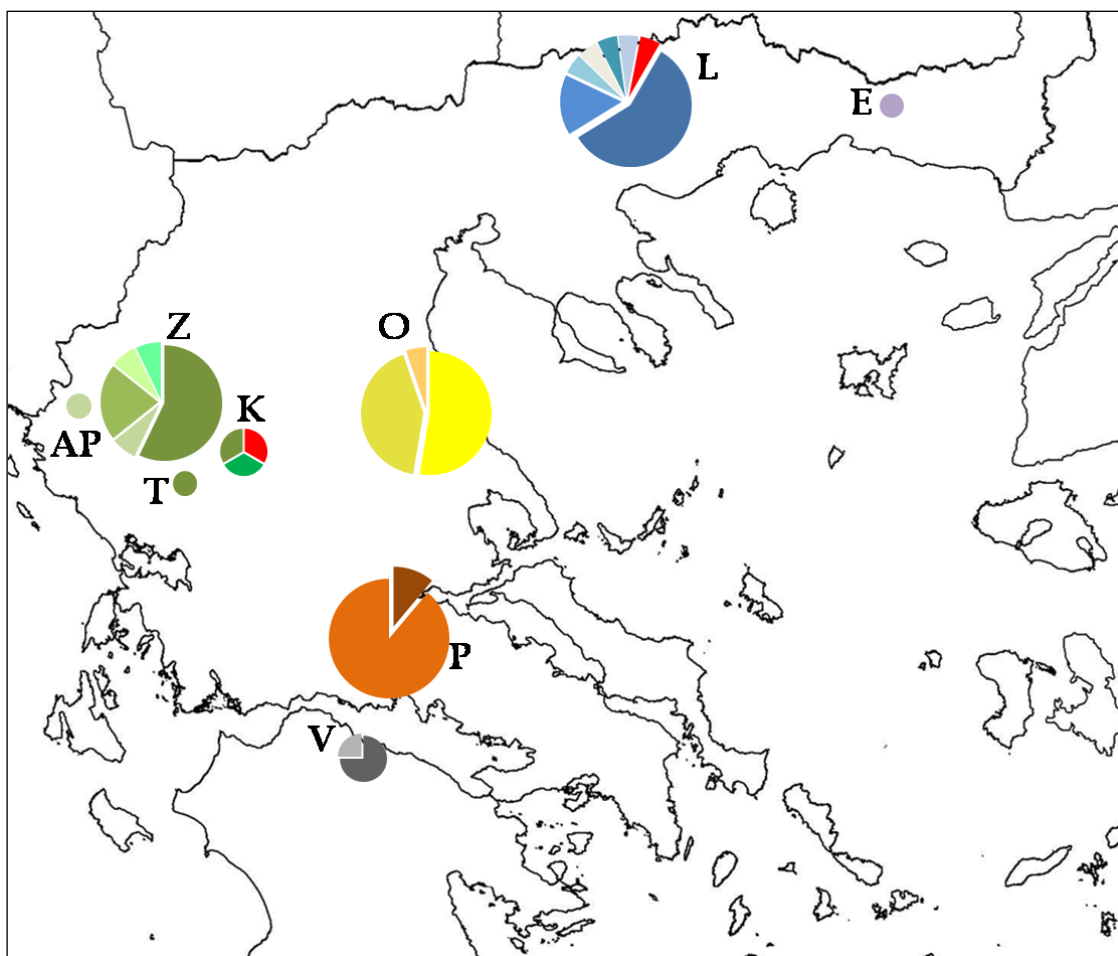
Συνολικά, καταφέραμε να προσδιορίσουμε την αλληλουχία ενός τμήματος μήκους 838 βάσεων της περιοχής ελέγχου (control region) του μιτοχονδριακού DNA σε 80 δείγματα (βλ Πίνακα 3 Παραρτήματος). Η μέση νουκλεοτιδική σύσταση στο σύνολο των αλληλουχιών ήταν: Θυμίνη (T) 32,22%, Αδενίνη (A) 29,47%, Κυτοσίνη (C) 22,99% και Γουανίνη (G) 15,33%. Στο τμήμα 838 βάσεων εντοπίστηκαν 37 πολυμορφικές θέσεις (4,4%) ενώ οι υπόλοιπες 801 (95,6%) ήταν συντηρημένες. Από τις πολυμορφικές θέσεις οι 30 ήταν μεταπτώσεις (transitions), μία μεταστροφή (transversion) και έξι ενθέσεις/ελλείψεις (insertions/deletions = indels). Οι 80 αλληλουχίες αντιπροσώπευαν 21 διαφορετικούς απλότυπους (GR1-GR21), όπως προέκυψε από το πρόγραμμα *DAMBE* (Xia & Xie 2001). Τα πρωτογενή αποτελέσματα της στοίχισης (alignment) των αλληλουχιών της περιοχής ελέγχου παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 2.3.1 και 2.3.2.

Πίνακας 2.3.1 : Οι απλότυποι του μιτοχονδριακού DNA (control region) που αναγνωρίστηκαν στην παρούσα μελέτη στην Ελλάδα. Η κάθετη αρίθμηση αναφέρεται στις στοιχιωμένες θέσεις των τμημάτων μήκους 838bp (παρουσιάζονται μόνο οι 37 πολυμορφικές θέσεις). Οι τελείες υποδεικνύουν ομοιότητα με τον απλότυπο GR1, ενώ οι παύλες την ύπαρξη ενθέσεων/ελλείψεων (indels). Με γκρι χρώμα τονίζονται οι θέσεις ύπαρξης indels και με κόκκινο χρώμα οι θέσεις μεταστροφών(A↔C, A↔T, C↔G και T↔G). Χωρίς χρώμα οι θέσεις μεταπτώσεων (A↔G και T↔C).

[V: Καλάβρυτα, P: Παρνασσίδα, O: Όσσα, K: Κόζιακας, T: Τζουμέρκα, Z: Ζαγόρι, AP: Άνω Πωγώνι, L: Λαϊλιάς, E: Ανατολική Ροδόπη]

Περσική	Απλότυπος	Θέσεις ποικιλομορφίας																																								
		5	6	2	9	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	6	7	7	7	7	7	7	7	8	0			
L	GR1	G	T	-	T	A	A	T	G	C	C	A	A	A	C	G	A	A	A	T	T	C	T	A	T	C	T	A	T	T	A	G	T	-	C	-	T	T				
L	GR2	.	.	-	T	G	G		
L	GR3	.	.	-		
L	GR4	.	C	A	.	.	G	.	.	.	T	G	C	T	.	G	C		
L	GR5	.	.	-	.	.	G	.	.	.	T	G	C	G	.	.	C	T	.	.	.		
L	GR6	.	.	-	T	G	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	G		
L,K	GR7	.	.	-	.	.	G	.	A	.	T	G	G	.	.	.	G	.	.	G		
E	GR8	.	.	-	T	G	G	G	.	T	-	T	.	.		
O	GR9	A	.	-	T	G	G	G	T		
O	GR10	.	.	A	A	.	T	G	.	.	T	.	.	.	G	C	.	.	.	G	G	A		
O	GR11	A	.	-	T	G	G	G	T	-	.	.	.		
P	GR12	.	.	-	C	T	G	C	.	.	G	C		
P	GR13	.	.	-	T	T	G	T	G	A	
K	GR14	.	.	-	.	.	G	.	A	.	T	G	G	G	.	.	G	.	G	
K,T,Z	GR15	.	.	-	.	.	G	.	A	.	T	G	.	.	.	G	G	.	.	G	.	G	
AP,Z	GR16	A	.	-	T	G	.	C	
Z	GR17	A	.	-	.	G	T	G	G	.	C	.	.	C	
Z	GR18	.	.	-	C	T	G	G	C	.	.	.	G	
Z	GR19	A	.	-	.	G	T	G	G	C
V	GR20	.	.	A	.	.	.	C	.	.	T	G	.	G	C	.	.	.	G	
V	GR21	.	.	-	.	.	G	.	.	.	T	G	G	C	G	T

Οι απλότυποι δεν εμφανίζουν ομοιόμορφη γεωγραφική κατανομή (βλ. Πίνακα 2.3.2 και Εικόνα 2.3.1). Μάλιστα οι 18 από τους 21 (85,7% των ατόμων του δείγματος) θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν «ιδιωτικοί», αφού περιορίζονται μόνο σε μία από τις περιοχές δειγματοληψίας. Στην περιοχή Λαϊλιά (L) κυρίαρχος είναι ο απλότυπος GR1 (57,9%), στην περιοχή Παρνασσίδας (P) ο GR13 (88,9%) και στην περιοχή Ζαγορίου (Z) ο απλότυπος GR15 (57,1%). Τέλος, οι δύο από τους τρεις απλότυπους της Όσσας (O) εμφανίζουν σχεδόν ισόποση εκπροσώπηση: ο GR9 με 52,6% και ο GR10 με 42,1%



Εικόνα 2.3.1 : Απεικόνιση της γεωγραφικής κατανομής των απλότυπων. Το μέγεθος των κυκλικών δίσκων είναι ανάλογο του αριθμού των ατόμων που αλληλουχήθηκαν και κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό απλότυπο.

[V: Καλάβρυτα, P: Παρνασσίδα, O: Όσσα, K: Κόζιακας, T: Τζουμέρκα, Z: Ζαγόρι, AP: Άνω Πωγώνι, L: Λαϊλιάς, E: Ανατολική Ροδόπη]

Με απλή παρατήρηση γίνεται σαφές ότι μεταξύ των περιοχών Λαϊλιά, Όσσα, Παρνασσίδας και Ζαγορίου δεν απαντώνται κοινοί απλότυποι. Αντίθετα, στην περιοχή Ζαγορίου βρέθηκαν κοινοί απλότυποι με την περιοχή Άνω Πωγωνίου (GR16), την περιοχή Τζουμέρκων (GR15) και την περιοχή Κόζιακα (GR15). Η γεωγραφική συνάφεια και η ύπαρξη

συνεχών αδιατάρακτων ορεινών οικοσυστημάτων μεταξύ των περιοχών αυτών σε συνδυασμό με την εύρεση κοινών απλότυπων θα μπορούσε να οδηγήσει στην ενοποίησή τους (Ζαγόρι, Τζουμέρκα, Άνω Πωγώνι και Κόζιακας) σε μία δειγματοληπτική ενότητα υπό τον τίτλο Βόρεια Πίνδος. Ο πληθυσμός του εκτροφείου Καλαβρύτων δεν παρουσιάζει κοινούς απλότυπους με κανέναν από τους ελεύθερους πληθυσμούς που μελετήθηκαν.

Πίνακας 2.3.2 : Κατανομή των 21 απλότυπων στις περιοχές δειγματοληψίας. Στη σκιασμένη περιοχή παρουσιάζεται η γεωγραφική ενότητα Βόρεια Πίνδος

	L	O	P	Z	K	AP	T	V	E	Σ	% συχνότητα εμφάνισης
GR1	11									11	13,75
GR2	3									3	3,75
GR3	1									1	1,25
GR4	1									1	1,25
GR5	1									1	1,25
GR6	1									1	1,25
GR7	1				1					2	2,50
GR8								1		1	1,25
GR9		10								10	12,50
GR10		8								8	10,00
GR11		1								1	1,25
GR12			2							2	2,50
GR13			16							16	20,00
GR14					1					1	1,25
GR15				8	1		1			10	12,50
GR16				1		1				2	2,50
GR17				3						3	3,75
GR18				1						1	1,25
GR19				1						1	1,25
GR20								3		3	3,75
GR21								1		1	1,25
Σ	19	19	18	14	3	1	1	4	1	80	

[V: Καλάβρυτα, P: Παρνασσίδα, O: Όσσα, K: Κόζιακας, T: Τζουμέρκα, Z: Ζαγόρι, AP: Άνω Πωγώνι, L: Λαϊλιάς, E: Ανατολική Ροδόπη]

Γενετική ποικιλότητα

Η ποικιλότητα του μιτοχονδριακού DNA εκφρασμένη με τον εντελώς περιγραφικό δείκτη «αριθμός απλότυπων ανά αριθμό ατόμων που αλληλουχήθηκαν» ήταν γενικά υψηλή για το ζαρκάδι σε ολόκληρη την Ελλάδα, αφού παρατηρήθηκε ένας απλότυπος ανά 3,8 άτομα. ($80/21 = 3,8$). Αν ωστόσο εξετάσουμε τη συγκεκριμένη παράμετρο στους επιμέρους πληθυσμούς τότε παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα οι πληθυσμοί του Λαϊλιά και του Ζαγορίου εμφανίζουν υψηλότερη ποικιλότητα σε σχέση με τη συνολική με έναν απλότυπο ανά 2,7 (19/7) και 2,8 (14/5) άτομα αντίστοιχα. Αντίθετα, οι πληθυσμοί της Όσσας και της Παρνασσίδας έχουν σαφώς υποπολλαπλάσια ποικιλότητα με έναν απλότυπο ανά 6,3 (19/3) και 9 (18/2) άτομα αντίστοιχα.

Αναλυτικά τα αποτελέσματα όλων των δεικτών ποικιλότητας που υπολογίστηκαν τόσο για κάθε περιοχή ξεχωριστά όσο και συνολικά για την Ελλάδα δίνονται στον Πίνακα 2.3.3. Οι τιμές για πληθυσμούς με λιγότερα από πέντε δείγματα δεν μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικές και γι' αυτό δεν αξιολογούνται περαιτέρω. Στο σύνολο της χώρας η απλοτυπική ποικιλότητα εμφανίζεται υψηλή $Hd=0,904$ ($SD \pm 0,015$) ενώ αντίθετα η νουκλεοτιδική ποικιλότητα είναι πολύ χαμηλή $\pi=0,0075$ ($SD \pm 0,0040$). Αν εξετάσουμε τους δείκτες για κάθε έναν από τους κύριους πληθυσμούς που μελετήσαμε (L, O, Z, P), παρατηρούμε γενικά μέτρια απλοτυπική και χαμηλή νουκλεοτιδική ποικιλότητας, με αξιοσημείωτη εξαίρεση την περίπτωση του πληθυσμού της Παρνασσίδας, ο οποίος εμφανίζει σημαντικά μικρότερες τιμές (τις χαμηλότερες στην Ελλάδα) και στους δύο δείκτες ποικιλότητας. Οι διαφορές των τιμών ποικιλότητας (Hd , π) μεταξύ της Παρνασσίδας και των υπόλοιπων πληθυσμών ήταν στατιστικά σημαντικές όπως έδειξαν η ανάλυση διακύμανσης ($p < 0,001$) και οι έλεγχοι πολλαπλών συγκρίσεων. Ως προς τον πληθυσμό της Όσσας η απλοτυπική ποικιλότητα αν και σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με της Παρνασσίδας ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των πληθυσμών του Λαϊλιά και του Ζαγορίου, οι οποίοι δεν διαφέρουν σημαντικά ούτε ως προς την απλοτυπική ούτε ως προς τη νουκλεοτιδική ποικιλότητα.

Πίνακας 2.3.3: Δείκτες ποικιλότητας και οι τοπικές τους αποκλίσεις SD (σε παρένθεση)

Περιοχή/Πληθυσμός	n_i/n_h	Hd (SD)	k (SD)	% π (SD)	$\theta_{(s)}$ (SD)
Λαϊλιάς (L)	19/7	0,661 (0,114)	3,32 (1,78)	0,397 (0,238)	4,29 (1,79)
Όσσα (O)	19/3	0,573 (0,061)	4,22 (2,19)	0,504 (0,293)	1,72 (0,88)
Παρνασσίδα (P)	18/2	0,209 (0,116)	1,88 (1,13)	0,225 (0,151)	2,33 (1,11)
Ζαγόρι (Z)	14/5	0,659 (0,123)	4,73 (2,46)	0,565 (0,330)	3,77 (1,72)
Κόζιακας (K)	3/3	1,000 (0,272)	1,33 (1,10)	0,160 (0,160)	0,67 (0,67)
Καλάβρυτα (V)	4/2	0,500 (0,265)	4,00 (2,52)	0,478 (0,359)	3,27 (2,09)
Τζουμέρκα (T)	1/1	-	-	-	-
Άνω Πωγώνι (AP)	1/1	-	-	-	-
Ανατολική Ροδόπη (E)	1/1	-	-	-	-
Β. Πίνδος* (NP)	19/7	0,714 (0,103)	4,36 (2,26)	0,522 (0,302)	3,43 (1,49)
Ελλάδα (GR)	80/21	0,904 (0,015)	6,28 (3,01)	0,750 (0,398)	6,26 (1,90)

[n_i : αριθμός ατόμων που αλληλουχήθηκαν, n_h : αριθμός απλότυπων, Hd: απλοτυπική ποικιλότητα, k: μέση τιμή των διαφορών των ζευγών απλότυπων, π: νουκλεοτιδική ποικιλότητα, $\theta_{(s)}$: η τιμή θ με βάση τον αριθμό των διακριτικών θέσεων S (segregating sites)],

* : προέκυψε από την ενοποίηση Z, T, AP και K

Γενετικές αποστάσεις

Στους Πίνακες 5 και 6 του Παραρτήματος παρατίθενται οι ανά ζεύγος γενετικές αποστάσεις (pairwise distances) μεταξύ των απλότυπων, υπολογισμένες με δύο διαφορετικούς τρόπους (p distance και TrN93 distance). Οι αποστάσεις κυμαίνονται από 0,12% η ελάχιστη έως 1,4% η μέγιστη, ενώ η συνολική μέση απόσταση (overall mean) ανέρχεται σε 0,82% (p distance) ή 0,85% (TrN93 distance).

Οι ανά ζεύγος μέσες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των τεσσάρων βασικών πληθυσμών της έρευνας (L, O, P, Z), διορθωμένες σε σχέση με την ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα παρατίθενται στους Πίνακες 2.3.4 και 2.3.5. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό οι γενετικές αποστάσεις είναι πολύ μικρές και κυμαίνονται από 0,28% (υπό το μοντέλο TrN93 $d_{min}=0,29\%$) μεταξύ των πληθυσμού Ζαγορίου και Όσσας έως 0,56% (υπό το μοντέλο TrN93 $d_{max}=0,59\%$) μεταξύ των πληθυσμού Ζαγορίου και Παρνασσίδας. Ο πληθυσμός της Παρνασσίδας παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόκλιση από όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς και τις

μικρότερες ενδοπληθυσμιακές αποστάσεις (βλ. μέση τιμή και διαγώνιο στους Πίνακες 2.3.4 και 2.3.5).

Πίνακας 2.3.4 : Ανά ζεύγος γενετικές αποστάσεις (*p* distances) μεταξύ των κύριων πληθυσμών, διορθωμένες για την ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα (net average nucleotide divergence). Στην τελευταία γραμμή οι μέσες αποστάσεις κάθε πληθυσμού από όλους τους υπόλοιπους. Στη διαγώνιο (μέσα σε παρένθεση) η ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση (μέσες αποστάσεις μεταξύ των ατόμων) για κάθε πληθυσμό.

[L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι]

<i>p</i> distance(%)	L	O	P	Z
L	(0,40)			
O	0,42	(0,50)		
P	0,45	0,47	(0,22)	
Z	0,30	0,28	0,56	(0,56)
Μέση τιμή	0,39	0,39	0,49	0,38

Πίνακας 2.3.5 : Ανά ζεύγος γενετικές αποστάσεις (TrN93 distances) μεταξύ των κύριων πληθυσμών, διορθωμένες για την ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα (net average nucleotide divergence). Στην τελευταία γραμμή οι μέσες αποστάσεις κάθε πληθυσμού από όλους τους υπόλοιπους. Στη διαγώνιο (μέσα σε παρένθεση) η ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση (μέσες αποστάσεις μεταξύ των ατόμων) για κάθε πληθυσμό.

[L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι]

TrN distance(%)	L	O	P	Z
L	(0,41)			
O	0,45	(0,53)		
P	0,47	0,49	(0,24)	
Z	0,32	0,29	0,59	(0,61)
Μέση τιμή	0,41	0,41	0,52	0,40

Διαφοροποίηση μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών

Η ανάλυση AMOVA έδειξε την ύπαρξη αξιοσημείωτης γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών που εξετάστηκαν. Η συνολική τιμή του δείκτη F_{st} (fixation index) ήταν υψηλή (>0,50) και στατιστικά σημαντική ($p < 0,000$), υποδεικνύοντας ότι πάνω από

το 50% της γενετικής ποικιλότητας που παρατηρήθηκε οφείλεται στη διαπληθυσμιακή ποικιλότητα (Πίνακας 2.3.6).

Πίνακας 2.3.6 : Συνοπτικά αποτελέσματα ανάλυσης AMOVA.

Οι τιμές Φ_{st} ήταν στατιστικά σημαντικές ($P < 0,000$)

Μέθοδος υπολογισμού του πίνακα γενετικών αποστάσεων	Πηγή της διακόμανσης της ποικιλότητας (%)		Φ_{st}
	Μεταξύ των πληθυσμών	Εντός των πληθυσμών	
Αριθμός συσσωρευμένων μεταλλαγών (pairwise differences)	50,11	49,89	0,5011
Απόσταση υπό το μοντέλο TrN93	52,11	47,89	0,5211

Οι τιμές των Φ_{st} ανά ζεύγος πληθυσμών (pairwise Φ_{st}) που προέκυψαν με τις δύο διαφορετικές μεθόδους αποστάσεων ήταν παρόμοιες (Πίνακας 2.3.7). Η χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών Όσσας και Ζαγορίου (0,34-0,33) ενώ αξιοσημείωτες είναι οι υψηλές τιμές των ζευγών που περιλαμβάνουν την Παρνασσίδα.

Πίνακας 2.3.7 : Τιμές Φ_{st} μεταξύ ζευγών πληθυσμών (pairwise). Στον άνω τριγωνικό πίνακα οι τιμές είναι υπολογισμένες με βάση τις γενετικές αποστάσεις TrN93 και στον κάτω τριγωνικό με βάση τον αριθμό των συσσωρευμένων μεταλλαγών. Όλες οι τιμές ήταν στατιστικά σημαντικές ($P < 0,000$).

Φ_{st}	Λαϊλιάς (L)	Όσσα (O)	Παρνασσίδα (P)	Ζαγόρι (Z)
Λαϊλιάς (L)		0,51583	0,62009	0,41160
Όσσα (O)	0,48186		0,58693	0,32641
Παρνασσίδα (P)	0,59050	0,56142		0,61156
Ζαγόρι (Z)	0,39156	0,34287	0,60165	

Οι αναλύσεις που προϋπέθεταν κάποια μορφή ομαδοποίησης των τεσσάρων πληθυσμών δεν οδήγησαν στην εξαγωγή αξιοποιήσιμων αποτελεσμάτων, αφού η στατιστική ισχύς των δεικτών Φ_{CT} ήταν πολύ χαμηλή ($P > 0,1$). Στον Πίνακα 2.3.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των σημαντικότερων από τις ομαδοποιήσεις που ελέγχθηκαν.

Πίνακας 2.3.8 : Αποτελέσματα AMOVA για διάφορες ομαδοποιήσεις (με έντονο χρώμα οι στατιστικά σημαντικές τιμές των δεικτών Φ). Οι υπολογισμοί έχουν γίνει με βάση τον αριθμό των συσσωρευμένων μεταλλαγών.

Τύπος ομαδοποίησης	Πηγή της διακόμανσης της ποικιλότητας (%)			Φ statistics		
	Μεταξύ των πληθυσμών εντός των ομάδων	Εντός των πληθυσμών	Μεταξύ των ομάδων	Φ _{ST}	Φ _{SC}	Φ _{CT}
2 ομάδες						
[L,O,Z]/[P]	38,34	46,10	15,56	0,54 (P<0,00)	0,45 (P<0,00)	0,16 (P=0,25)
[L,P]/[O,Z]	43,34	48,54	8,12	0,51 (P<0,00)	0,47 (P<0,00)	0,08 (P=0,33)
[L,Z]/[O,P]	46,49	49,17	4,35	0,51 (P<0,00)	0,49 (P<0,00)	0,04 (P=0,67)
3 ομάδες						
[Z,O]/[P]/[L]	33,18	48,56	18,26	0,51 (P<0,00)	0,41 (P<0,00)	0,18 (P=0,16)

Φυλογεωγραφία

Η στοιχίση (alignment) των 21 απλότυπων της έρευνάς μας μήκους 838 νουκλεοτιδίων με τους 81 απλότυπους των Randi *et al.* (2004) μήκους 704 νουκλεοτιδίων είχε σαν αποτέλεσμα την «απώλεια» γενετικής πληροφορία κατά ένα τμήμα μήκους 134 νουκλεοτιδίων. Ο περιορισμός αυτός οδήγησε στη μείωση του αριθμού των απλότυπων (βλ. Πίνακα 2.3.9). Συνολικά από τους 102 αρχικούς (81+21) και με βάση τη νέα στοιχίση καταλήξαμε σε 94 νέους «συναινετικούς» (consensus) απλότυπους. Οι ελληνικοί απλότυποι περιορίστηκαν σε 18. Οι πολυμορφικές θέσεις που τους διακρίνουν παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 του Παραρτήματος.

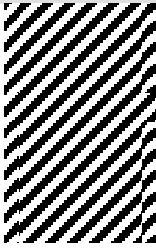
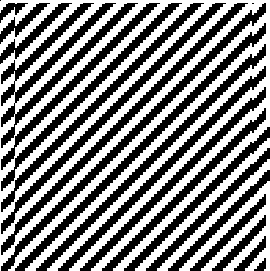

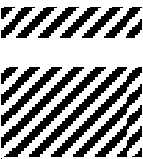
Η ανάλυση με δίκτυα διαχώρισε τους απλότυπους σε τρεις βασικές ομάδες, που αναφέρονται ως Ανατολικός, Κεντρικός και Δυτικός κλάδος, και μια πιθανή μικρότερη ομάδα (Ιβηρικός κλάδος). Το παραγόμενο από το πρόγραμμα NETWORK δίκτυο απλότυπων παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.3.2, όπου γίνεται αμέσως εμφανής η υπαγωγή όλων των ελληνικών απλότυπων στον Ανατολικό κλάδο. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του δικτύου είναι επίσης η ύπαρξη πολύπλοκων συνδέσεων μεταξύ των απλότυπων που δημιουργούν κυκλικές απεικονίσεις (loops) ή ακόμη πιο πολύπλοκες μορφές κυβικών πολυδιάστατων σχέσεων (hypercubes). Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει σαφώς την ύπαρξη παράλληλων μεταλλάξεων (ομοπλασιών).

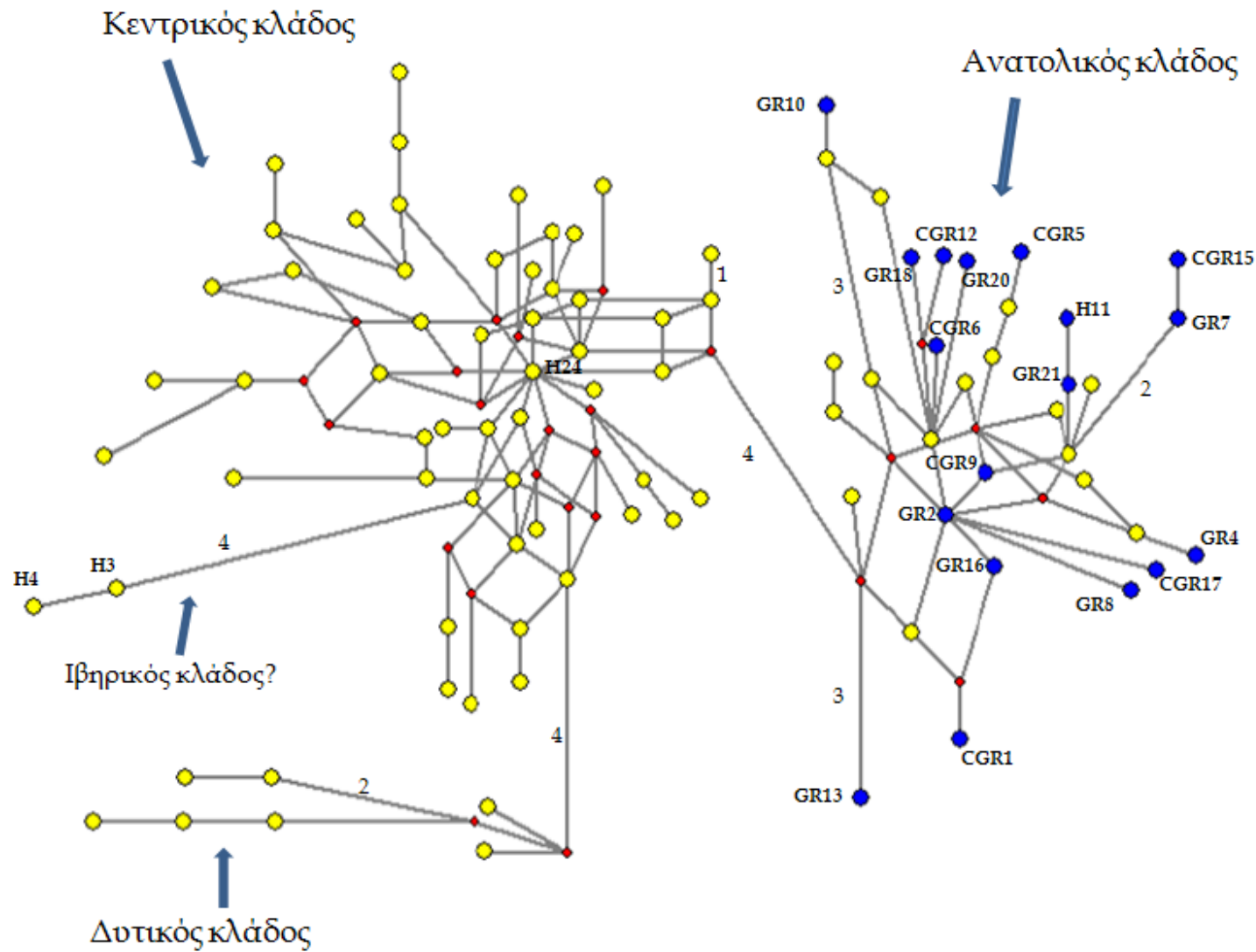
Αν εστιάσουμε στον Ανατολικό κλάδο, που παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 2.3.3, παρατηρούμε την ανουπαρξία κάποιου ιδιαίτερου προτύπου ομαδοποίησης. Οι απλότυποι που βρέθηκαν στην Ελλάδα φαίνεται να είναι έντονα περιορισμένοι γεωγραφικά αφού πολύ λίγοι από αυτούς (CGR5, CGR6, CGR9 - ποσοστό 16,6%) εμφανίζονται και σε περιοχές εκτός Ελλάδας (βλ. Πίνακα 2.3.9 και 2.3.10).

Πίνακας 2.3.9: Οι συναινετικοί απλότυποι που προέκυψαν μετά από στοιχίση των 21 ελληνικών με τους 81 απλότυπους των Randi *et al.* (2004).

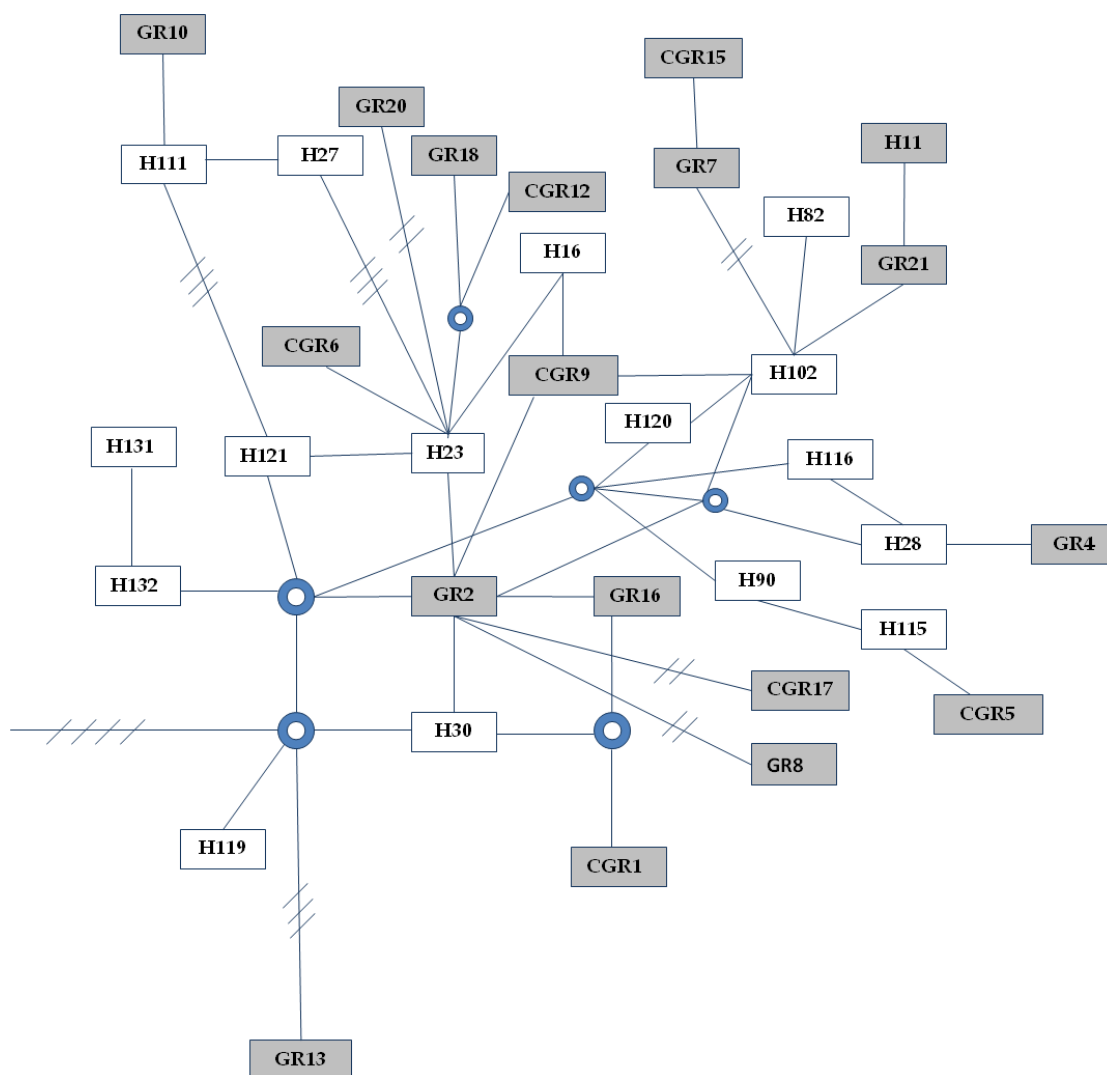
Αρχικοί απλότυποι	Περιοχές εμφάνισης και (αριθμός δειγμάτων)	Συναινετικοί απλότυποι
GR1 GR3	Λαϊλιάς (11) Λαϊλιάς (1)	CGR1
GR5 H109	Λαϊλιάς (1) Σερβία (2)	CGR5
GR6 H29	Λαϊλιάς (1) Σερβία (1) + Ιταλία-Απέννινα όρη (5)	CGR6
GR9 GR11 H17	Όσσα (10) Όσσα (1) Ιταλία-Απέννινα όρη (10)	CGR9
GR12 H10	Παρνασσίδα (2) Ζαγόρι (2)	CGR12
GR14 GR15	Κόζιακας (1) Κόζιακας (1) + Ζαγόρι (8) + Τζουμέρκα (1)	CGR15
GR17 GR19	Ζαγόρι (3) Ζαγόρι (1)	CGR17

Πίνακας 2.3.10: Οι απλότυποι του Ανατολικού κλάδου και οι περιοχές στις οποίες βρέθηκαν.

Απλότυπος	Ελλάδα	Σερβία Μαυροβούνιο Κόσοβο	Ιταλία		Γερμανία
			Άλπεις	Απέννινα	
CGR1, GR2, GR4, GR8, GR10, CGR12 GR13, CGR15, GR16, CGR17, GR18, GR20 GR21, H11 CGR9 CGR5 CGR6 H27 H28 H23 H30 H82, H90, H102, H111 H115, H116, H119, H120 H121, H131, H132 H16					



Εικόνα 2.3.2 : Δίκτυο απλότυπων (NETWORK) του ζαρκαδιού στην Ευρώπη. Με μπλε χρώμα οι απλότυποι που βρέθηκαν στην Ελλάδα (σε αντιδιαστολή όσων βρέθηκαν εκτός Ελλάδας με κίτρινο χρώμα) και με κόκκινο ενδιάμεσοι απλότυποι (δεν εντοπίστηκαν κατά τη δειγματοληψία ή προγονικοί που εξαφανίστηκαν). Το μήκος των γραμμών είναι ανάλογο του αριθμού των μεταλλαγών που συνέβησαν μεταξύ των απλότυπων (ενδεικτικά δίνονται κάποιοι αριθμοί).



Εικόνα 2.3.3 : Δίκτυο απλότυπων στον ανατολικό κλάδο. Με γκρι χρώμα οι απλότυποι που εντοπίστηκαν στην Ελλάδα. Κάθε απλή γραμμή αντιπροσωπεύει μια μεταλλαγή ενώ στην περίπτωση περισσότερων μεταλλαγών η γραμμή είναι σημασμένη αναλόγως (πλάγιες διαγραμμίσεις). Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσους απλότυπους.

3. Μικροδορυφορικό DNA

Γενετική ποικιλότητα

Η ανάλυση των δειγμάτων (88 δείγματα) για τους 14 γενετικούς μικροδορυφορικούς τόπους που βρέθηκαν πολυμορφικοί στις προκαταρκτικές αναλύσεις, αποκάλυψε την ύπαρξη υψηλών επιπέδων πολυμορφισμού. Ο αριθμός αλληλόμορφων κυμάνθηκε από δύο (στους τόπους Roe9 και OMHC1) έως 10 (στους τόπους SR-CRSP1, NVHRT21, RT1, RT7, Roe8). Συνολικά, εντοπίστηκαν 95 αλληλόμορφα, από τα οποία τα 23 (24,2%) χαρακτηρίζονται ως ιδιωτικά, δηλαδή βρέθηκαν μόνο σε μία περιοχή. Η αλληλική ποικιλότητα για την Ελλάδα είναι $A=6,8$ αλληλόμορφα ανά γενετικό τόπο ($\pm SE=0,9$). Αναλυτική παρουσίαση του αριθμού και του εύρους των αλληλόμορφων σε κάθε γενετικό τόπο και σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας δίνεται στον Πίνακα 2.3.11.

Στις Εικόνες 2.3.4-2.3.17 δίνονται σχηματικά οι συχνότητες των αλληλόμορφων ανά γενετικό τόπο και πληθυσμό. Η θέση των κυκλικών δίσκων αντιστοιχεί στις περιοχές δειγματοληψίας (για αντιπαραβολή βλ. Εικόνα 2.2.1) και το μέγεθός τους είναι ανάλογο του αριθμού των ατόμων που γονοτυπήθηκαν. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό αλληλόμορφο και επομένως το ποσοστό που δίνεται σε κάθε χρώμα αποδίδει τη συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου αλληλόμορφου στον κάθε πληθυσμό. Παραλείπονται οι συχνότητες στους πληθυσμούς με ένα έως τρία άτομα, ως μη έχουσες στατιστική σημασία εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων.

Οι δείκτες ποικιλότητας για τους σημαντικότερους πληθυσμούς (>5 δείγματα ανά πληθυσμό) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.12 και εποπτικά αποδίδονται στα Γραφήματα 2.3.1 και 2.3.2. Η ποικιλότητα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών σε όλους τους δείκτες, όπως έδειξαν οι αναλύσεις διακύμανσης ($p<0,001$). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πολλαπλών ελέγχων ο πληθυσμός της Όσσας εμφανίζει για την πλειονότητα των δεικτών σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ποικιλότητας σε σχέση με τους πληθυσμούς της Παρνασσίδας, του Λαϊλιά και του Ζαγορίου.

Πίνακας 2.3.11 : Αριθμός και εύρος αλληλομόρων σε κάθε περιοχή και στην Ελλάδα (GR) συνολικά.

Τα ιδιωτικά αλληλόμορφα απεικονίζονται σημασμένα με γκρι χρώμα.

[L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι, V:Καλάβρυτα, Κ: Κόζιακας, T: Τζουμέρκα, AP: Άνω Πωγώνι, E: Ανατολική Ροδόπη, n: αριθμός ατόμων που γονοτυπήθηκαν]

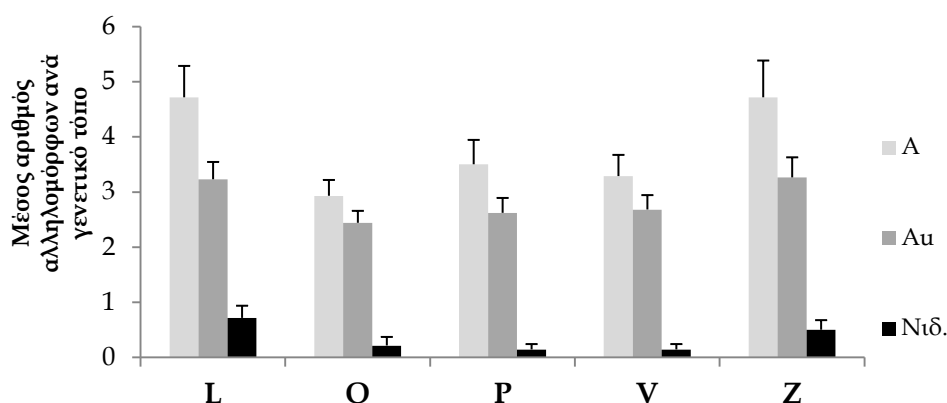
	τύπος	L (n=21)	O (n=20)	P (n=18)	Z (n=14)	V (n=9)	K (n=3)	T (n=1)	AP (n=1)	E (n=1)	GR	Εύρος
1	SR-CRSP1	125,135,137,139, 141,143, 145	135,139,141	137,139,141,143, 147	125,127,137,139, 141,143,147, 149	125,127,135,139, 141,143	125,127,139,141	125,139	127,137	125,141	10 (n=88)	125-149
		7	3	5	8	6	4	2	2	2		
2	NVHRT21	159,161,163,165, 167,169, 181	161,165, 177	161, 163,165,167	161, 163,165,167	161,165,169	159,161,165, 171	161,163	165	165, 179	10 (n=86)	159-181
		7/n=20	3	4	4	3/n=8	4	2	1	2		
3	RT1	216 ,232,236,238, 240,242	234,238,240	232,238,240,242	226,230,232,234, 236,238,240,242	226,234,236,238, 240	232,236,240,242, 244	226,240	232	230	10 (n=86)	216-244
		6/n=20	3	4	8	5/n=8	5	2	1	1		
4	RT7	212 ,214,216,220, 222,224, 236	214,222,224	214,220,222	214,216, 218 ,220, 222,224, 234	214,222	214,216,220,222, 224	214,224	220,224	222, 230	10 (n=84)	212-236
		7/n=20	3	3	7	2/n=6	5	2	2	2		
5	Roe8	74,76,78,80, 84, 98	74,80,86,88	74,76,78,80, 82,86,88	74,76,78,80, 84,86,90	74,76,78,80, 86	76,78,88	74,82	74,78	90	10 (n=88)	74-98
		6	4	7	7	5	3	2	2	1		
6	NVHRT24	127,131, 135 ,139 141, 145 ,147	139,141,143,147	127,141,143,147	127,131,139,141, 143,147	127,139,141,147	127,141	127,139	127, 149	141	9 (n=88)	127-149
		7	4	4	6	4	2	2	2	1		
7	NVHRT16	159,161,169,171	159,161,171,177	159,161, 163 ,171 177	159,161,165,171, 177	159,161,169,171, 175	159,165,171	161	161	159,161	8 (n=88)	159-177
		4	4	5	5	5	3	1	1	2		
8	Roe6	99,101,103,105, 107,111	101,103,109	101,103,105,109, 111	93,99,101,103, 105,107	101,103,105,107	99,103,105,107, 109	99,109	93,99	105	8 (n=83)	93-111
		6	3	5	6	4/n=4	5	2	2	1		
9	ILST011	267,269,273,275, 277	267,269,275,277	269,271,277	267,269,271,273, 275,277	269,275	269,271,275	269	269	271,273	6 (n=85)	267-277
		5	4	3	6/n=13	2/n=7	3	1	1	2		
10	NVHRT71	103,117	103, 105 , 115 ,117	103,117	103,117	103,117	103,117	103	103	103,117	4 (n=86)	103-117
		2	4	2	2	2/n=7	2	1	1	2		
11	NVHRT30	153,157,165	153,157	153,157	153,157	153,157,165	157	153	157	157	3 (n=78)	153-165
		3/n=16	2	2/n=16	2	3/n=6	1	1	1	1		
12	Roe1	133,135	133,135	133,135	133,135	131 ,133,135	133,135	135	133,135	135	3 (n=88)	131-135
		2/n=20	2	2	2	3	2	1	1	1		
13	oMHC1	181, 183	181	181	181	181	181	181	181	181	2 (n=86)	181-183
		2/n=20	1	1	1/n=13	1	1	1	1	1		
14	Roe9	175,177	175	175,177	175,177	175,177	175	175	175,177	177	2 (n=88)	175-177
		2	1	2	2	2	1	1	2	1		

Πίνακας 2.3.12: Δείκτες ποικιλότητας και τυπικά σφάλματα (σε παρένθεση)

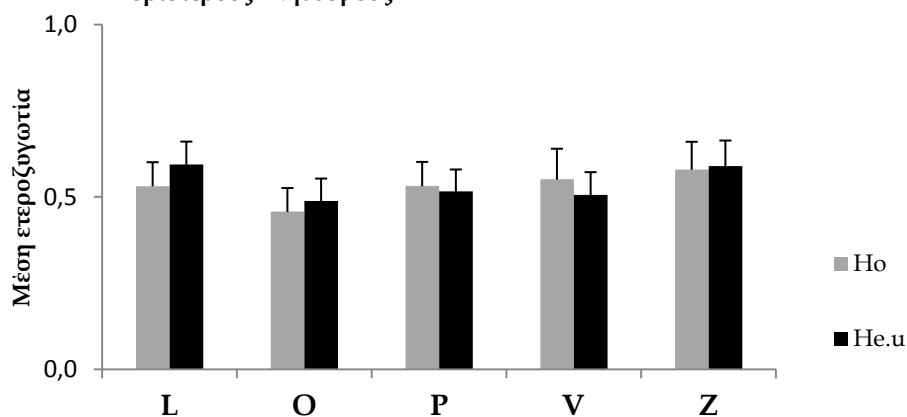
Πληθυσμός	n	A	A_u	H_o	$H_{e.u}$	N_{id}^*
L Λαϊλιάς	21	4,714 (0,569)	3,228 (0,314)	0,531 (0,070)	0,594 (0,067)	0,714 (0,221)
O Όσσα	20	2,929 (0,286)	2,439 (0,216)	0,457 (0,069)	0,488 (0,066)	0,214 (0,155)
P Παρνασσίδα	18	3,500 (0,442)	2,619 (0,270)	0,532 (0,071)	0,516 (0,065)	0,143 (0,097)
Z Ζαγόρι	14	4,714 (0,667)	3,262 (0,364)	0,579 (0,081)	0,589 (0,075)	0,500 (0,174)
V Καλάβρυτα	9	3,286 (0,384)	2,680 (0,261)	0,551 (0,090)	0,506 (0,067)	0,143 (0,097)

[A : αλληλική ποικιλότητα, A_u : διορθωμένη αλληλική ποικιλότητα, H_o : μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, $H_{e.u}$: μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία, N_{id} : μέσος αριθμός ιδιωτικών αλληλόμορφων, n : αριθμός δειγμάτων]

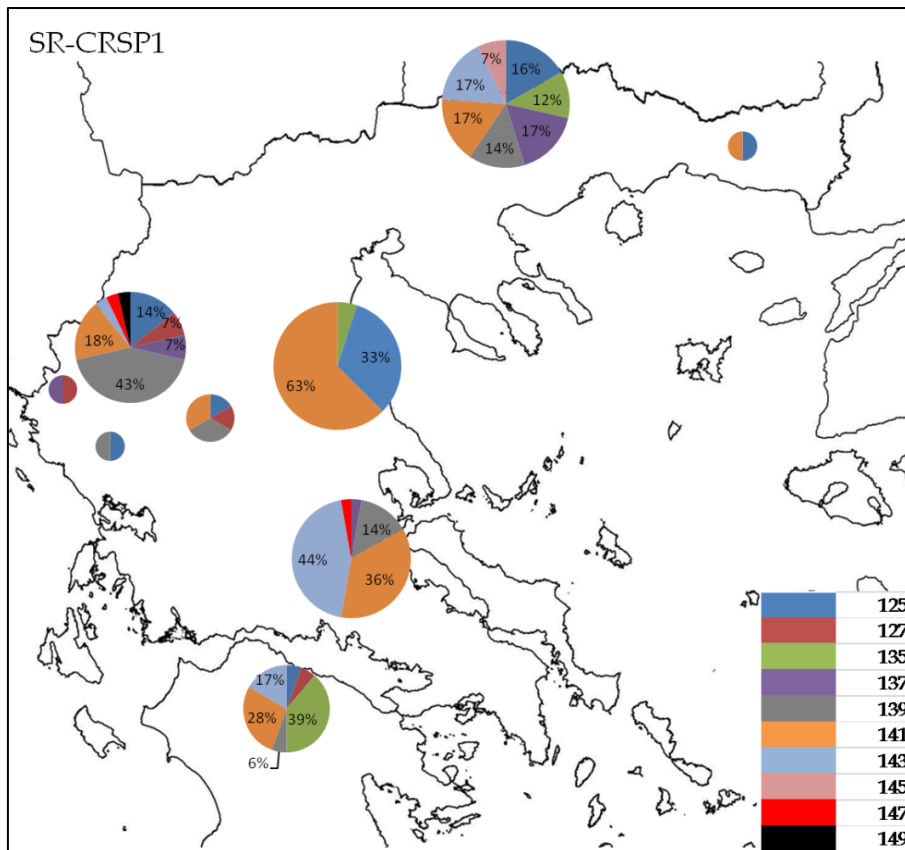
*υπολογίστηκε για τους τέσσερις πληθυσμούς και όχι στο σύνολο της χώρας



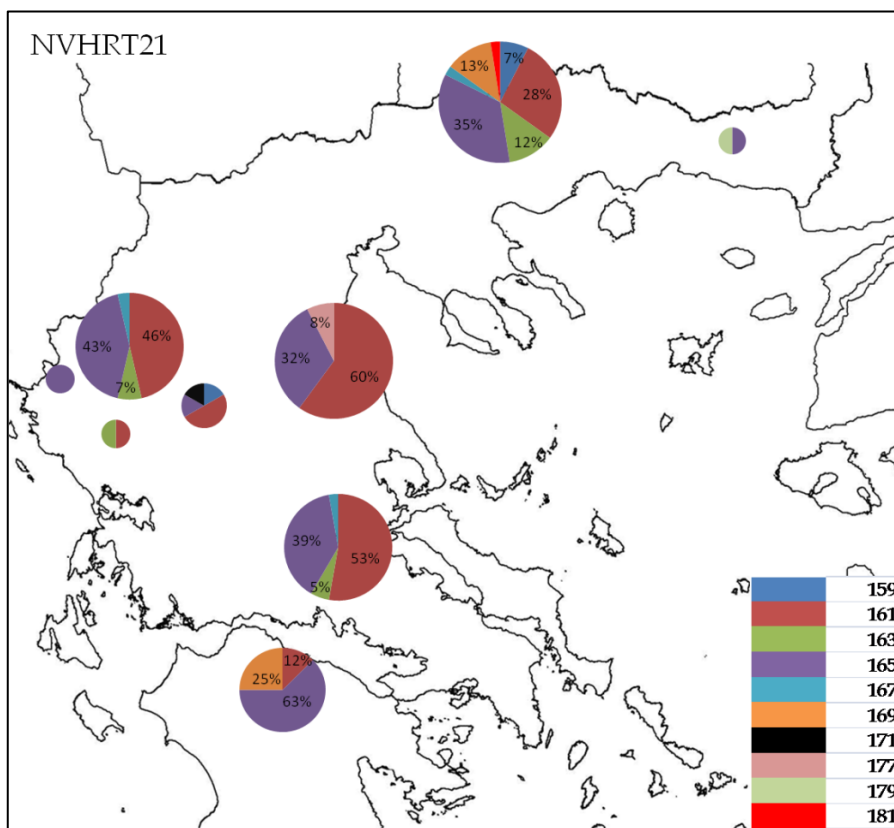
Γράφημα 2.3.1: Γραφική απεικόνιση της αλληλικής ποικιλότητας (A), της διορθωμένης αλληλικής ποικιλότητας (A_u) και του μέσου αριθμού ιδιωτικών αλληλόμορφων (N_{id}) στους κυριότερους πληθυσμούς



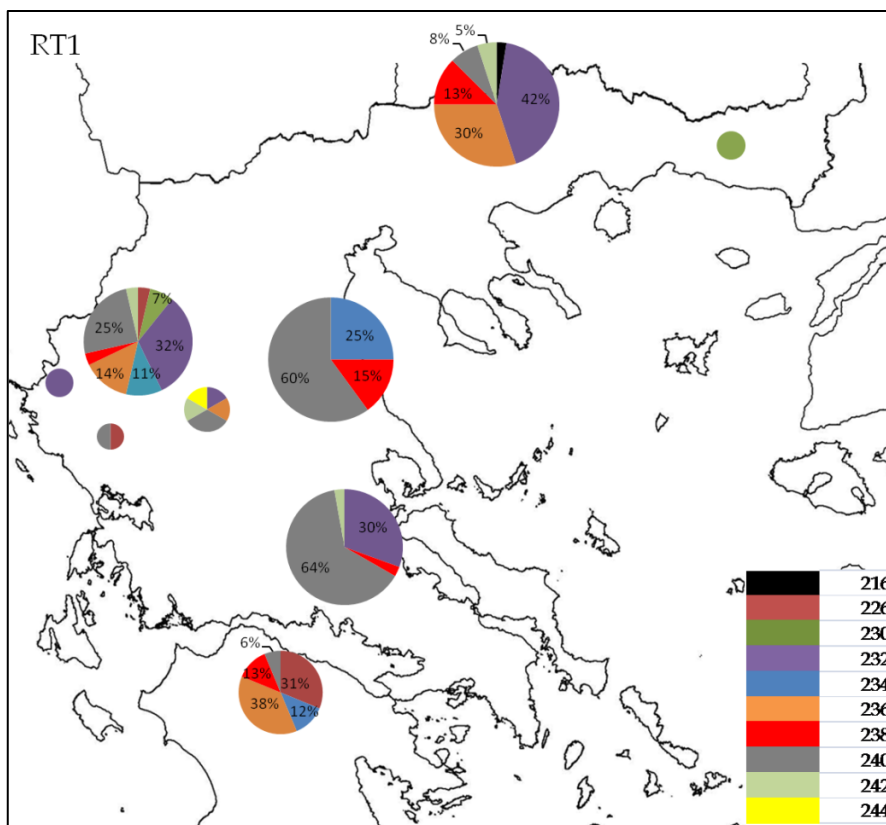
Γράφημα 2.3.2: Γραφική απεικόνιση της μέσης παρατηρούμενης (H_o) και της μέσης αναμενόμενης ετεροζυγωτίας ($H_{e.u}$) στους κυριότερους πληθυσμούς



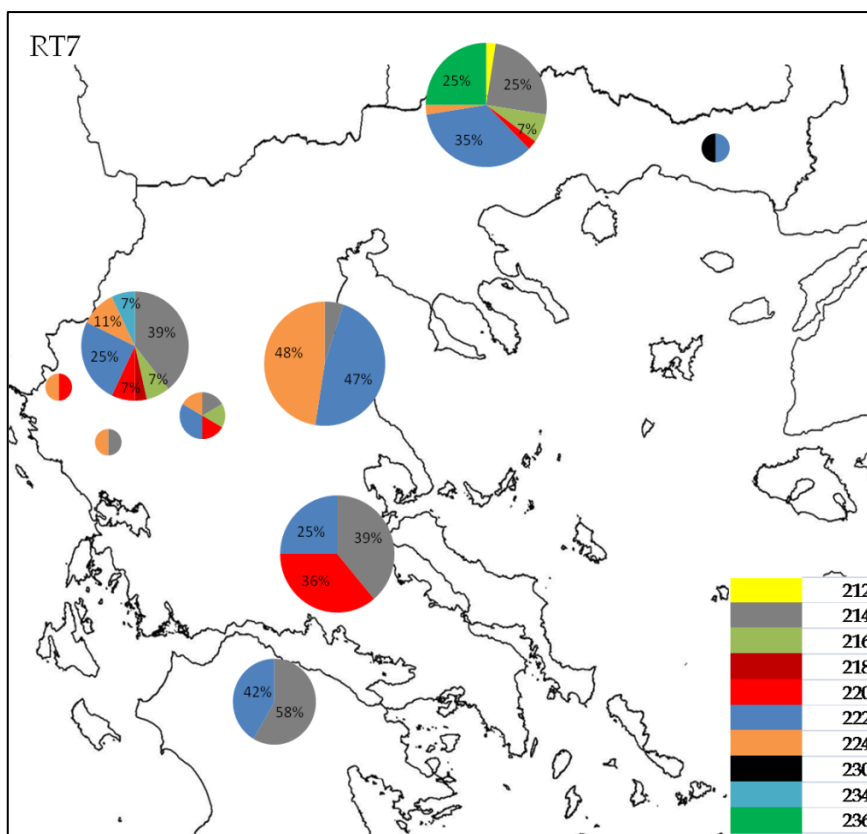
Εικόνα 2.3.4 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο SR-CRSP1



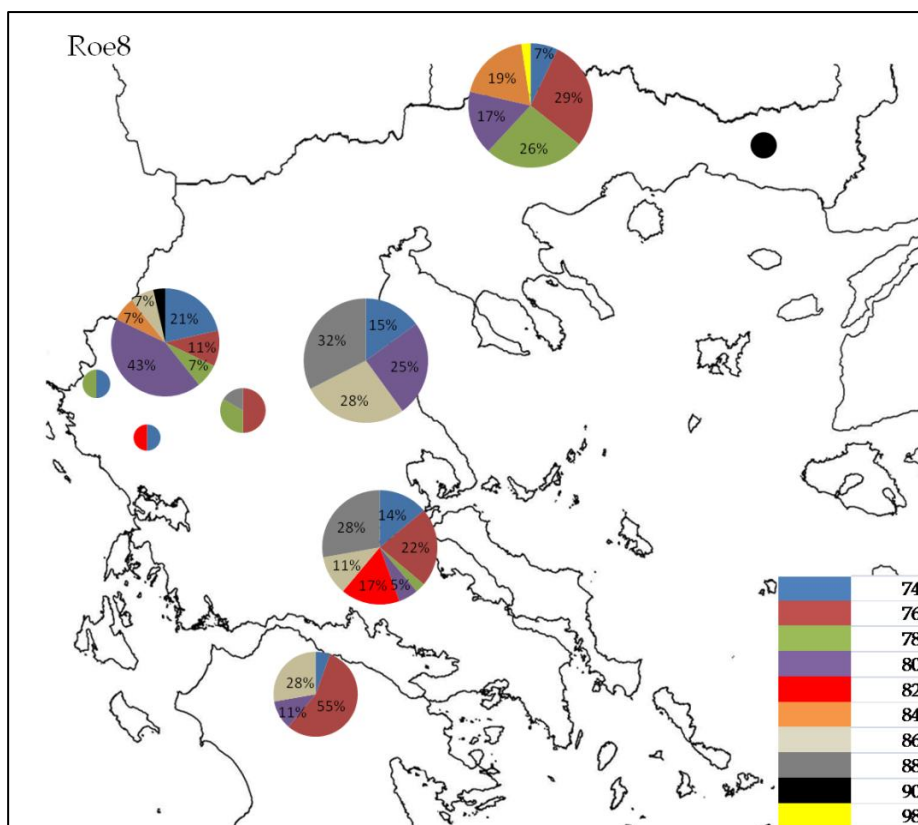
Εικόνα 2.3.5 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο NVHRT21



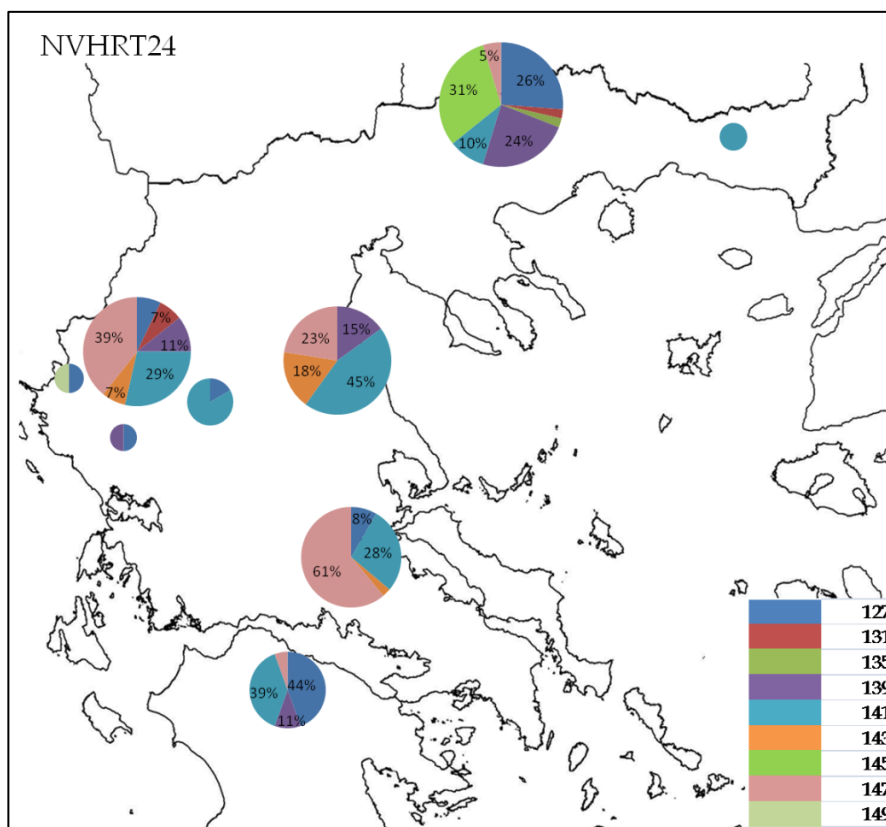
Εικόνα 2.3.6 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο RT1



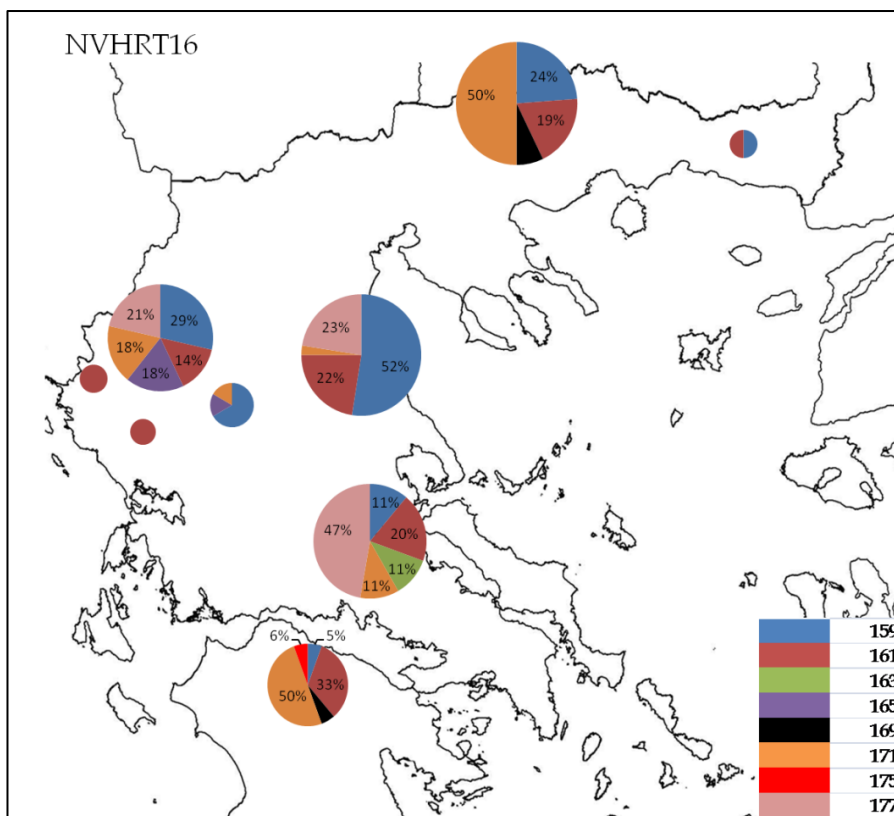
Εικόνα 2.3.7 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο RT7



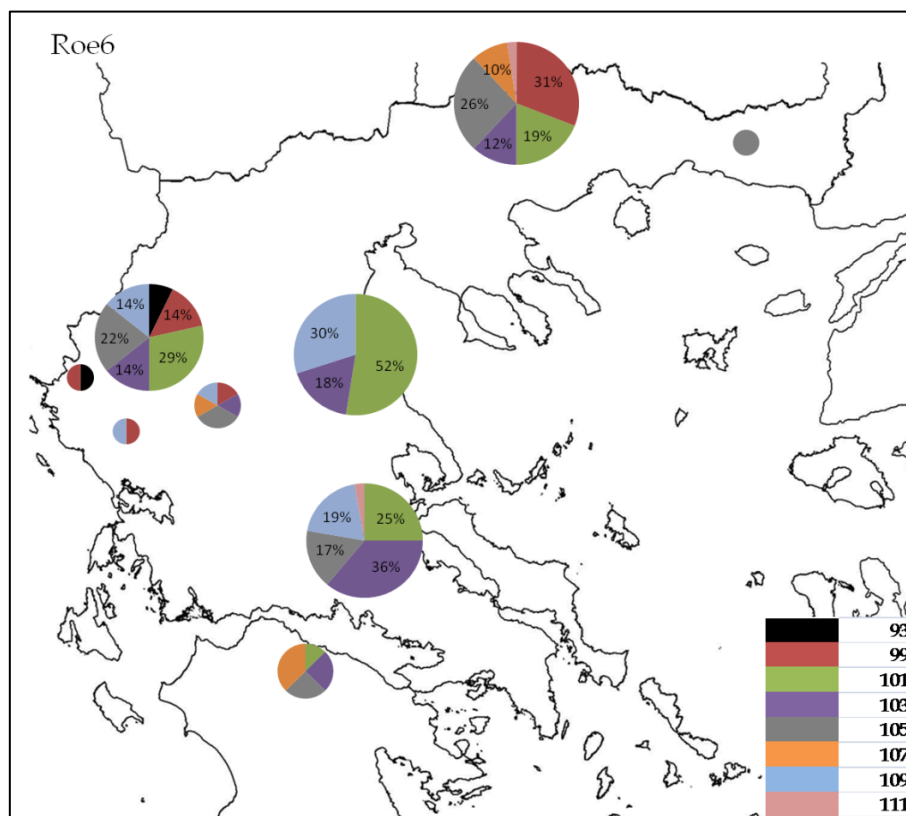
Εικόνα 2.3.8 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο Roe8



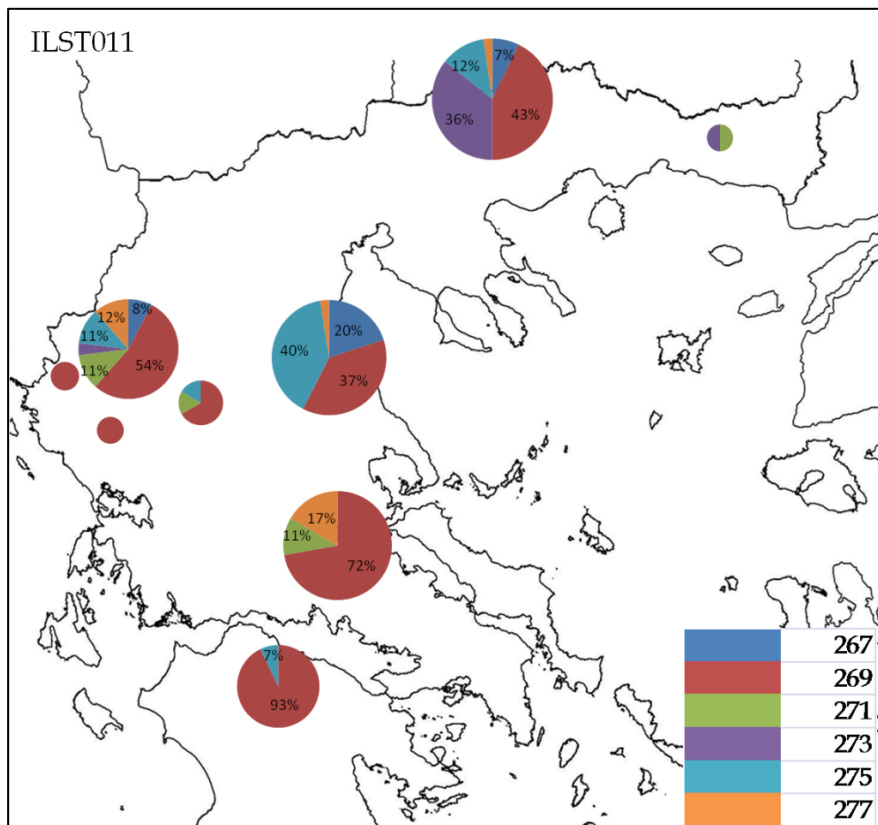
Εικόνα 2.3.9 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο NVHRT24



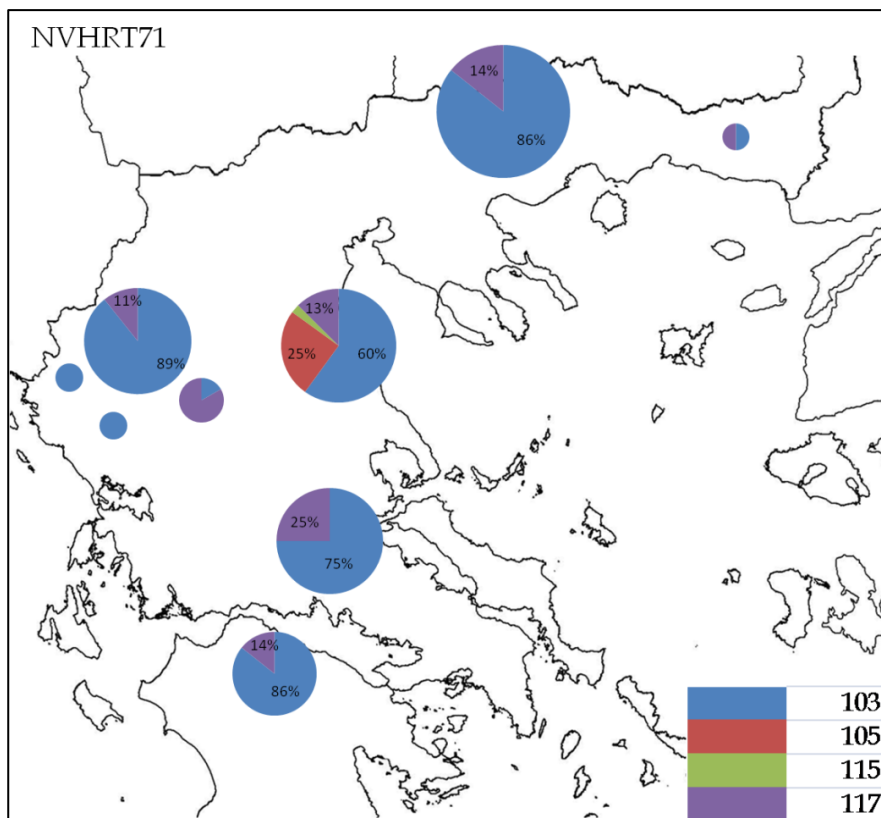
Εικόνα 2.3.10 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο NVHRT16



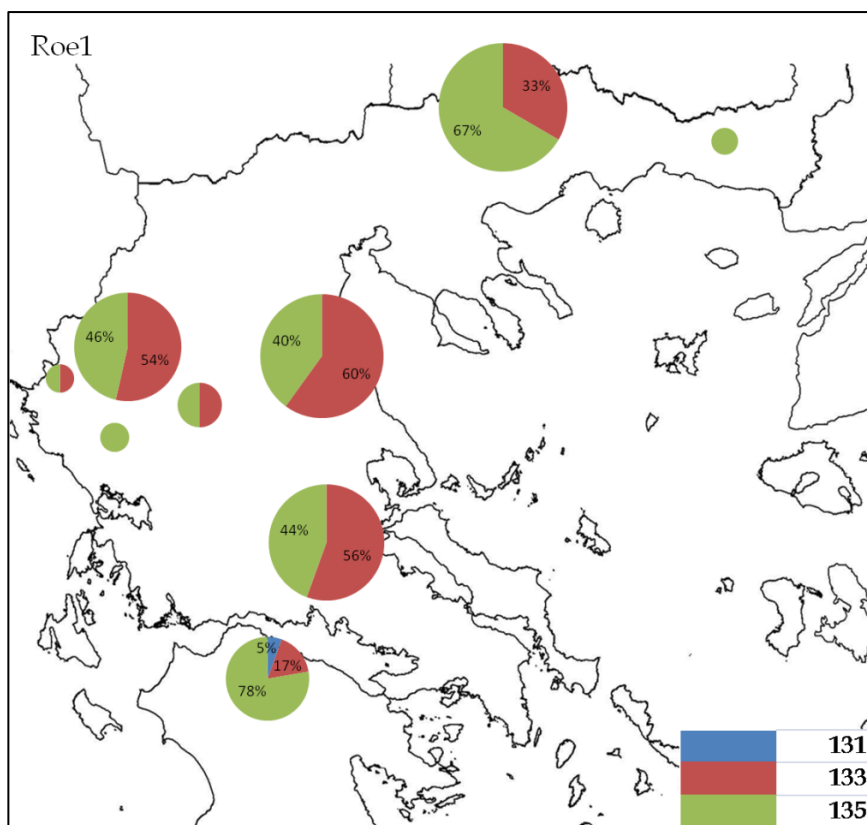
Εικόνα 2.3.11 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο Roε6



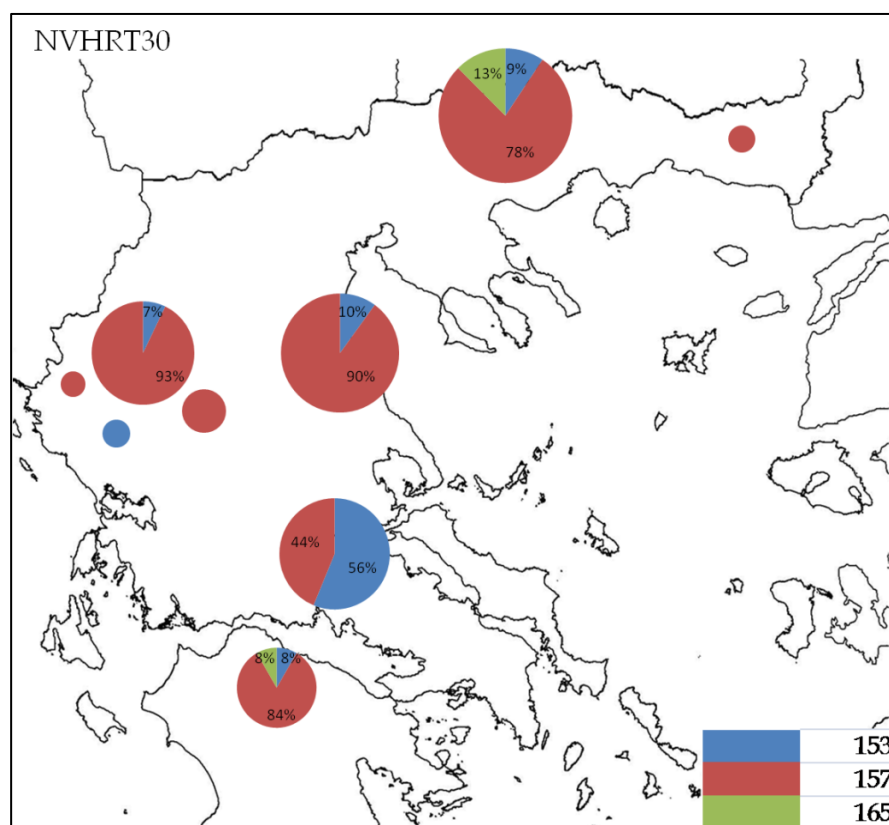
Εικόνα 2.3.12 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο ILST011



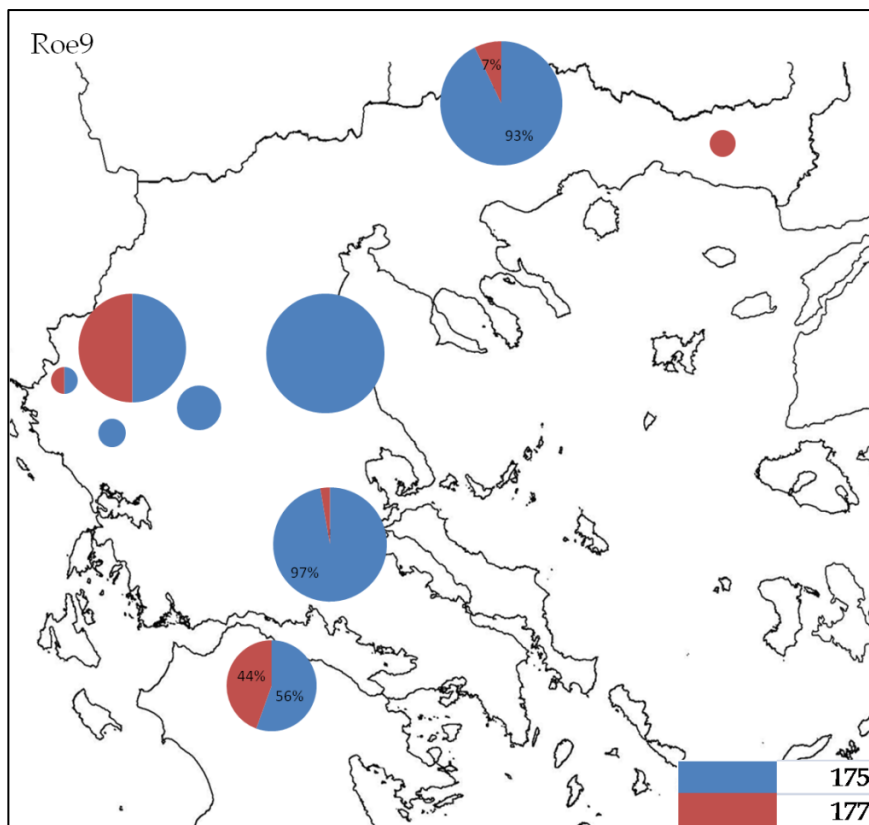
Εικόνα 2.3.13 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο NVHRT71



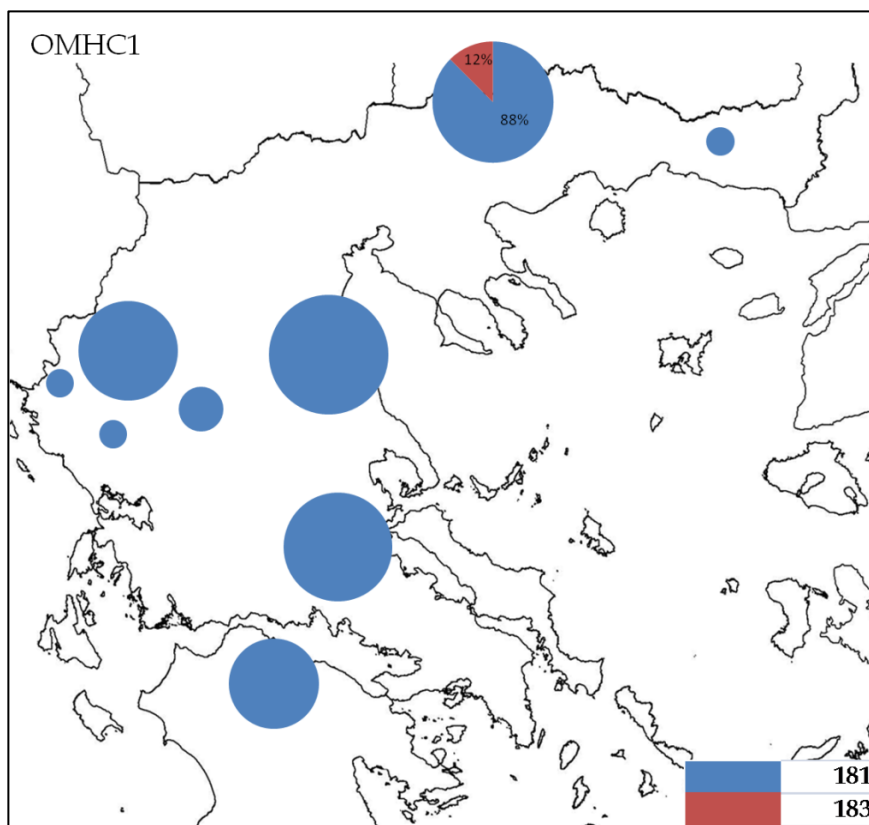
Εικόνα 2.3.14 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο Roe1



Εικόνα 2.3.15 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο NVHRT30



Εικόνα 2.3.16 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο Roe9



Εικόνα 2.3.17 : Συχνότητες αλληλόμορφων στον γενετικό τόπο OMHC1

Αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg

Τα αποτελέσματα των ελέγχων απόκλισης από την ισορροπία *Hardy-Weinberg* παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.13, όπου δίδονται και οι παρατηρούμενες (H_o) και αναμενόμενες ($H_{e.u}$) ετεροζυγωτίες ανά τόπο σε κάθε πληθυσμό. Στο σύνολο των γενετικών τόπων και των πληθυσμών, παρατηρείται στατιστικά σημαντική ανισορροπία ($p < 0,00001$) με τη μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία ($H_o = 0,530$) να υπολείπεται (έλλειμμα ετεροζυγωτίας) της θεωρητικά αναμενόμενης ($H_{e.u} = 0,539$). Όσον αφορά στους επιμέρους πληθυσμούς, μόνο στον πληθυσμό της Όσας εντοπίστηκε στατιστικά σημαντικό έλλειμμα ετεροζυγωτίας (ύστερα και από διόρθωση Bonferroni οπότε το επίπεδο σημαντικότητας γίνεται $p = 0,0035$) (βλ. Πίνακα 2.3.13). Αν εστιάσουμε στους γενετικούς τόπους, τότε παρατηρούμε ότι για την πλειονότητά τους (9/14) δεν παρατηρείται καμία απόκλιση και σε κανέναν πληθυσμό. Οι τόποι NVHRT16 και NVHRT71 είναι οι μόνοι που φαίνονται να αποκλίνουν σημαντικά (ύστερα και από διόρθωση Bonferroni οπότε $p = 0,01$) αν και δεν εμφανίζουν αυτή την τάση σε όλους τους πληθυσμούς (βλ. Πίνακα 2.3.13).

Γονοτυπική ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium)

Η ανάλυση για την ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης που πραγματοποιήθηκε ανά ζεύγος γενετικών τόπων έδειξε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των γονότυπων σε έναν τόπο με τους γονότυπους σε οποιονδήποτε άλλο τόπο, μετά από διόρθωση Bonferroni. Μπορούμε λοιπόν να αποκλείσουμε την περίπτωση κάποιου από τους τόπους που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις μας να είναι συνδεδεμένοι.

Πίνακας 2.3.13 : Αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE)

[L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι, V:Καλάβρυτα, n: αριθμός ατόμων που γονοτυπήθηκαν, N: αριθμός αλληλόμορφων, H_o: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, H_{eu}: αναμενόμενη ετεροζυγωτία, N.S: στατιστικά μη σημαντική]

		SR<CR>SP1	ILST011	NVHRIT6	NVHRIT21	NVHRIT24	OMHC1	Roe01	Roe06	Roe08	Roe09	RT1	RT7	NVHRIT 71	NVHRIT 30	Μέση τιμή ανά πληθυσμό	Fisher Test ανά πληθυσμό Bonferoni corrected P<0,0035
L	n	21	21	21	20	21	20	21	21	21	21	20	20	21	16	20,357	$X^2_{28}=47,1$ $p=0,0133$ N.S
	N	7	5	4	7	7	2	2	6	6	2	6	7	2	3	4,714	
	H _o	0,952	0,619	0,619	0,650	0,619	0,250	0,571	0,619	0,857	0,143	0,400	0,700	0,000	0,438	0,531	
	H _{eu}	0,870	0,685	0,668	0,783	0,785	0,224	0,455	0,794	0,799	0,136	0,723	0,764	0,251	0,377	0,594	
	HWE	N.S			$p=0,0411$			N.S				$p=0,0049$		N.S		$p=0,0003$	
O	n	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	$X^2_{24}=48,3$ $p=0,0023$
	N	3	4	4	3	4	1	2	3	4	1	3	3	4	2	2,929	
	H _o	0,500	0,650	0,400	0,400	0,600	-	0,800	0,650	0,750	-	0,600	0,600	0,250	0,200	0,457	
	H _{eu}	0,514	0,676	0,638	0,542	0,712	-	0,492	0,619	0,753	-	0,569	0,560	0,576	0,185	0,488	
	HWE	N.S		$p=0,0048$		N.S			$p=0,0054$				N.S		$p=0,0013$		
P	n	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	16	17,857	N.S
	N	5	3	5	4	3	1	2	5	7	2	4	3	2	2	3,500	
	H _o	0,778	0,444	0,778	0,556	0,444	-	0,778	0,778	0,722	0,056	0,667	0,667	0,278	0,500	0,532	
	H _{eu}	0,670	0,451	0,722	0,583	0,557	-	0,508	0,762	0,833	0,056	0,511	0,675	0,386	0,508	0,516	
	HWE	N.S		$p=0,0378$		N.S		$p=0,0418$		$p=0,0503$			N.S				
Z	n	14	13	14	14	14	13	14	14	14	14	14	14	14	14	13,857	N.S
	N	8	6	5	4	5	1	2	6	7	2	8	7	2	2	4,714	
	H _o	0,786	0,538	0,643	0,786	0,786	-	0,643	0,857	0,786	0,429	0,929	0,714	0,071	0,143	0,579	
	H _{eu}	0,778	0,689	0,817	0,616	0,765	-	0,516	0,836	0,770	0,519	0,823	0,783	0,198	0,138	0,589	
	HWE	N.S															
V	n	9	7	9	8	9	9	9	4	9	9	8	6	7	6	7,786	N.S
	N	6	2	5	3	4	1	3	4	4	2	5	2	2	3	3,286	
	H _o	0,778	0,143	0,778	0,750	0,778	-	0,444	1,000	0,444	0,889	0,875	0,500	0,000	0,333	0,551	
	H _{eu}	0,778	0,143	0,667	0,567	0,673	-	0,386	0,821	0,634	0,523	0,775	0,530	0,264	0,318	0,506	
	HWE	N.S															
Μέση τιμή ανά τόπο	H _o	0,759	0,479	0,643	0,628	0,645	0,050	0,647	0,781	0,712	0,303	0,694	0,636	0,120	0,323	H _o = 0,530	$X^2_{126}=178,3$ $p=0,0000$
	H _{eu}	0,722	0,529	0,703	0,618	0,698	0,045	0,471	0,767	0,758	0,247	0,680	0,662	0,335	0,305	H _{eu} = 0,539	
Fisher Test ανά τόπο Bonferoni corrected P<0,01	N.S			$X^2_{10}=26,8$ $p=0,0028$			N.S			$X^2_{10}=19,6$ $p=0,0330$ N.S				N.S		$X^2_{10}=42,1$ $p=0,0000$	

Γενετική δομή και διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών

Τα αποτελέσματα των δεικτών F δίνονται στον Πίνακα 2.3.14. Ο δείκτης F_{ST} κυμάνθηκε στους διάφορους γενετικούς τόπους από 0,023 (NVHRT21) έως 0,366 (Roe9) ενώ στο σύνολο των φυσικών πληθυσμών έλαβε την τιμή 0,128 ($\pm SE=0,015$). Η τιμή αυτή είναι στατιστικά διαφορετική από το μηδέν (bootstrap 95% CI: 0,100 - 0,159) και δείχνει ότι το 12,8% της παρατηρούμενης γενετικής ποικιλότητας οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Ο δείκτης F_{IS} κυμάνθηκε μεταξύ -0,444 (Roe1) και 0,601 (NVHRT71) ενώ στο σύνολο των τόπων και των πληθυσμών έλαβε τη μέση τιμή 0,047 ($\pm SE=0,047$). Η χαμηλή και στατιστικά μη σημαντική (bootstrap 95% CI: -0,048 - 0,138, το μηδέν συμπεριλαμβάνεται στα όρια εμπιστοσύνης) τιμή του συντελεστή ενδογαμίας υποδεικνύει την ελεύθερη και τυχαία διασταύρωση των ατόμων μέσα στα πλαίσια κάθε πληθυσμού. Οι εκτιμήσεις των δεικτών F_{IS} ξεχωριστά για κάθε πληθυσμό το επιβεβαιώνουν αφού καμία τιμή δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ύστερα από διόρθωση Bonferroni ($p_{0,05}= 0,00089$). Ο συντελεστή συνολικής ενδογαμίας (F_{IT}) έλαβε την τιμή 0,169 (SE: 0,044) που ήταν σημαντικά διαφορετική από το μηδέν (bootstrap 95% CI: 0,077 - 0,252).

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών (ανά ζεύγος τιμές του δείκτη F_{ST} (Πίνακας 2.3.15) ήταν στο σύνολό τους στατιστικά σημαντικές ($p<0,001$, 3000 αντιμεταθέσεις) και κυμάνθηκαν για τους φυσικούς πληθυσμούς από 7,2% (μεταξύ Ζαγορίου και Λαϊλιά) έως 16,8% (μεταξύ Λαϊλιά και Όσσας). Η σημαντική διαφοροποίηση των πληθυσμών αυτών φαίνεται και από τις μεταξύ τους γενετικές αποστάσεις D και D_c που παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.3.16. Οι υψηλότερες τιμές γενετικής απόστασης παρατηρήθηκαν μεταξύ των πληθυσμών Λαϊλιά και Όσσας ($D=0,3$ και $D_c=0,227$). Όσον αφορά τη μικρότερη παρατηρούμενη απόσταση, στη περίπτωση της πρότυπης γενετικής απόστασης D του Nei εντοπίζεται μεταξύ Λαϊλιά και Ζαγορίου, ενώ στην περίπτωση της απόστασης «χορδής» D_c των Cavalli-Sforza και Edwards μεταξύ Ζαγορίου και Παρνασσίδας. Χρησιμοποιώντας ως γενικό μέτρο της διαφοροποίησης των πληθυσμών τη μέση τιμή των γενετικών τους αποστάσεων (βλ. Πίνακα 2.3.16) διαπιστώνουμε ότι ο πληθυσμός του Λαϊλιά είναι ο πλέον διαφοροποιημένος (μέση $D=0,245$ και μέση $D_c=0,175$) ενώ ο πληθυσμός του Ζαγορίου ο λιγότερο διαφοροποιημένος (μέση $D=0,176$ και μέση $D_c=0,119$) σε σχέση με τους υπόλοιπους.

Πίνακας 2.3.14 : *F- statistics*

Σε παρένθεση τα τοπικά σφάλματα και με αστερίσκο οι στατιστικά σημαντικές τιμές.

[L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι, V:Καλάβρυτα]

Γενετικός τύπος	Δείκτης	Πληθυσμοί					Στο σύνολο των φυσικών πληθυσμών
		L	O	P	Z	V	
SR-CRSP1	F_{IS}	-0,097	0,028	-0,167	-0,011	0,000	-0,070
	F_{ST}						0,135
	F_{IT}						0,074
NVHRT21	F_{IS}	0,174	0,267	0,048	-0,288	-0,355	0,082
	F_{ST}						0,023
	F_{IT}						0,103
RT1	F_{IS}	0,453	-0,056	-0,316	-0,134	-0,140	0,034
	F_{ST}						0,179
	F_{IT}						0,207
RT7	F_{IS}	0,086	-0,070	0,012	0,091	0,063	0,033
	F_{ST}						0,153
	F_{IT}						0,181
Roe8	F_{IS}	-0,075	0,003	0,137	-0,021	0,312	0,011
	F_{ST}						0,111
	F_{IT}						0,121
NVHRT24	F_{IS}	0,216	0,160	0,207	-0,029	-0,167	0,148
	F_{ST}						0,146
	F_{IT}						0,272
NVHRT16	F_{IS}	0,075	0,380	-0,079	0,220	-0,179	0,144
	F_{ST}						0,135
	F_{IT}						0,260
Roe6	F_{IS}	0,225	-0,051	-0,021	-0,026	-0,263	0,047
	F_{ST}						0,090
	F_{IT}						0,133
ILST011	F_{IS}	0,099	0,039	0,014	0,226	0,000	0,091
	F_{ST}						0,123
	F_{IT}						0,202
NVHRT71	F_{IS}	1,000	0,593	0,286	0,649	1,000	0,601
	F_{ST}						0,062
	F_{IT}						0,626
NVHRT30	F_{IS}	-0,167	-0,086	0,016	-0,040	-0,053	-0,064
	F_{ST}						0,251
	F_{IT}						0,203
Roe1	F_{IS}	-0,263	-0,652	-0,556	-0,258	-0,164	-0,444
	F_{ST}						0,047
	F_{IT}						-0,375
oMHC1	F_{IS}	-0,118	-	-	-	-	-0,114
	F_{ST}						0,099
	F_{IT}						-0,004
Roe9	F_{IS}	-0,053	-	0,000	0,179	-0,778	0,098
	F_{ST}						0,366
	F_{IT}						0,429
Στο σύνολο των τύπων	F_{IS}	0,108	0,070	-0,032	0,017	-0,098	0,047 (0,047)
	F_{ST}						0,128 (0,015)*
	F_{IT}						0,169 (0,044)*

Πίνακας 2.3.15 : Τιμές F_{ST} ανά ζεύγος πληθυσμών

Όλες οι τιμές ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,001$) ύστερα από 3000 αντιμεταθέσεις (permutations).

[L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι, V:Καλάβρυτα]

F_{ST}	L	O	P	Z	V
L					
O	0,168				
P	0,145	0,141			
Z	0,072	0,107	0,101		
V	0,083	0,230	0,183	0,100	

Πίνακας 2.3.16 : Γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών

Στον άνω τριγωνικό πίνακα οι αποστάσεις D (Nei 1972) και στον κάτω τριγωνικό οι αποστάσεις D_c (Cavalli-Sforza & Edwards 1967). Οι μέσες τιμές υπολογίστηκαν από τις αποστάσεις μόνο των φυσικών πληθυσμών.

[L: Λαϊλιάς, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι, V:Καλάβρυτα]

<i>Distance</i>	L	O	P	Z	V	Μέση D
L		0,300	0,270	0,165	0,179	0,245
O	0,227		0,207	0,180	0,392	0,229
P	0,181	0,144		0,183	0,314	0,220
Z	0,117	0,132	0,108		0,204	0,176
V	0,134	0,214	0,184	0,148		
Μέση D_c	0,175	0,168	0,144	0,119		

Έλεγχος για την ύπαρξη ευρύτερων γεωγραφικών προτύπων γενετικής διαφοροποίησης

Η ανάλυση AMOVA, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δίνει τη δυνατότητα ελέγχου διαφόρων υποθέσεων ομαδοποίησης και υπολογισμού των συντελεστών Φ που μετρούν τη διαφοροποίηση εντός και μεταξύ των υποτιθέμενων ομαδοποιήσεων. Στον Πίνακα 2.3.17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για μια σειρά από υποθέσεις (βλ. στήλη «Τύπος ομαδοποίησης») για τη σχέση των τεσσάρων φυσικών πληθυσμών.

Σύμφωνα με τη πρώτη υπόθεση δεν παρατηρείται καμία επιπλέον ομαδοποίηση των πληθυσμών. Σε αυτή την περίπτωση βρέθηκε ότι το 12,9% της παρατηρούμενης γενετικής ποικιλότητας οφείλεται στη διαπληθυσμιακή ποικιλότητα (δείκτης Φ_{ST}). Η τιμή αυτή είναι σχεδόν ταυτόσημη με την τιμή του δείκτη F_{ST} , παρότι υπολογίστηκε με διαφορετική προσέγγιση. Υπενθυμίζεται ότι η AMOVA στηρίζεται μεν στη μέθοδο των Weir και Cockerham (1984) με την οποία υπολογίσαμε τα *F-statistics* αλλά στον προσδιορισμό των διαφορών ποικιλότητας εκτός από τις αλληλικές συχνότητες συνυπολογίζεται η γενετική απόσταση (π.χ. ο αριθμός των διαφορετικών αλληλόμορφων) μεταξύ των δειγμάτων.

Για τις υπόλοιπες υποθέσεις, στατιστικά σημαντικές -αν και οριακά- τιμές για το δείκτη Φ_{CT} , ο οποίος δείχνει το ποσοστό της ποικιλότητας που οφείλεται σε διαφορές μεταξύ ομάδων πληθυσμών, λάβαμε μόνο στις περιπτώσεις που οι πληθυσμοί Λαϊλιά και Ζαγορίου αποτέλεσαν μία ομάδα ($\Phi_{CT} = 6\%$, με Λαϊλιά+Ζαγόρι, Όσσα, Παρνασσίδα.)

Πίνακας 2.3.17 : Αποτελέσματα AMOVA για διάφορες ομαδοποιήσεις (με έντονο χρώμα οι στατιστικά σημαντικές τιμές των δεικτών Φ). Οι υπολογισμοί των αποστάσεων έχουν γίνει με βάση τον αριθμό των διαφορετικών αλληλόμορφων.

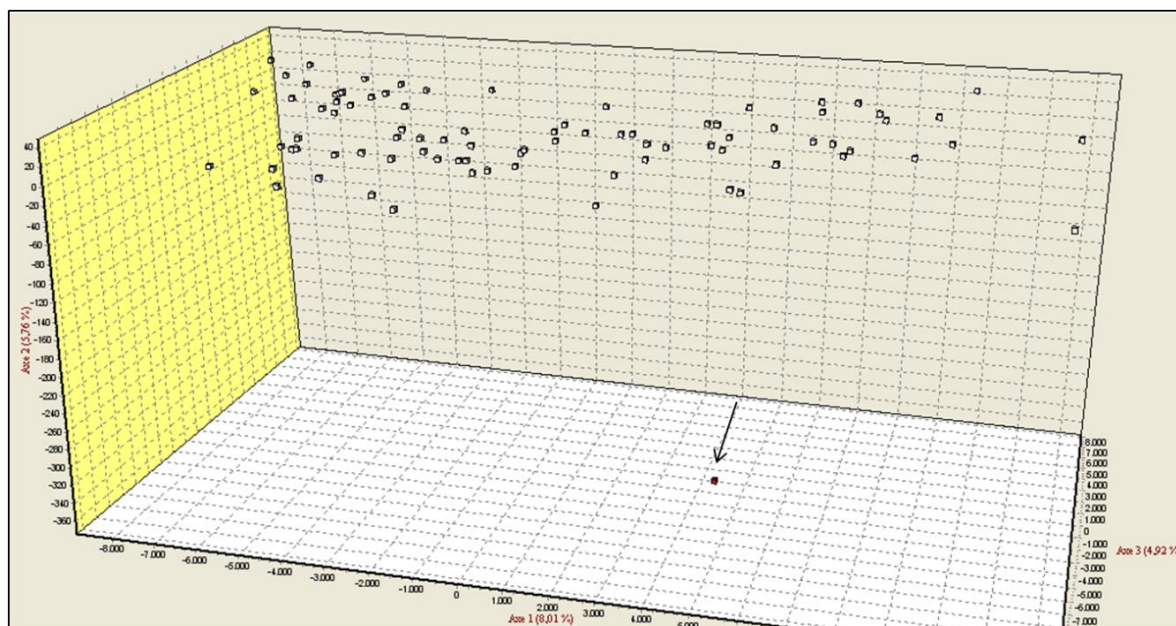
Τύπος ομαδοποίησης	Πηγή της διακύμανσης της ποικιλότητας (%)			Φ statistics		
	Μεταξύ των πληθυσμών εντός των ομάδων	Εντός των πληθυσμών	Μεταξύ των ομάδων	Φ_{ST}	Φ_{SC}	Φ_{CT}
1 ομάδα	12,92	87,08	-	0,129 (P<0,000)	-	-
2 ομάδες						
[LZ]/[OP]	10,51	86,11	3,38	0,139 (P<0,000)	0,109 (P<0,000)	0,034 (P=0,032)
[L,Z,P]/[O]	11,34	85,99	2,67	0,140 (P<0,000)	0,117 (P<0,000)	0,027 (P=0,181)
[L,Z,O]/[P]	12,66	86,86	0,48	0,131 (P<0,000)	0,127 (P<0,000)	0,005 (P=0,420)
3 ομάδες						
[L,Z]/[O]/[P]	7,70	86,34	5,96	0,137 (P<0,000)	0,082 (P<0,000)	0,060 (P=0,046)
[L]/[O,Z]/[P]	8,39	89,17	2,44	0,108 (P<0,000)	0,086 (P<0,000)	0,024 (P=0,358)

Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (Factorial Correspondence Analysis, FCA)

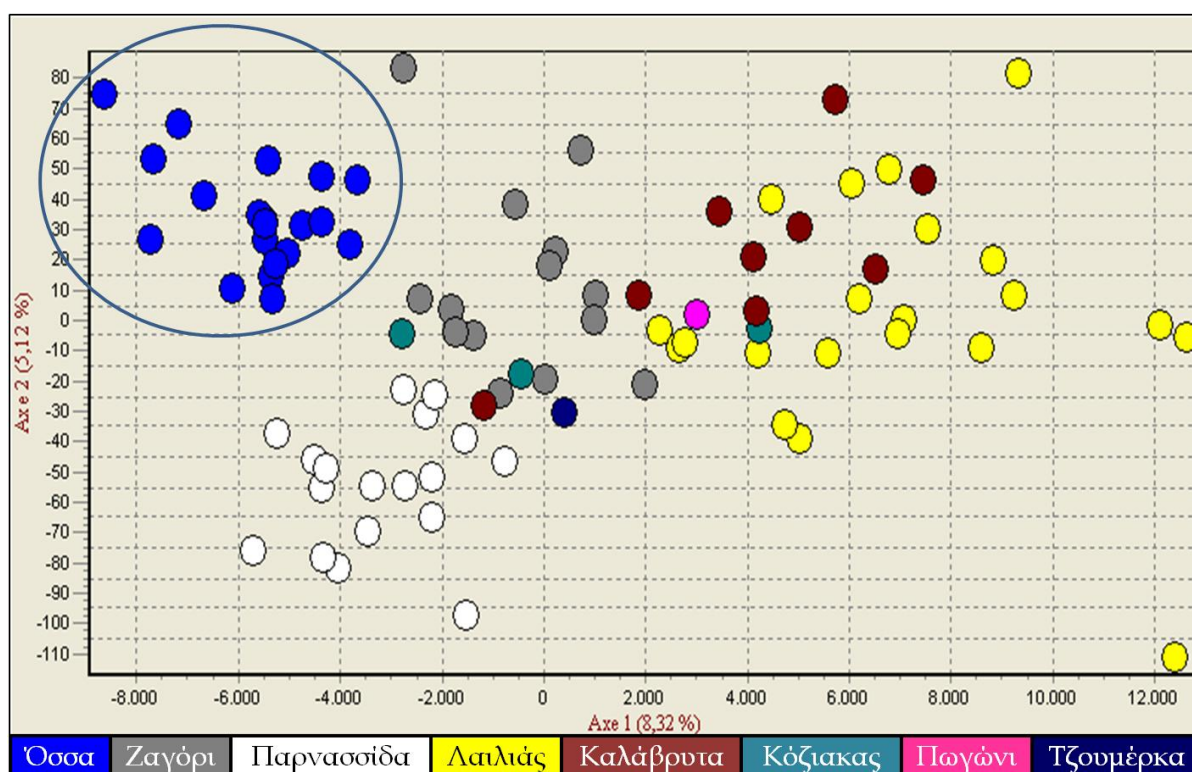
Η ανάλυση FCA που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των ατόμων παρουσιάζεται στο τριδιάστατο γράφημα της Εικόνας 2.3.18. Όπως παρατηρούμε οι τρεις πρώτοι παραγοντικοί άξονες ερμηνεύουν το 18,69% της παρατηρούμενης διακύμανσης της γενετικής ποικιλότητας. Το μοναδικό άτομο που γονοτυπήθηκε από την Ανατολική Ροδόπη (E) εμφανίζει ακραία τοποθέτηση σε σχέση με τα υπόλοιπα άτομα, έχοντας πολύ μεγάλη απόσταση από όλα τα άλλα στον δεύτερο άξονα. Τέτοια συμπεριφορά παρατηρείται στις περιπτώσεις που ένας σπάνιος γονότυπος παρουσιάζει πολύ μεγάλη συνεισφορά σε έναν παραγοντικό άξονα υψηλής τάξης (outlier).

Αφαιρέσαμε το συγκεκριμένο άτομο και επαναλάβουμε την ανάλυση λαμβάνοντας σαφώς πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα. Οι τρεις πρώτοι παραγοντικοί άξονες ερμηνεύουν μόλις το 18,35% της παρατηρούμενης διακύμανσης. Στην Εικόνα 2.3.19 παρουσιάζεται το διδιάστατο γράφημα (περιλαμβάνονται οι δυο πρώτοι άξονες), στο οποίο τα άτομα απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή από την οποία προέρχονται. Τα άτομα από τους τέσσερις βασικούς πληθυσμούς (Λαϊλιάς, Όσσα, Παρνασσίδα, Ζαγόρι) δεν επικαλύπτονται και συγκροτούν διακριτά νέφη σημείων, με διαφορετικό όμως βαθμό συνοχής. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες της Όσσας και της Παρνασσίδας παρουσιάζουν ισχυρή συνοχή (μικρές αποστάσεις μεταξύ των ατόμων της ομάδας) σε αντίθεση με τις ομάδες του Λαϊλιά και του Ζαγορίου στις οποίες παρατηρείται μια σαφώς «χαλαρότερη» συγκρότηση. Τα άτομα των υπόλοιπων περιοχών καταλαμβάνουν ενδιάμεσες θέσεις μεταξύ ή εντός των νεφών του Λαϊλιά, του Ζαγορίου και της Παρνασσίδας, χωρίς να συνιστούν ευδιάκριτες ομάδες.

Ο πρώτος άξονας διακρίνει τα άτομα του Λαϊλιά από τα άτομα της Όσσας και της Παρνασσίδας, ενώ ο δεύτερος διακρίνει τα άτομα Όσσας και Παρνασσίδας μεταξύ τους. Τα άτομα που προέρχονται από την περιοχή του Ζαγορίου καταλαμβάνουν κεντρική θέση.



Εικόνα 2.3.18 : Τρισδιάστατο FCA γράφημα (plot) των γονότυπων όλων των ατόμων.
 Με βέλος επισημειώνεται η θέση του ατόμου Ε (από Ανατολική Ροδόπη)



Εικόνα 2.3.19 : Δισδιάστατο FCA γράφημα (plot) των γονότυπων 87 ατόμων (αφαιρέθηκε το άτομο από την Ανατολική Ροδόπη)

Ανάλυση Μπεϋζιανής ομαδοποίησης (Structure)

Τα αποτελέσματα ελέγχου ομαδοποίησης με το πρόγραμμα STRUCTURE παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.18. Η χαμηλότερη τιμή πιθανοφάνειας ($\ln P(D)$) παρατηρήθηκε για $K=1$ (-3143,50), γεγονός που αποκλείει -με βάση τα δεδομένα μας- το ενδεχόμενο της ύπαρξης ενός ενιαίου παμμεικτικού πληθυσμού. Η επιλογή του αριθμού γενετικών ομάδων μεταξύ $K=2$ και $K=9$, στηρίχθηκε στην εκτίμηση του ΔK (Evanno *et al.* 2005) και όχι της μέγιστης πιθανοφάνειας. Ενώ λοιπόν η μέγιστη τιμή πιθανοφάνειας παρατηρήθηκε για $K=5$ (-2785,12), επιλέξαμε ως πιθανότερο το ενδεχόμενο της ύπαρξης τεσσάρων ανεξάρτητων, παμμεικτικών γενετικών ομάδων (I, II, III, IV) αφού σε αυτή την περίπτωση μεγιστοποιείται η τιμή του ΔK ($\Delta K_4=55,6$).

Οι τιμές των συντελεστών συμμετοχής (q) για κάθε άτομο, όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα για $K=4$, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.3.20 και εποπτικά στην Εικόνα 2.3.20. Με βάση το κριτήριο που αυθαίρετα θέσαμε για την αντιστοιχία των ατόμων ($q > 0,75$) μπορούμε να πούμε ότι 75 από τα 88 άτομα αντιστοιχίστηκαν σε κάποια ομάδα (ποσοστό 85%) ενώ 13 άτομα εμφάνισαν ανάμεικτο γονότυπο ($q_{max} < 0,75$). Στην ομάδα I αντιστοιχίστηκαν συνολικά 15 άτομα, που προέρχονται αποκλειστικά από την περιοχή της Παρνασσίδας, με μέση τιμή για τον συντελεστή $q_1=0,95$. Η ομάδα II περιλαμβάνει μόνο τα 20 άτομα της Όσσας με μέση τιμή για τον συντελεστή $q_2=0,97$. Στην ομάδα III αντιστοιχίστηκαν συνολικά 18 άτομα με κύρια γεωγραφική προέλευση την περιοχή του Ζαγορίου (13 άτομα) και μέση τιμή για τον συντελεστή $q_3=0,89$. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην ομάδα αυτή αντιστοιχίστηκαν με υψηλές τιμές ένα άτομο από τον Λαϊλιά (L19) και το άτομο από την Ανατολική Ροδόπη (E). Η ομάδα IV, τέλος, περιλαμβάνει 22 άτομα (16 από την περιοχή του Λαϊλιά) που παρουσιάζουν μέση τιμή για τον συντελεστή $q_4=0,93$.

Η αντιστοιχία των ατόμων στις τέσσερις ομάδες έδειξε σε γενικές γραμμές τη σημαντική συσχέτιση ή ακόμα και την ταύτιση των τελευταίων με διακριτές γεωγραφικές ενότητες. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα των συντελεστών Q που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.19 και αποτυπώνουν το ποσοστό συμμετοχής κάθε ομάδας στη διαμόρφωση της γενετικής δεξαμενής ολόκληρων των πληθυσμών. Με πολύ υψηλές τιμές Q (>80%) οι τέσσερις βασικοί πληθυσμοί (Ζαγόρι, Όσσα, Παρνασσίδα, Λαϊλιάς) αντιστοιχίζονται στις τέσσερις γενετικές ομάδες επιβεβαιώνοντας την αρχική μας υπόθεση περί διακριτών πληθυσμών στις περιοχές αυτές.

Για τον πληθυσμό της Όσσας σε μεγαλύτερο βαθμό, αλλά και για το πληθυσμό της Παρνασσίδας σε μικρότερο, μπορούμε να παρατηρήσουμε την απουσία έντονης ανάμιξης ακόμη και στην περίπτωση που οι πιθανές γενετικές ομάδες K είναι διαφορετικές από τις τέσσερις που επιλέχθηκαν (βλ. Εικόνα 2.3.21).

Πίνακας 2.3.18 : Μέσες τιμές πιθανοφάνειας [LnP(D)] και ΔK μετά από πέντε επαναληπτικές αναλύσεις για κάθε υποψήφιο αριθμό ομαδοποιήσεων K. SD: η τοπική απόκλιση της μέσης τιμής

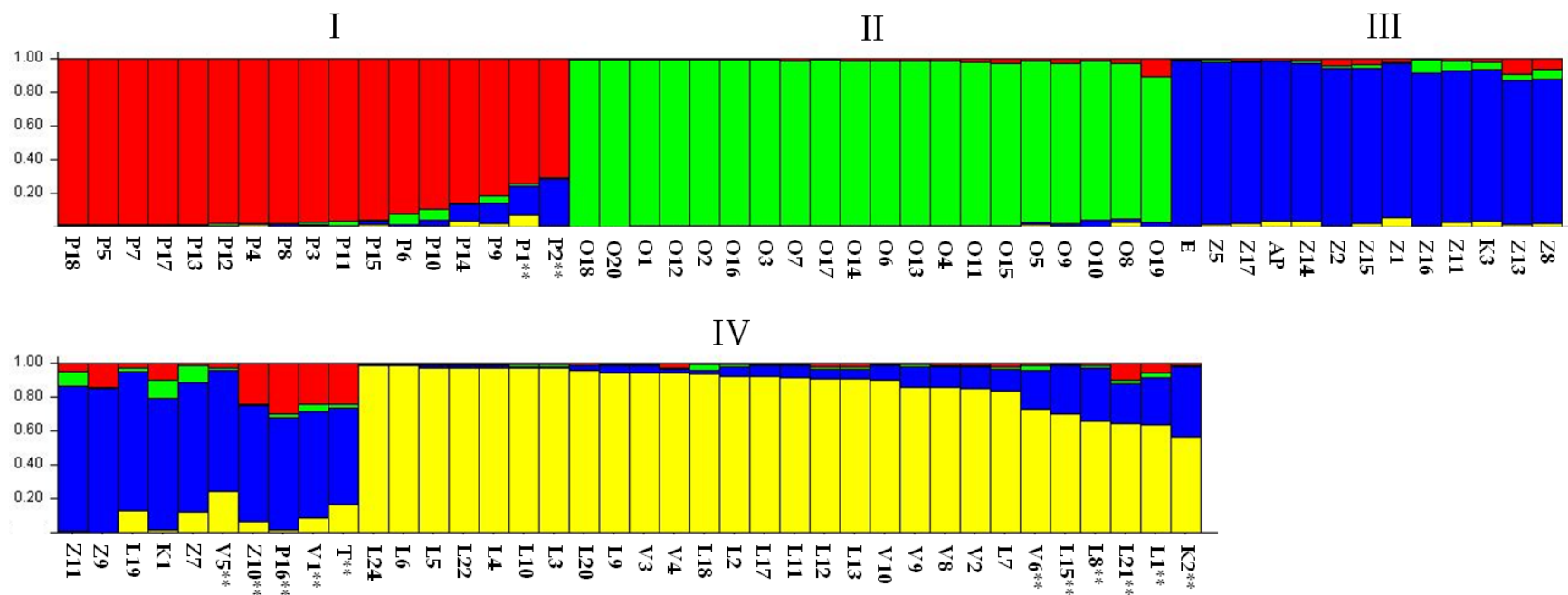
* με έντονη επισήμανση οι μεγαλύτερες τιμές

K	LnP(D)	SD	ΔK
1	-3143,50	0,26	
2	-2935,14	0,70	-
3	-2842,50	6,97	6,85
4	-2797,60	0,58	55,60
5	-2785,12	4,15	16,63
6	-2841,58	19,55	3,28
7	-2833,96	17,23	2,26
8	-2854,86	5,39	1,82
9	-2871,02	8,50	-

Πίνακας 2.3.19 : Αντιστοιχία των προσδιορισμένων με γεωγραφικά κριτήρια πληθυσμών και των ατόμων τους στις τέσσερις ομάδες (I,II,III,IV) που προέκυψαν από την ανάλυση STRUCTURE [n: ο αριθμός των ατόμων, με επισήμανση οι μεγαλύτερες τιμές]

* Η γεωγραφική περιοχή Β. Πίνδος περιλαμβάνει τις περιοχές Ζαγορίου, Άνω Πωγωνίου, Τζουμέρκων και Κόζιακα.

Γεωγραφική περιοχή	n	% ποσοστό συμμετοχής Q				n με έντονη ανάμειξη (q<75%)	αντιστοιχία n			
		Γενετικές ομάδες K					Γενετικές ομάδες K			
		I	II	III	IV		I	II	III	IV
Λαϊλιάς	21	1,5	1,1	12,1	85,3	4	-	-	1	16
Όσσα	20	1,6	96,8	1	0,6	0	-	20	-	-
Παρνασσίδα	18	88,5	1,8	8,3	1,4	3	15	-	-	-
Ζαγόρι	14	5	3,8	87,8	3,4	1	-	-	13	-
Καλάβρυτα	9	3,6	1,5	23,3	71,6	3	-	-	-	6
Κόζιακας	3	4,1	5,3	69,6	21	1	-	-	2	-
Άνω Πωγωνί	1	0,8	0,05	94,8	3,9	0	-	-	1	-
Τζουμέρκα	1	23,9	2,4	56,6	17,1	1	-	-	-	-
Ανατολική Ροδόπη	1	0,4	0,4	98,4	0,8	0	-	-	1	-
Β. Πίνδος*	19	5,6	3,8	83,7	6,9	3	-	-	16	-



Εικόνα 2.3.20 : Ιστόγραμμα (plot) των συντελεστών q . Κάθε στήλη, που αντιπροσωπεύει ένα άτομο (ο κωδικός δίνεται στη βάση της στήλης) διαχωρίζεται σε χρωματιστά τμήματα που αντιστοιχούν στο ποσοστό συμμετοχής κάθε ομάδας (I,II,III,IV) στον γονότυπο του ατόμου (q_1, q_2, q_3, q_4). Με αστερίσκο τα άτομα που εμφανίζουν έντονη ανάμειξη ($q_{max} < 0,75$).

Πίνακας 2.3.20: Οι εκτιμώμενες τιμές των συντελεστών συμμετοχής q για κάθε ένα από τα 88 άτομα σε κάθε ομάδα (I,II,III,IV).

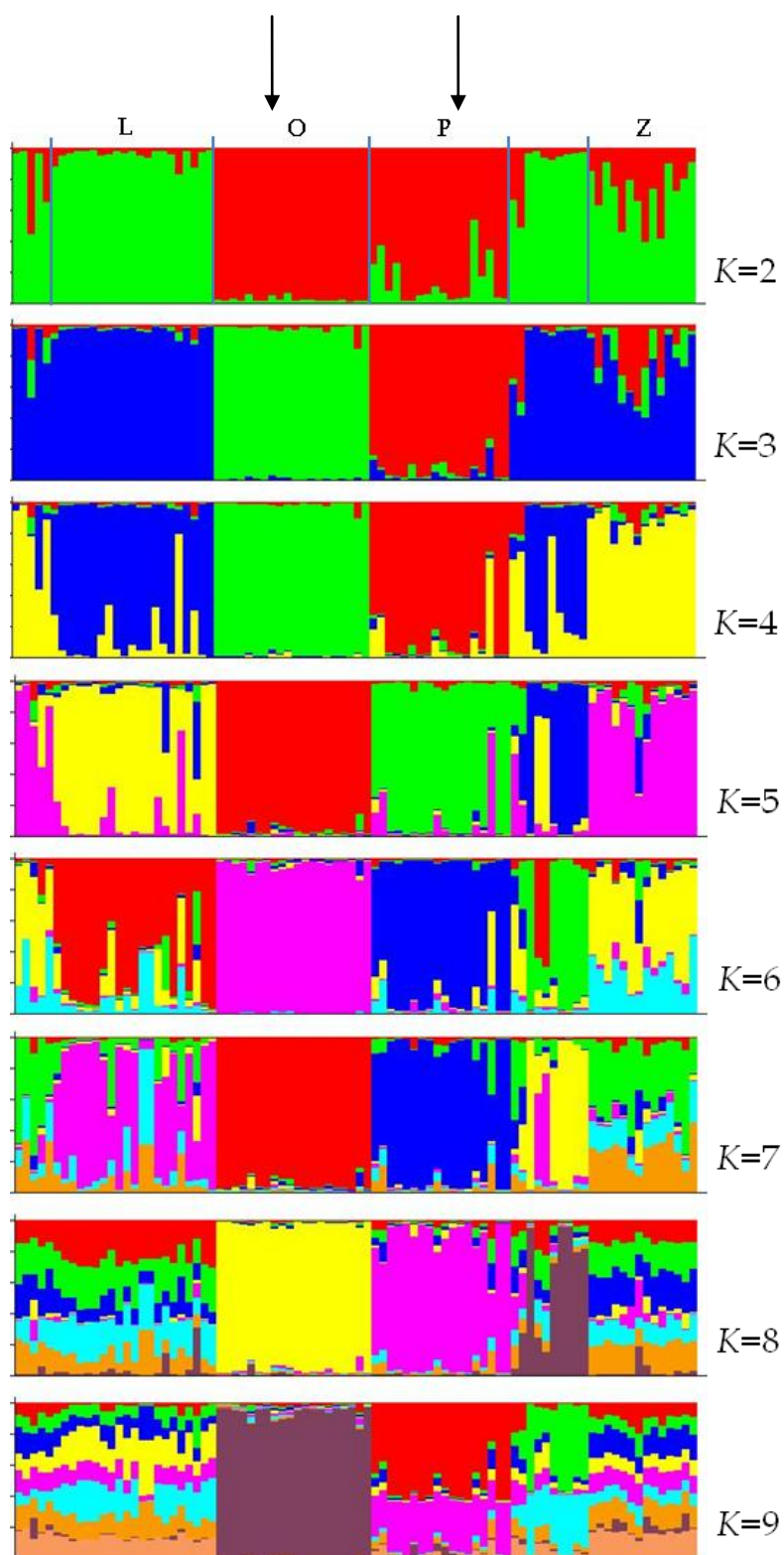
	I	II	III	IV
L1	0,05	0,03	0,28	0,64
L2	0,01	0,01	0,05	0,93
L3	0,01	0,01	0,01	0,97
L4	0,00	0,00	0,02	0,98
L5	0,01	0,00	0,01	0,98
L6	0,00	0,00	0,01	0,99
L7	0,02	0,01	0,13	0,84
L8	0,02	0,01	0,31	0,66
L9	0,01	0,00	0,04	0,95
L10	0,01	0,01	0,01	0,97
L11	0,01	0,00	0,07	0,92
L12	0,02	0,01	0,06	0,91
L13	0,02	0,01	0,06	0,91
L15	0,01	0,00	0,29	0,70
L17	0,01	0,01	0,06	0,92
L18	0,01	0,03	0,02	0,94
L19	0,02	0,02	0,82	0,14
L20	0,01	0,01	0,02	0,96
L21	0,09	0,02	0,24	0,65
L22	0,00	0,01	0,01	0,98
L24	0,00	0,00	0,01	0,99

	I	II	III	IV
O1	0,00	0,99	0,01	0,00
O2	0,01	0,98	0,01	0,00
O3	0,00	0,98	0,01	0,01
O4	0,01	0,98	0,01	0,00
O5	0,01	0,96	0,01	0,02
O6	0,01	0,98	0,01	0,00
O7	0,01	0,98	0,01	0,00
O8	0,02	0,93	0,02	0,03
O9	0,03	0,95	0,01	0,01
O10	0,02	0,94	0,04	0,00
O11	0,02	0,97	0,01	0,00
O12	0,00	0,99	0,01	0,00
O13	0,01	0,98	0,01	0,00
O14	0,01	0,98	0,01	0,00
O15	0,03	0,96	0,01	0,00
O16	0,01	0,98	0,01	0,00
O17	0,01	0,98	0,01	0,00
O18	0,00	0,99	0,01	0,00
O19	0,10	0,87	0,02	0,01
O20	0,01	0,99	0,00	0,00

	I	II	III	IV
P1	0,74	0,02	0,17	0,07
P2	0,70	0,01	0,28	0,01
P3	0,97	0,01	0,01	0,01
P4	0,98	0,00	0,01	0,01
P5	0,98	0,01	0,01	0,00
P6	0,92	0,07	0,01	0,00
P7	0,98	0,01	0,01	0,00
P8	0,97	0,01	0,01	0,01
P9	0,81	0,04	0,13	0,02
P10	0,89	0,06	0,04	0,01
P11	0,96	0,03	0,01	0,00
P12	0,98	0,01	0,01	0,00
P13	0,98	0,01	0,01	0,00
P14	0,85	0,01	0,10	0,04
P15	0,95	0,01	0,02	0,02
P16	0,30	0,02	0,66	0,02
P17	0,98	0,01	0,01	0,00
P18	0,99	0,00	0,01	0,00

	I	II	III	IV
Z1	0,02	0,01	0,91	0,06
Z2	0,04	0,02	0,93	0,01
Z5	0,01	0,01	0,97	0,01
Z7	0,01	0,11	0,76	0,12
Z8	0,06	0,06	0,86	0,02
Z9	0,14	0,01	0,85	0,00
Z10	0,24	0,01	0,68	0,07
Z11	0,05	0,08	0,86	0,01
Z12	0,01	0,06	0,90	0,03
Z13	0,09	0,03	0,86	0,02
Z14	0,01	0,01	0,94	0,04
Z15	0,03	0,02	0,92	0,03
Z16	0,01	0,07	0,91	0,01
Z17	0,01	0,01	0,96	0,02

	I	II	III	IV
AP	0,01	0,00	0,95	0,04
K1	0,09	0,11	0,78	0,02
K2	0,01	0,01	0,41	0,57
K3	0,02	0,04	0,90	0,04
T1	0,24	0,02	0,57	0,17
V1	0,24	0,04	0,63	0,09
V2	0,01	0,01	0,12	0,86
V3	0,01	0,00	0,04	0,95
V4	0,02	0,01	0,03	0,94
V5	0,02	0,01	0,72	0,25
V6	0,01	0,03	0,23	0,73
V8	0,01	0,01	0,12	0,86
V9	0,01	0,01	0,12	0,86
V10	0,01	0,01	0,08	0,90
E	0,00	0,00	0,99	0,01



Εικόνα 2.3.21 : Ιστογράμματα (plots) των συντελεστών q για όλους τους αριθμούς ομάδων K που ελέγχθηκαν.
 [L: Λαίλιαις, O: Όσσα, P: Παρνασσίδα, Z: Ζαγόρι]

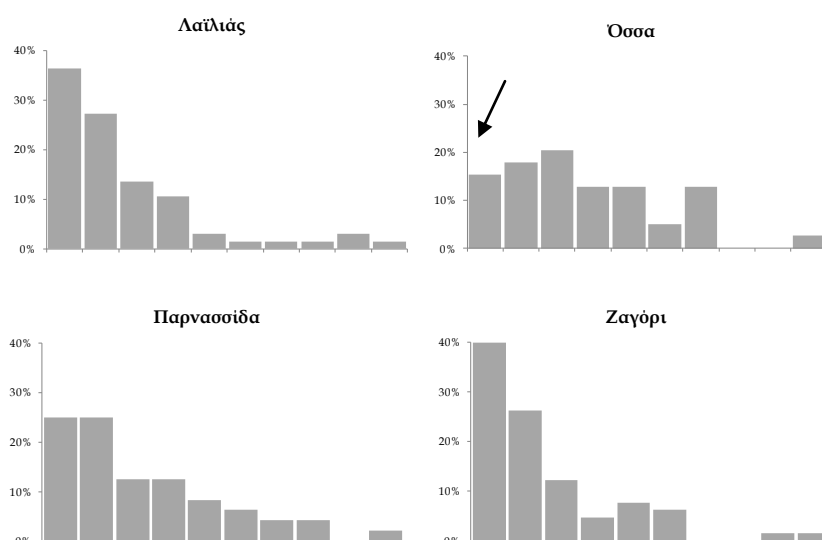
Διερεύνηση στενωπών

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τη διερεύνηση ύπαρξης στενωπών, που έγινε με το πρόγραμμα BOTTLENECK, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.21 και στην Εικόνα 2.3.22. Σύμφωνα με τον έλεγχο Wilcoxon, μόνο ο πληθυσμός της Όσσα παρουσιάζει στατιστικά σημαντικό ($P < 0,05$) πλεόνασμα ετεροζυγωτίας ($H_e > H_{eq}$) και επομένως το ενδεχόμενο διέλευσης από στενωπό. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγεί και ο ποιοτικός έλεγχος της κατανομής των αλληλικών συχνοτήτων. Πιο συγκεκριμένα, μόνο στην Όσσα τα αλληλόμορφα που ανήκουν στην πρώτη κλάση συχνοτήτων (παρουσιάζουν δηλαδή συχνότητες από 0 έως 10%) είναι λιγότερα από τα αλληλόμορφα που ανήκουν στις επόμενες ενδιάμεσες κλάσεις (δηλ. 10-20% και 20-30%). Το γεγονός αυτό δείχνει την απώλεια σπάνιων αλληλόμορφων (με συχνότητες $< 10\%$) που είναι χαρακτηριστικό των πληθυσμών που διήλθαν από στενωπό (Luikart *et al.* 1998).

Πίνακας 2.3.21 : Αποτελέσματα ελέγχων για στενωπούς

* Η εκτίμηση στηρίχθηκε σε 10000 επαναλήψεις (replications).

Πληθυσμός	Στατιστικός έλεγχος WILCOXON *	Ποιοτικός έλεγχος κατανομής αλληλικών συχνοτήτων	Στενωπός
Λαϊλιάς	$p=0,38043$ (NS)	normal L shape	-
Όσσα	$p=0,00232$	shifted mode	+
Παρνασσίδα	$p=0,15271$ (NS)	normal L shape	-
Ζαγόρι	$p=0,63232$ (NS)	normal L shape	-



Εικόνα 2.3.22 : Ποιοτικός έλεγχος κατανομής αλληλικών συχνοτήτων σε τέσσερις πληθυσμούς (στον οριζόντιο άξονα 10 κλάσεις συχνοτήτων από 0 έως 1).

4. Αποτελέσματα συσχετίσεων

Οι ανά ζεύγος έλεγχοι συσχέτισης παρουσιάζονται συνολικά στον Πίνακα 2.3.22. Όπως αναμενόταν, οι πίνακες αποστάσεων που υπολογίστηκαν με διάφορες μεθόδους αλλά στα πλαίσια του ίδιου μοριακού δείκτη (μιτοχονδριακού ή πυρηνικών) εμφανίζουν υψηλή και στατιστικά ισχυρή συσχέτιση ($p < 0,05$ - σκιασμένες περιοχές Πίνακα 2.3.22). Αντίθετα, οι «μιτοχονδριακές» και οι «πυρηνικές» αποστάσεις παρουσιάζουν χαμηλή ($r < 0,5$) και στατιστικά μη σημαντική ($p > 0,2$) συσχέτιση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την «ασυνέπεια» των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη του μιτοχονδριακού και του πυρηνικού DNA σε σχέση με τη διαφοροποίηση μεταξύ των τεσσάρων φυσικών πληθυσμών και επομένως την έλλειψη ενός κοινού προτύπου.

Όσον αφορά τις συσχετίσεις γεωγραφικών και γενετικών αποστάσεων, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ελληνικοί πληθυσμοί του ζαρκαδιού δεν φαίνεται να ακολουθούν το πρότυπο της «απομόνωσης λόγω απόστασης» (Isolation by distance) αφού κανένας πίνακας γενετικών αποστάσεων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον πίνακα των γεωγραφικών αποστάσεων.

Πίνακας 2.3.22 : Αποτελέσματα συσχετίσεων με Mantel test

Στον κάτω τριγωνικό πίνακα οι συντελεστές συσχέτισης (r) και στο άνω τριγωνικό πίνακα οι τιμές σημαντικότητας (p).

		mtDNA				nDNA			
		$\Phi_{ST} n$	$\Phi_{ST} TrN$	p	$d TrN93$	F_{ST}	D_c	D	geodist
mtDNA	$\Phi_{ST} n$		0,04	0,03	0,04	0,22	0,49	0,37	0,43
	$\Phi_{ST} TrN$	0,99 *		0,05	0,05	0,21	0,49	0,3	0,42
	p	0,95 *	0,92 *		0,04	0,26	0,45	0,43	0,47
	$d TrN93$	0,94 *	0,92 *	1 *		0,27	0,47	0,38	0,42
nDNA	F_{ST}	0,44	0,47	0,37	0,37		0,01	0,04	0,38
	D_c	0,14	0,21	0,05	0,08	0,98*		0,05	0,41
	D	0,36	0,43	0,27	0,28	0,92*	0,98*		0,39
	geodist	0,07	0,12	-0,16	-0,15	-0,1	0,21	0,28	

$\Phi_{ST} n$: Πίνακας ανά ζεύγος Φ_{ST} υπολογισμένων με βάση τον αριθμό των συσσωρευμένων μεταλλαγών

$\Phi_{ST} TrN$: Πίνακας ανά ζεύγος Φ_{ST} υπολογισμένων με βάση τις γενετικές αποστάσεις υπό το μοντέλο TrN93

p : Πίνακας ανά ζεύγος γενετικών αποστάσεων (p distances).

$d TrN93$: Πίνακας ανά ζεύγος γενετικών αποστάσεων ($d TrN93$ distances)

F_{ST} : Πίνακας ανά ζεύγος F_{ST} υπολογισμένων με βάση τους Weir και Cockerham (1984),

D_c : Πίνακας ανά ζεύγος γενετικών αποστάσεων D_c (Cavalli-Sforza & Edwards 1967)

D : Πίνακας ανά ζεύγος γενετικών αποστάσεων D (Nei 1972)

geodist : Πίνακας γεωγραφικών αποστάσεων

Όλοι οι πίνακες αφορούν μόνο τους τέσσερις βασικούς πληθυσμούς

Συζήτηση

Φυλογεωγραφία του ζαρκαδιού - η θέση του ελληνικού ζαρκαδιού

Η φυλογεωγραφία του ζαρκαδιού έχει έως τώρα μελετηθεί από πέντε ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες (Wiehler & Tiedemann 1998, Vernesi *et al.* 2002, Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006, Royo *et al.* 2007). Ο αριθμός και η γεωγραφική διασπορά των πληθυσμών, η ένταση της δειγματοληψίας (αριθμός δειγμάτων) αλλά και η ποιότητα και ποσότητα της γενετικής πληροφορίας (είδος και αριθμός δεικτών, μήκος αλληλουχιών) που χρησιμοποιήθηκαν ποικίλουν ανά περίπτωση και οδήγησαν σε διάφορες εκτιμήσεις τόσο του αριθμού και της θέσης των πιθανών καταφυγίων όσο κυρίως των οδών επανεποίκισης μετά την τελευταία παγετώδη περίοδο. Οι ερευνητές στις μοναδικές μελέτες που περιελάμβαναν δείγματα από την Ελλάδα (Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ελληνικοί πληθυσμοί ομαδοποιούνται σε έναν κλάδο και θα πρέπει να θεωρούνται αντιπροσωπευτικοί υπολειμματικοί πληθυσμοί της τελευταίας παγετώδους περιόδου, που χρήζουν διατήρησης και προστασίας από γενετική ανάμιξη.

Καθώς όμως οι πρότερες μελέτες βασίστηκαν σε περιορισμένο αριθμό δειγμάτων από ελάχιστες τοποθεσίες στον ελλαδικό χώρο, σημαντικό προς διερεύνηση ερώτημα που τέθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν κατά πόσο μια πιο εντατική γενετική ανάλυση του ελληνικού ζαρκαδιού, με τη συγκέντρωση περισσότερων και γεωγραφικά αντιπροσωπευτικότερων δειγμάτων θα ενίσχυε το συγκεκριμένο συμπέρασμα ή αν θα μπορούσε να αποκαλύψει διαφορετικά φυλογεωγραφικά πρότυπα. Σε αντίστοιχη μελέτη οι Royo *et al.* (2007) εστιάζοντας στην ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων εντός της Ιβηρικής χερσονήσου ανακάλυψαν έναν νέο κλάδο (ομάδα απλοτύπων), που εμφάνιζε περιορισμένη γεωγραφική κατανομή στην βορειοδυτική Ισπανία. Το εύρημα αυτό τους οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης περί ύπαρξης δύο ανεξάρτητων καταφυγίων στην Ιβηρική χερσόνησο και στον εντοπισμό πληθυσμών που χρήζουν ιδιαίτερης διαχειριστικής προσοχής.

Η φυλογεωγραφική ανάλυση της παρούσας μελέτης στηρίχθηκε στη συνδυαστική χρήση των δημοσιευμένων απλοτύπων της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA των Randi *et al.* (2004) και των απλοτύπων που προέκυψαν από τη δειγματοληψία ζαρκαδιών σε εννέα περιοχές της Ελλάδας. Όπως φαίνεται από το δίκτυο απλοτύπων (βλ Εικόνα 2.3.2, σελ. 83) το βασικό πρότυπο που προκύπτει υποστηρίζει την ύπαρξη τεσσάρων διακριτών ομάδων απλοτύπων στο ζαρκάδι, των τριών μεγάλων που είχαν αναφερθεί ως Κεντρικός, Ανατολικός και Δυτικός κλάδος (Randi *et al.* 2004) και ενός μικρότερου με μόλις δύο απλότυπους τον οποίο και ονομάσαμε Ιβηρικό, λόγω της αποκλειστικής εκπροσώπησης του στην Ιβηρική χερσόνησο. Η παρουσία των τριών κύριων γενεαλογικών γραμμών εντός του είδους έχει

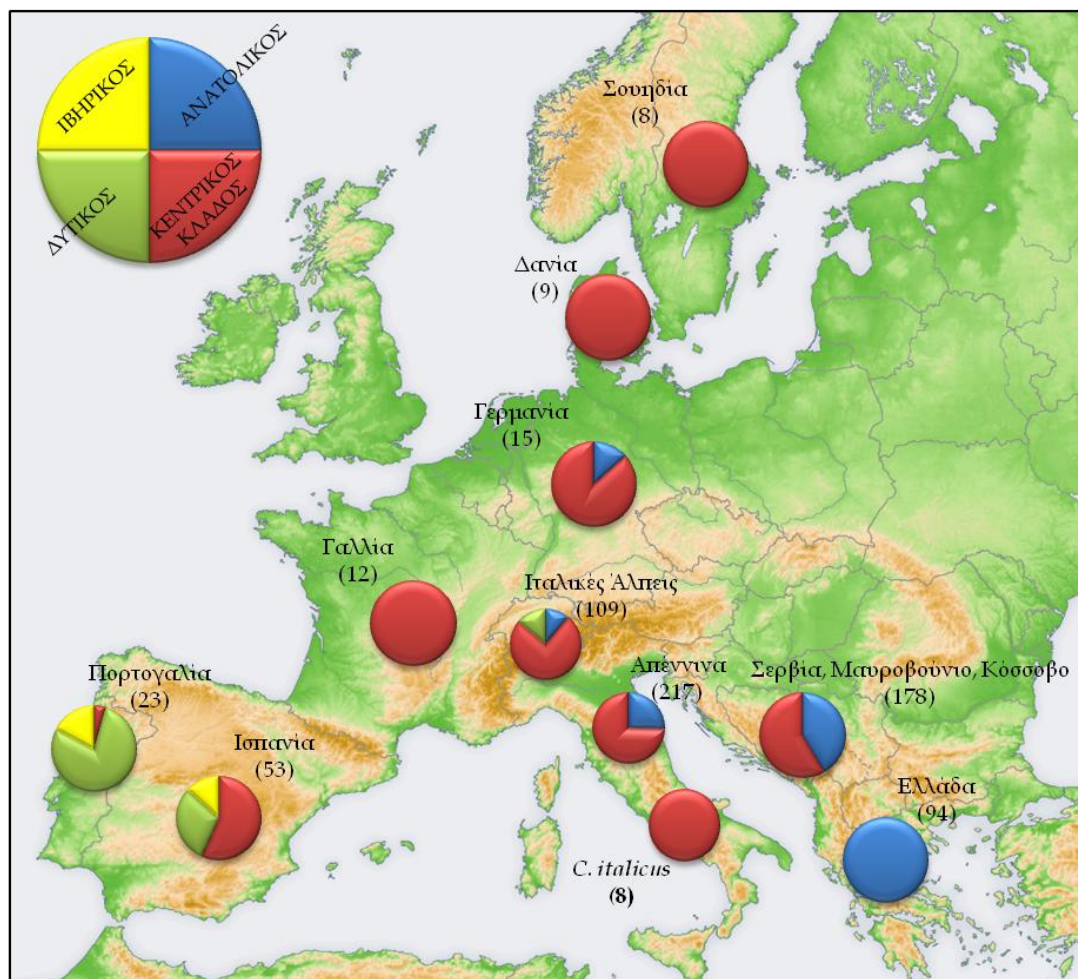
υποστηριχθεί σχεδόν από όλες τις προηγούμενες μελέτες (Vernesi *et al.* 2002, Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006, Royo *et al.* 2007) και δείχνει ότι το ζαρκάδι επανεποίκισε την Ευρώπη από πολλαπλά καταφύγια και όχι μόνο από ένα δυτικό μεσογειακό καταφύγιο όπως είχε προταθεί αρχικά από τους Wiehler & Tiedemann (1998).

Ο Δυτικός κλάδος περιλαμβάνει απλότυπους που βρέθηκαν τόσο στην Ιταλικές Άλπεις όσο κυρίως στην Ισπανία και την Πορτογαλία. Η διαφοροποίηση του συγκεκριμένου κλάδου από τους υπόλοιπους οφείλεται στην απομόνωση πληθυσμών του είδους κατά τις παγετώδεις περιόδους στο καταφύγιο της ιβηρικής χερσονήσου (Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006, Royo *et al.* 2007). Η απουσία απλοτύπων του Δυτικού κλάδου στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη είναι ενδεικτική της έλλειψης σημαντικών ρευμάτων επανεποίκισης μετά την τελευταία παγετώδη περίοδο (σε συμφωνία με Randi *et al.* 2004, Lorenzini & Lovari 2006 & Sommer *et al.* 2009). Τα Πυρηναία όρη φαίνεται ότι αποτέλεσαν σημαντικό φράγμα για την προς βορά διασπορά του ζαρκαδιού. Οι απλότυποι του Δυτικού κλάδου που βρέθηκαν στις ιταλικές Άλπεις θα μπορούσαν να θεωρηθούν προγονικοί ή το αποτέλεσμα φυσικής εξάπλωσης από την ιβηρική χερσόνησο προς την ιταλική αμέσως μετά το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου. Εντός της ιβηρικής χερσονήσου εντοπίσαμε μια μικρή ομάδα απλοτύπων (Ιβηρικός κλάδος) που εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το Δυτικό κλάδο και περιορίζεται γεωγραφικά μόνο στην Ισπανία και την Πορτογαλία. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ενισχύει την υπόθεση περισσότερων του ενός καταφυγίων για το είδος σε αυτή την περιοχή (Royo *et al.* 2007).

Ο Ανατολικός κλάδος περιορίζεται γεωγραφικά στην νοτιοανατολική Ευρώπη και περιλαμβάνει απλότυπους που βρέθηκαν κυρίως στην Ελλάδα, στη Σερβία, στο Μαυροβούνιο και στο Κόσοβο, αλλά και στην Ιταλία (Αππέννινα και Άλπεις) και στη Γερμανία (βλ. Εικόνα 2.4.1). Ο κλάδος αυτός αποτελεί μια διακριτή εξελικτική γραμμή εντός του είδους που πρέπει να διαφοροποιήθηκε από τους υπόλοιπους ως συνέπεια της απομόνωσης πληθυσμών του ζαρκαδιού στη βαλκανική χερσόνησο κατά τις παγετώδεις περιόδους (Randi *et al.* 2004). Η καθολική αντιστοιχισή των απλοτύπων του ελληνικού ζαρκαδιού στον κλάδο αυτό ενισχύει τη συγκεκριμένη πρόταση.

Η βαλκανική χερσόνησος και κυρίως το νότιο τμήμα της, έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα βασικά καταφύγια κατά την τελευταία παγετώδη περίοδο για πολλά είδη ζώων συμπεριλαμβανομένων αρκετών θηλαστικών (ενδεικτικά βλ. Bilton *et al.* 1998, Hewitt 2000, Σωτηρόπουλος 2004, Sommer & Nadachowski 2006, Randi 2007, Αντωνίου 2008). Παλυνολογικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι κατά την περίοδο αυτή η βλάστηση σε μεσαία υψόμετρα χαρακτηριζόταν από την ύπαρξη εύκρατων φυλλοβόλων δασών (αμιγή ή μεικτά με δάση κωνοφόρων) (Tzedakis 2004), δηλαδή ενδιαιτημάτων που θεωρούνται ιδανικά για το ζαρκάδι. Απτές αποδείξεις, εξάλλου, της παρουσίας του είδους στην περιοχή κατά τις

παγετώδεις περιόδους έδωσε η ραδιοχρονολόγηση σκελετικού υλικού που βρέθηκε σε παλαιοντολογικές έρευνες (βλ. Sommer *et al.* 2006, 2009).



Εικόνα 2.4.1 : Γεωγραφική κατανομή των κύριων γενεαλογικών γραμμών (κλάδων) του ζαρκαδιού για την περιοχή ελέγχου του μιτοχondριακού DNA. Σε παρένθεση ο αριθμός των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε γεωγραφική περιοχή (από Randi *et al.* 2004 και παρούσα μελέτη).

Ο εντοπισμός αποτύπων του Ανατολικού κλάδου σε περιοχές εκτός των Βαλκανίων θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στη φυσική εξάπλωση πληθυσμών του ζαρκαδιού μέσω συγκεκριμένων οδών διασποράς είτε στις πιο πρόσφατες και εντατικές μετατοπίσεις ζαρκαδιών για την ενίσχυση θηραματικών αποθεμάτων. Κατά το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου (21-14,5 ky BP) η υποχώρηση της στάθμης της Μεσογείου κατά 100-120 μέτρα δημιούργησε πολυάριθμες γέφυρες ξηράς (Εικόνα 2.4.2), οι οποίες επέτρεψαν την επικοινωνία μεταξύ γεωγραφικά απομονωμένων ζωικών πληθυσμών (ενδεικτικά βλ. Lucchini

& Randi 1998, Filippucci *et al.* 2002, Randi 2007). Η γέφυρα μεταξύ της ιταλικής και της βαλκανικής χερσονήσου στη βόρεια Αδριατική, η ύπαρξη της οποίας έχει τεκμηριωθεί από παλυνολογικά και στρωματογραφικά δεδομένα (Reyment 1983, van Andel & Tzedakis 1996), ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε από πληθυσμούς ζαρκαδιών των Βαλκανίων που κινήθηκαν προς τη βόρεια Ιταλία αμέσως μετά το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου. Η παροδική αυτή σύνδεση των δύο χερσονήσων μπορεί να ερμηνεύσει την παρουσία κάποιων απλοτόπων του ανατολικού κλάδου στα Απέννινα και στις Ιταλικές Άλπεις. Αντίστοιχες φυλογεωγραφικές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί προκειμένου να εξηγήσουν την κοινή κατανομή μιτοχονδριακών απλοτόπων του λαγού (*Lepus europaeus*) στην Ιταλία και την Ελλάδα (Kasapidis *et al.* 2005, Stamatidis *et al.* 2009). Δεν θα πρέπει, ωστόσο, να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο η ύπαρξη απλοτόπων του ανατολικού κλάδου του ζαρκαδιού εκτός της γεωγραφικής ενότητας των Βαλκανίων να αποτελεί τη συνέπεια πρόσφατων ανθρωπόχρων μετακινήσεων. Είναι τεκμηριωμένη η μεταφορά και απελευθέρωση ζαρκαδιών με βαλκανική προέλευση σε περιοχές της Ιταλίας και της Γερμανίας τα τελευταία 150 χρόνια, στα πλαίσια προγραμμάτων ενίσχυσης τρωτών πληθυσμών ή επανεισαγωγής του είδους σε περιοχές όπου είχε πρόσφατα εξαφανιστεί (Niethammer 1963, Randi *et al.* 2004, Gentile 2009).



Εικόνα 2.4.2 : Γέφυρες ξηράς (βλ. βέλη) κατά το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου (21-14,5 ky BP) στη Μεσόγειο. Με διαγράμμιση η θέση των σημαντικών παγετώνων.

Πηγή: Randi 2007

Εντός του Ανατολικού κλάδου δεν παρατηρήθηκε κάποια περαιτέρω ομαδοποίηση των απλοτύπων, η οποία να υποδηλώνει την ύπαρξη ανεξάρτητων γενεαλογικών γραμμών με σαφή γεωγραφική προέλευση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3.3 (σελ. 84), οι πολύπλοκες σχέσεις μεταξύ των απλοτύπων δεν επιτρέπουν την περιγραφή κάποιου ιδιαίτερου φυλογεωγραφικού προτύπου. Σε αντίθεση με την Ιβηρική και την Ιταλική χερσόνησο (βλ. Lorenzini *et al.* 2002, 2003, Randi *et al.* 2004, Royo *et al.* 2007) εντός των Βαλκανίων δεν φαίνεται να υπήρξαν σημαντικές απομονώσεις, οι οποίες να οδήγησαν σε διαφοροποιημένες εξελικτικές γραμμές. Η μακράιωνη διατήρηση πληθυσμών του ζαρκαδιού με μεγάλο δραστικό μέγεθος και κυρίως η δυνατότητα απρόσκοπτης επικοινωνίας μεταξύ τους τόσο κατά τις παγετώδεις όσο και κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους είναι δυνατόν να εξηγήσει την απουσία βικαριανιστικών φαινομένων εντός της βαλκανικής χερσονήσου.

Ακόμη και αν υπήρξαν στο παρελθόν πληθυσμοί που απομονώθηκαν σε διακριτές γεωγραφικές περιοχές μέσα στα Βαλκάνια, οι απομονώσεις αυτές δεν ήταν αρκετά παλιές και μεγάλης διάρκειας για να οδηγήσουν σε σημαντικές φυλογενετικές αποκλίσεις, ικανές να ανιχνευθούν από την ανάλυση του μοριακού δείκτη που χρησιμοποιήσαμε, δηλαδή της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA. Έχει προταθεί ότι η γενετική διαφοροποίηση του μιτοχονδριακού DNA των μετα-παγετωνικών πληθυσμών προήλθε ως αποτέλεσμα της διαλογής γενεών (lineage sorting) δηλαδή της διαλογής προϋπαρχόντων απλοτύπων και όχι εξαιτίας της δημιουργίας νέων μεταλλάξεων (Avise 2000). Με άλλα λόγια ο διαχωρισμός των πληθυσμών μπορεί να είναι πολύ πρόσφατος ώστε να αντανακλάται σε διαφορές των μιτοχονδριακών αλληλουχιών. Η ανάλυση μικροδορυφορικών δεικτών καθώς και η αξιοποίηση παλαιοντολογικών δειγμάτων για την εξαγωγή αρχαίου DNA, είναι δυνατόν να συμβάλουν ουσιαστικότερα στη διερεύνηση των φυλογεωγραφικών προτύπων και την αποκάλυψη της πρόσφατης εξελικτικής ιστορίας των βαλκανικών πληθυσμών του ζαρκαδιού.

Ο Κεντρικός κλάδος περιλαμβάνει απλότυπους με πανευρωπαϊκή εξάπλωση, με εξαίρεση την Ελλάδα. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύει τις υποθέσεις των Sommer *et al.* (2009) για τις κύριες οδούς επανεποίκισης της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης μετά το τέλος της τελευταίας περιόδου. Σύμφωνα με το φυλογεωγραφικό σενάριο που πρότειναν οι συγκεκριμένοι ερευνητές, ο κεντρικός κλάδος δεν έχει προέλευση από τα Βαλκάνια όπως είχαν υποθέσει οι Randi *et al.* (2004). Αντίθετα, η εξάπλωση του ζαρκαδιού μετά την υποχώρηση των παγετώνων προήλθε από ένα ή περισσότερα καταφύγια της ανατολικής Ευρώπης (Καρπάθια ή ανατολικότερα, Lorenzini & Lovari 2006). Τα μεταναστευτικά κύματα από την ανατολή προς τη δύση πρέπει να παρεμπόδισαν τη βόρεια εξάπλωση των βαλκανικών πληθυσμών, οι οποίοι παρέμειναν περιορισμένοι στη θέση του καταφυγίου τους (βλ. Εικόνα 2.1.1, σελ 38). Στα βόρεια Βαλκάνια, επομένως, θα πρέπει να σχηματίστηκε μια ζώνη επαφής δύο κλάδων (κεντρικού και ανατολικού). Πράγματι, οι πληθυσμοί στην περιοχή

αυτή εμφανίζουν σημαντική γενετική ανάμειξη όπως έδειξε η κατανομή των απλοτύπων στη Σερβία το Κόσοβο και το Μαυροβούνιο (βλ. Εικόνα 2.4.1).

Το ζαρκάδι έχει αδιάλειπτη παρουσία στην Ελλάδα τουλάχιστον από το ανώτερο Πλειστόκαινο και η κατανομή του υπήρξε μέχρι το πρόσφατο παρελθόν εκτεταμένη σε ολόκληρο τον ηπειρωτικό κορμό αλλά και σε μερικά νησιά (Κρήτη, Κέρκυρα) για μεγάλα χρονικά διαστήματα (βλ. Γενική Εισαγωγή). Το γεγονός ότι στο σύνολό τους οι απλότυποι που βρέθηκαν στους ελληνικούς πληθυσμούς εντάσσονται σε μία μόνο γενεαλογική γραμμή (Ανατολικός κλάδος) υποστηρίζει τη μονοφυλετικότητα του ελληνικού ζαρκαδιού. Επιπλέον, οι ελληνικοί πληθυσμοί δεν φαίνεται να υπέστησαν γενετική ανάμειξη λόγω ανεξέλεγκτων απελευθερώσεων για θηραματικούς σκοπούς. Ακόμη και αν κάτι τέτοιο συνέβη η προέλευση των ζώων θα έπρεπε να ήταν από πληθυσμούς που ανήκαν αποκλειστικά στον ανατολικό κλάδο. Με βάση τα δεδομένα αυτά τα ελληνικά ζαρκάδια θα πρέπει να θεωρούνται αντιπροσωπευτικά κατάλοιπα αρχέγονων πληθυσμών των Βαλκανίων (*relicts*), με ιστορία που ενδεχομένως ανάγεται πριν από την τελευταία παγετώδη περίοδο.

Η μακράιωνη απομόνωση και η σημαντική γενετική διαφοροποίηση των ελληνικών πληθυσμών από τους αυτόχθονες πληθυσμούς του είδους των άλλων καταφυγίων εύλογα εγείρει το ερώτημα αν και στα Βαλκάνια υπάρχει μια διακριτή ταξινομική μονάδα (στο επίπεδο του υποείδους), αντίστοιχη με αυτές που έχουν χαρακτηριστεί στην Ιταλία (*C. c. italicus* βλ. Gentile 2009) και την Ισπανία (*C. c. garganta* βλ. Lorenzini *et al.* 2003). Δυστυχώς καμία μελέτη της μορφολογίας του βαλκανικού ζαρκαδιού δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, με αποτέλεσμα να αγνοούμε αν υπάρχουν διαγνωστικοί μορφολογικοί χαρακτήρες που επιτρέπουν μια τέτοια διάκριση.

Η γενετική ποικιλότητα του ελληνικού ζαρκαδιού

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η εκτίμηση του εύρους και της κατανομής της γενετικής ποικιλότητας του ελληνικού ζαρκαδιού με βάση την ποικιλομορφία τόσο της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA όσο και δεκατεσσάρων μικροδορυφορικών γενετικών τόπων. Σε μια προσπάθεια αντιπροσωπευτικής -κατά το δυνατόν- περιγραφής της γενετικής ποικιλότητας συγκεντρώσαμε τον κύριο όγκο των δειγμάτων από τέσσερις περιοχές, για τις οποίες πιστεύαμε ότι συντηρούν σημαντικούς πληθυσμούς (Όσσα, Παρνασσίδα, Λαϊλιάς, Ζαγόρι) καθώς και σποραδικά δείγματα από τέσσερις ακόμη περιοχές φυσικής εξάπλωσης του είδους στην Ελλάδα. Τέλος, δείγματα ελήφθησαν και από τον εκτρεφόμενο πληθυσμό των Καλαβρύτων, ο οποίος δημιουργήθηκε πριν από δύο δεκαετίες

με τη μεταφορά ζαρκαδιών από τη βόρεια Ελλάδα σε μια περιορισμένη και περιφραγμένη έκταση.

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των δειγμάτων, φαίνεται ότι το ελληνικό ζαρκάδι παρουσιάζει αξιοσημείωτη ποικιλότητα. Πιο συγκεκριμένα σε μόλις 80 δείγματα από εννιά περιοχές αναγνωρίστηκαν 21 διαφορετικοί απλότυποι της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA ή αλλιώς ένας απλότυπος ανά 3,8 άτομα που αλληλουχήθηκαν. Η τιμή της απλοτυπικής ποικιλότητας η οποία υπολογίστηκε ($Hd=0,90$) είναι από τις πλέον υψηλές τιμές μεταξύ αυτών που έχουν αναφερθεί σε αντίστοιχης γεωγραφικής κλίμακας έρευνες σημαντικών περιοχών εξάπλωσης του είδους, όπως η Ισπανία, (0,75 - Lorenzini *et al.* 2003, 0,28 - Royo *et al.* 2007), η Ιταλία (0,93 - Randi *et al.* 1998b, 0,72 - Lorenzini *et al.* 2002) και η Μ. Βρετανία (0,76 - Baker 2011). Η υψηλή τιμή της απλοτυπικής ποικιλότητας είναι ενδεικτική ενός ιστορικά μεγάλου δραστικού μεγέθους του συνολικού πληθυσμού (Avisé 2000) και επιβεβαιώνει την επί μακρόν επιβίωση του ζαρκαδιού στον ελλαδικό χώρο. Η νουκλεοτιδική ποικιλότητα είναι πολύ χαμηλή ($\pi=0,75\%$), χαμηλότερη από τιμές που έχουν αναφερθεί για την Ισπανία (1,2% - Royo *et al.* 2007) και την Ιταλία (1,1% - Randi *et al.* 1998b), αλλά υψηλότερη σε σχέση με την Μ. Βρετανία (0,57% - Baker 2011). Το γεγονός της ύπαρξης χαμηλής νουκλεοτιδικής αφενός και υψηλής απλοτυπικής ποικιλότητας αφετέρου στο ελληνικό ζαρκάδι δείχνει ότι στην περιοχή εξελίχθηκαν διάφορες γενεαλογικές γραμμές για το μιτοχονδριακό DNA, οι οποίες όμως έχουν πρόσφατη κοινή καταγωγή («ρηχή» γενεαλογία)(Avisé 2000).

Όσον αφορά στην ποικιλότητα των 14 μικροδορυφορικών τόπων, σε σύνολο 88 δειγμάτων από 9 περιοχές βρέθηκαν 95 αλληλόμορφα, που μεταφράζονται σε εκτιμώμενη αλληλική ποικιλότητα $A=6,8$ αλληλόμορφα ανά γενετικό τόπο. Η τιμή αυτή εντάσσεται εντός του εύρους τιμών που έχουν αναφερθεί σε άλλες περιοχές. Ενδεικτικά παραθέτουμε εκτιμήσεις από τη Σκανδιναβική χερσόνησο ($A=6,7$ - Thulin 2006), την Ισπανία ($A=10,4$ - Royo *et al.* 2007), την Ολλανδία ($A=3,9$ - Postma *et al.* 2001), τη Μ. Βρετανία ($A=10,1$ - Baker 2011). Αν και η απευθείας σύγκριση δημοσιευμένων τιμών γενετικής ποικιλότητας που έχουν προκύψει με διαφορετική μεθοδολογία (π.χ. αριθμός και είδος γενετικών τόπων, μήκος αλληλουχιών) και ένταση δειγματοληψίας (π.χ. αριθμός πληθυσμών και δειγμάτων από κάθε περιοχή) θα πρέπει να γίνεται με επιφύλαξη, θεωρούμε ότι τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι ενδεικτικά της ύπαρξης υψηλής ποικιλότητας στη γενετική δεξαμενή του ελληνικού ζαρκαδιού.

Σημαντικό στοιχείο που αθροίζεται υπέρ της συγκεκριμένης διαπίστωσης, ανεξάρτητα από συγκρίσεις, είναι ο αριθμός ιδιωτικών απλοτύπων (85,7%) και αλληλομόρφων (24,2%). Πέραν της πληροφορίας που παρέχουν οι τιμές αυτές για τη δομή και τη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών (θέματα που συζητούνται εκτεταμένα στη συνέχεια), αποτελούν επίσης σαφείς ενδείξεις υψηλής ποικιλότητας της γενετικής δεξαμενής

του ελληνικού ζαρκαδιού. Στις κύριες περιοχές δειγματοληψίας εντοπίστηκε μεγάλος αριθμός μοναδικών απλοτύπων και αλληλομόρφων, γεγονός που μας επιτρέπει να υποθέσουμε την ύπαρξη και νέων, διαφορετικών σε άλλους σημαντικούς πληθυσμούς του ζαρκαδιού στην Ελλάδα (π.χ. σε Ροδόπη, Δυτική Μακεδονία, Όλυμπο, Έβρο, Χερσόνησο Άθω) για τους οποίους δεν συγκεντρώθηκαν δείγματα. Προς επίρρωση της υπόθεσης αυτής έρχεται ο εντοπισμός ιδιωτικών απλοτύπων στον πληθυσμό των Καλαβρύτων, που όπως αναφέρθηκε προήλθε από τη μεταφορά ατόμων κυρίως από την περιοχή της Κοζάνης και της Αλεξανδρούπολης. Ακόμη και σε περιοχές όπου συλλέχθηκαν ελάχιστα δείγματα, όπως στον Κόζιακα και στην Ανατολική Ροδόπη, ανιχνεύθηκαν νέοι μοναδικοί απλότυποι. Ανάλογη είναι η εικόνα και για τα αλληλόμορφα των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων, δηλαδή στα λιγοστά δείγματα εκτός των κύριων περιοχών δειγματοληψίας ανακαλύφθηκαν νέα, ιδιωτικά αλληλόμορφα. Αν λοιπόν ληφθεί υπόψη η ένταση και η έκταση της δειγματοληψίας στην παρούσα μελέτη, τότε μπορούμε εύλογα να συμπεράνουμε ότι δεν έγινε κατορθωτό να περιγραφεί το σύνολο της υπάρχουσας ποικιλότητας στον ελληνικό χώρο.

Αν εστιάσουμε, ωστόσο, στις τέσσερις βασικές περιοχές δειγματοληψίας (Όσσα, Παρνασσίδα, Ζαγόρι, Λαϊλιάς) τότε η ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλότητα των τοπικών πληθυσμών θα μπορούσε να χαρακτηριστεί από μέτρια έως χαμηλή. Οι τιμές της απλοτυπικής ποικιλότητας ($Hd=0,21-0,66$), για παράδειγμα, είναι αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με αυτές που έχουν αναφερθεί από τους Randi *et al.* (2004) σε πληθυσμούς του είδους στη Σερβία (0,80-0,97), στη Γερμανία (0,91), τη Γαλλία (0,94), την Ιταλία (0,28-0,94), την Ισπανία (0,83) και τη Δανία (0,80). Ως προς τους δείκτες ποικιλότητας που υπολογίστηκαν για το πυρηνικό DNA, οι τιμές των ελληνικών πληθυσμών είναι εντός του εύρους των δημοσιευμένων τιμών, αλλά σε καμία περίπτωση μεταξύ των υψηλότερων (βλ. Πίνακα 2.4.1).

Το φυλογεωγραφικό μοντέλο των νότιων καταφυγίων (Hewitt 2000) υπαγορεύει ότι η γενετική ποικιλότητα πρέπει να είναι γενικά υψηλότερη στους πληθυσμούς των ειδών που επέζησαν σε αυτά, σε αντίθεση με τις περιοχές επανεποίκισης της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης, όπου τα ιδρυτικά φαινόμενα κατέστησαν τους πρόσφατα (μετά την υποχώρηση των παγετώνων) εγκαθιδρυμένους πληθυσμούς γενετικά λιγότερο ποικιλόμορφους. Οι Randi *et al.* 2004 -σε συμφωνία με το συγκεκριμένο μοντέλο- διαπίστωσαν πως οι πληθυσμοί του ζαρκαδιού που ζουν στα βορειοδυτικά Βαλκάνια (Σερβία, Κόσσοβο, Μαυροβούνιο) παρουσιάζουν τις μέγιστες τιμές γενετικής ποικιλότητας μεταξύ όλων των πληθυσμών που μελέτησαν σε ολόκληρη σχεδόν την Ευρώπη. Το γεγονός ότι η Ελλάδα φαίνεται να αποτέλεσε ένα από τα σημαντικά καταφύγια για το είδος κατά τις παγετώδεις περιόδους, καθιστά θεωρητικά αναμενόμενη την υπόθεση υψηλής ποικιλότητας και στους ελληνικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ωστόσο, δεν φαίνεται να επιβεβαιώνουν κάτι τέτοιο.

Πίνακας 2.4.1 : Ενδεικτικές τιμές ποικιλότητας βασισμένες σε αναλύσεις μικροδορυφορικών τόπων (msat) για πληθυσμούς ζαρκαδιών σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης.

Περιοχή	Πληθυσμοί	Αλληλική ποικιλότητα	Αναμενόμενη/ παρατηρούμενη ετεροζυγωτία	Αναφορά & τόποι
Ελλάδα	4	2,9-4,7	0,49-0,59/ 0,46-0,58	παρούσα μελέτη 14 msat
Ιταλία	12	1,6-4,8	0,17-0,58/ 0,22-0,67	Lorenzini <i>et al.</i> 2002 13 msat (11 κοινοί)
Ιταλία	18	3,7-6,6	0,53-0,75/ 0,52-0,71	Randi <i>et. al.</i> 2004 11 msat (6 κοινοί)
Ισπανία, Νότια Γαλλία	9	4,5- 6,5	-/ 0,57-0,75	Royo <i>et al.</i> 2007 10 msat (4 κοινοί)
Σερβία	9	4,4-6	0,59-0,72 0,54-0,75	Randi <i>et. al.</i> 2004 11 msat (6 κοινοί)
Γερμανία	5	6,1-7,9	0,74-0,79/ -	Zachos <i>et al.</i> 2006 8 msat (5 κοινοί)
Ελβετία	11	3,6-4,7	0,47-0,53/ 0,46-0,54	Kuehn <i>et al.</i> 2007 12 msat (3 κοινοί)
Γερμανία, Γαλλία, Ολλανδία	27	2,2-5,5	0,33-0,66/ -	Wang & Schreiber 2001 4 msat (κανένας κοινός)
Σουηδία, Νορβηγία	14	-	0,37-0,51/ 0,32-0,49	Thulin 2006 12 msat (κανένας κοινός)
Μ. Βρετανία	14	3,8-6,4	0,59-0,76/ 0,49-0,74	Baker 2011 18 msat (3 κοινοί)

Ένας σημαντικός παράγοντας που εν πολλοίς καθορίζει τα επίπεδα της παρατηρούμενης γενετικής ποικιλότητας είναι το μέγεθος -απόλυτο και δραστικό- του πληθυσμού και οι διακυμάνσεις του στο χρόνο (Frankham *et al.* 2002, Deyoung & Honeycutt 2005, Garner *et al.* 2005). Γενικά, οι μικροί και απομονωμένοι πληθυσμοί ενός είδους αλλά και όσοι έχουν διέλθει πρόσφατα από δημογραφική στενωπό είναι ευάλωτοι στη δράση της γενετικής παρέκκλισης και παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, όπως έχουν δείξει πολυάριθμες μελέτες τόσο σε ελαφοειδή (McCullough *et al.* 1996, Martinez *et al.* 2002, Nabata *et al.* 2004, Nielsen *et al.* 2008, Μερτζανίδου 2010) όσο και σε άλλα θηλαστικά (ελέφαντας-Whitehouse & Harley 2001, ενυδρίδα-Larson *et al.* 2002, αλεπού-Nyström *et al.* 2006, αρκούδα-Dixon *et al.* 2007, τίγρη-Alasaad *et al.* 2011). Σε αρκετές περιπτώσεις και ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια της πληθυσμιακής κάμψης, οι πληθυσμοί είναι δυνατόν να απολέσουν σημαντικό μέρος της αρχικής τους γενετικής ποικιλότητας (Larson *et al.* 2002, Nyström *et al.* 2006). Ως προς το ζαρκάδι, πολλοί αυτόχθονες πληθυσμοί των

καταφυγίων της ιταλικής και ιβηρικής χερσονήσου, που έχουν κινδυνέψει με αφανισμό, εμφανίζουν σήμερα χαμηλές τιμές γενετικής ποικιλότητας παρόλο που βρίσκονται σε φάση πληθυσμιακής επανάκαμψης (βλ. Lorenzini *et al.* 2002, Rojo *et al.* 2007). Η δημογραφική διακύμανση των τελευταίων αιώνων λόγω της θήρευσης αλλά και η απομόνωσή ως αποτέλεσμα της ανθρώπινης επέμβασης στα ενδιαιτήματα των πληθυσμών αυτών (αποψίλωση δασών, αστικοποίηση) έχουν «ενοχοποιηθεί» για τις συγκεκριμένες τιμές.

Μια πιθανή ερμηνεία για την εκτιμώμενη χαμηλή γενετική ποικιλότητα των ελληνικών πληθυσμών θα μπορούσε να αναζητηθεί στο μέγεθός τους και την πρόσφατη ιστορία τους. Η πρόσφατη ιστορία του ζαρκαδιού στη χώρα μας χαρακτηρίζεται από τη σημαντική μείωση της αφθονίας και της κατανομής του, εξαιτίας κυρίως της υπερεντατικής θήρευσης. Δυστυχώς, δεν διαθέτουμε δημογραφικά δεδομένα για τη διακύμανση των πληθυσμών που μελετήσαμε, αλλά αν λάβουμε υπόψη τις χαμηλές πληθυσμιακές πυκνότητες που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα (βλ. Γενική Εισαγωγή), τότε εύλογα υποψιαζόμαστε ότι το μέγεθός τους είναι όντως μικρότερο σε σχέση με τους ακμαίους πληθυσμούς άλλων χωρών. Είναι επομένως πολύ πιθανό η συρρίκνωση και ο κατακερματισμός των πληθυσμών σε συνδυασμό με την έντονη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης να οδήγησαν σε απώλεια της γενετικής ποικιλότητας.

Ο ασφαλέστερος τρόπος ελέγχου μιας τέτοιας υπόθεσης θα ήταν η σύγκριση της ποικιλότητας σε δείγματα από πληθυσμούς που ζούσαν στο παρελθόν, πριν την πιθανή δημογραφική στενωπό, και σε σύγχρονα δείγματα (π.χ. Μερτζανίδου 2010, Baker 2011). Λόγω της αδυναμίας συγκέντρωσης ιστορικού δείγματος (δείγματα από μουσεία, οστεολογικό υλικό από αρχαιολογικές ή παλαιοντολογικές ανασκαφές) στις κύριες περιοχές δειγματοληψίας, η έρευνά μας επικεντρώθηκε σε γενετικές μεθόδους ελέγχου πιθανών στενωπών με βάση την υπάρχουσα ποικιλότητα. Όπως έδειξε η αντίστοιχη ανάλυση τουλάχιστον ένας πληθυσμός (Όσσας) εμφανίζει σημάδια πρόσφατης γενετικής στενωπού. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα και οι χαμηλές τιμές ποικιλότητας των υπόλοιπων ελληνικών πληθυσμών σε σύγκριση με ακμαίους πληθυσμούς άλλων χωρών, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το ελληνικό ζαρκάδι -αν και εξακολουθεί να διατηρεί σημαντικά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας- σαφώς επηρεάστηκε γενετικά από την απομείωση των πληθυσμών του κατά το πρόσφατο παρελθόν.

Ένα επιπλέον ποιοτικό χαρακτηριστικό, το οποίο πρέπει να ληφθεί υπόψη στο σχολιασμό των χαμηλών επιπέδων γενετικής ποικιλότητας των πληθυσμών του ζαρκαδιού στην Ελλάδα, είναι η απουσία διαχειριστικών παρεμβάσεων όπως οι μετατοπίσεις και οι επανεισαγωγές. Το ζαρκάδι, ως ένα από τα κυριότερα θηρεύσιμα είδη (game species) στην Ευρώπη, αποτέλεσε -ιδιαίτερα κατά τους τελευταίους αιώνες- αντικείμενο εκτεταμένων προγραμμάτων διαχείρισης με σκοπό την αποκατάσταση των πληθυσμών του σε περιοχές όπου είχε εξαφανιστεί ή περιοριστεί σημαντικά. Τέτοιες πρακτικές έχουν ακολουθηθεί κατά

κόρον σε πολλές χώρες –αλλά όχι στην Ελλάδα– με αποτέλεσμα την τεχνητή ενίσχυση της γενετικής ποικιλότητας τοπικών πληθυσμών. Οι Vernezi *et al.* (2002) και οι Randi *et al.* (2004) αναφέρουν μια χαρακτηριστική περίπτωση τέτοιου πληθυσμού στην βορειοδυτική Ιταλία (Liguria) όπου η επανεισαγωγή ατόμων από διάφορες περιοχές είχε ως αποτέλεσμα τη διαμόρφωση υψηλότερων επιπέδων ποικιλότητας σε σχέση με τους υπόλοιπους αυτόχθονες ιταλικούς πληθυσμούς. Παραδείγματα πληθυσμών, στους οποίους η υψηλή ποικιλότητα αποδόθηκε στη γενετική ανάμειξη που προέκυψε από την εισαγωγή ζαρκαδιών, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.2.

Πίνακας 2.4.2 : Γενετική ποικιλότητα μικροδορυφορικών τόπων σε πληθυσμούς με τεκμηριωμένες επανεισαγωγές ζαρκαδιών.

Περιοχή	Χώρα	Αλληλική ποικιλότητα	Αναμενόμενη/παρατηρούμενη ετεροζυγωτία	Αναφορά, προέλευση εισαγόμενων ζώων
Liguria	Ιταλία	6,6	0,65/0,61	Randi <i>et al.</i> 2004 Ιταλία (2 περιοχές) + Σλοβενία
Bordeaux	Γαλλία	6,5	-/0,75	Royo <i>et al.</i> 2007 Ισπανία + Βαλκάνια
Lleida	Ισπανία	6,2	-/0,72	Royo <i>et al.</i> 2007 Ισπανία + Βαλκάνια
Foehr	Γερμανία	6,1	0,74/0,55	Zachos <i>et al.</i> 2006 Γερμανία + Δανία

Με βάση τις συγκρίσεις των εκτιμώμενων τιμών ποικιλότητας μεταξύ των κύριων πληθυσμών στην Ελλάδα, προκύπτουν ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Όπως φαίνεται στους Πίνακες 2.3.3 και 2.3.12 (σελ. 78 & 87), η γενετική ποικιλότητα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών και μάλιστα μπορεί να περιγραφεί ένα πρότυπο ανεξάρτητο του μοριακού δείκτη (μιτοχονδριακού ή πυρηνικών). Οι πληθυσμοί της Όσσας και της Παρνασσίδας έχουν χαμηλότερη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με τους πληθυσμούς του Ζαγορίου και του Λαϊλιά. Με μοναδική εξαίρεση τη νουκλεοτιδική ποικιλότητα (%π), όλοι οι υπόλοιποι δείκτες (απλοτυπική ποικιλότητα, αριθμός απλοτύπων ανά αριθμό ατόμων, αλληλική ποικιλότητα, παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία, αριθμός ιδιωτικών αλληλομόρφων) εμφανίζουν μικρότερες τιμές στους πληθυσμούς της Όσσας και της Παρνασσίδας. Η νουκλεοτιδική ποικιλότητα της Όσσας είναι υψηλή κυρίως γιατί από τους τρεις απλότυπους που βρέθηκαν (GR 9,10,11) οι δύο πρώτοι (GR9 και GR10) αποκλίνουν σημαντικά ως προς το αριθμό των συσσωρευμένων μεταλλαγών και ταυτόχρονα έχουν υψηλές συχνότητες. Οι χαμηλές τιμές του δείκτη $\theta_{(s)}$ και στους δύο πληθυσμούς είναι ενδεικτική της ύπαρξης μικρότερου δραστικού μεγέθους.

Γενετική δομή και διαφοροποίηση μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών

Σε πρώτη ανάγνωση και με βάση όσα εκτέθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, η υψηλή ποικιλότητα που εκτιμήθηκε για το σύνολο των δειγμάτων έρχεται σε αντιδιαστολή με τη μέτρια ως χαμηλή ποικιλότητα των επιμέρους τοπικών πληθυσμών. Η φαινομενική αυτή αντίφαση αποτελεί στην ουσία ισχυρή ένδειξη της έντονης διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών και οφείλεται στο γεγονός ότι οι απλότυποι του μιτοχονδριακού DNA και τα αλληλόμορφα των μικροδορυφορικών τόπων δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα εντός της χώρας. Όπως πολύ χαρακτηριστικά φαίνεται στις εικόνες 2.3.1 (σελ. 75) και 2.3.4-2.3.17 (σελ. 88-94) σε κάθε μία από τις βασικές περιοχές δειγματοληψίας η γενετική δεξαμενή των τοπικών πληθυσμών περιλαμβάνει μόνο ένα μέρος της συνολικής ποικιλότητας.

Η ύπαρξη απλοτύπων που περιορίζονται σε έναν μόνο πληθυσμό αποτελεί ένδειξη μειωμένης γονιδιακής ροής και επομένως έντονης διαφοροποίησης (Slatkin 1985, Kalinowski 2004). Το γεγονός ότι μεταξύ των τεσσάρων κύριων πληθυσμών δεν βρέθηκε κανένας κοινός απλότυπος για το μιτοχονδριακό DNA, με συνέπεια το ποσοστό των ιδιωτικών απλοτύπων σε κάθε πληθυσμό να είναι το μέγιστο δυνατό (100%), δείχνει πως οι πληθυσμοί αυτοί είναι έντονα διαφοροποιημένοι παρά τις μεταξύ τους σχετικά μικρές γεωγραφικές αποστάσεις (από 130 έως 330 km). Η ακραία αυτή κατανομή εντελώς διαφορετικών απλοτύπων σε κάθε γεωγραφική περιοχή είναι ένα ιδιαίτερα εντυπωσιακό αποτέλεσμα και δεν έχει παρατηρηθεί σε καμία άλλη έρευνα της γενετικής ποικιλότητας του είδους σε παρόμοια γεωγραφική κλίμακα (Lorenzini *et al.* 2002,2003, Zachos *et al.* 2006, Royo *et al.* 2007). Θα πρέπει ωστόσο να αντιμετωπίζεται με επιφύλαξη καθώς πιθανώς οφείλεται στον μικρό αριθμό των πληθυσμών που μελετήθηκαν ή στο μέγεθος του δείγματος από κάθε πληθυσμό (14-19 άτομα). Με άλλα λόγια, δεν αναμένονται ανάλογες απόλυτες τιμές ιδιωτικών απλοτύπων αν προστεθούν σημαντικοί πληθυσμοί και από άλλες περιοχές. Αυτό φαίνεται εξάλλου και από την περίπτωση του Κόζιακα όπου μόνο ένας από τους τρεις απλότυπους που εντοπίστηκαν ήταν ιδιωτικός (ο GR7 βρέθηκε και στον Λαΐλια ενώ ο GR15 στο Ζαγόρι και στα Τζουμέρκα).

Αξιοσημείωτη είναι και η ύπαρξη αρκετών ιδιωτικών αλληλομόρφων -της τάξης του 20%- στους περισσότερους μικροδορυφορικούς τόπους (σε 11 από τους 14). Τα περισσότερα από αυτά εμφανίζουν χαμηλές συχνότητες εντός του μοναδικού πληθυσμού στον οποίο εντοπίστηκαν (<10%) και επομένως θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν σπάνια (βλ. Εικόνες 2.3.4-2.3.17). Ωστόσο σε επτά τόπους βρέθηκαν ιδιωτικά αλληλόμορφα με σημαντικές ενδοπληθυσμιακές συχνότητες (11-31%), γεγονός που ενισχύει τη διάκριση των πληθυσμών. Ενδεικτικά αναφέρουμε τα αλληλόμορφα: α) NVHRT21-145 και RT7-236 που με συχνότητες 31% και 25% αντίστοιχα εντοπίστηκαν μόνο στον πληθυσμό του Λαΐλιά, β) Roe8-82 που

βρέθηκε σε σημαντική συχνότητα (17%) μόνο στην Παρνασσίδα και γ) NVHRT71-105 που υπάρχει μόνο στην Όσσα (συχνότητα 25%).

Η γενετική ποικιλότητα που εκτιμήθηκε για το συνολικό δείγμα είναι υψηλή όχι γιατί αντανάκλα τη γενική εικόνα των επιμέρους πληθυσμών αλλά εξαιτίας της υψηλής διαπληθυσμικής ποικιλότητας (διαφοροποίησης). Η χωρική γενετική ετερογένεια επιβεβαιώθηκε από όλες τις αναλύσεις περιγραφής της γενετικής δομής, που έδειξαν ότι στην Ελλάδα το είδος δεν συγκροτεί έναν ενιαίο παμμικτικό πληθυσμό, αλλά διαιρείται σε τουλάχιστον τέσσερις διακριτές γενετικές μονάδες με περιορισμένη γονιδιακή ροή μεταξύ τους. Οι τιμές των δεικτών συγκαταγωγής F_{st} στο σύνολο αλλά και μεταξύ των πληθυσμών ήταν υψηλές και στατιστικά σημαντικές, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ισχυρής γενετικής δομής στο ελληνικό ζαρκάδι.

Η συνολική τιμή F_{st} (0,13) που υπολογίστηκε με βάση τις συχνότητες των αλληλομόρφων σε 14 μικροδορυφορικούς τόπους είναι ανάλογη με αυτές που υπολογίστηκαν για πληθυσμούς του ζαρκαδιού στην Ισπανία ($F_{st}=0,15$: Lorenzini *et al.* 2003, $F_{st}=0,13$: Royo *et al.* 2007) και στην Ιταλία ($F_{st}=0,15$: Lorenzini *et al.* 2002). Οι ανά ζεύγος πληθυσμών τιμές των δεικτών F_{st} κυμάνθηκαν από 0,07 έως 0,17. Γενικά τιμές μικρότερες από 0,05 αναμένονται μεταξύ πληθυσμών με σημαντική γονιδιακή ροή, τιμές 0,05-0,1 είναι ενδεικτικές μειωμένης επικοινωνίας, ενώ τιμές μεγαλύτερες από 0,1 παραπέμπουν σε απομονωμένους πληθυσμούς (Wilson *et al.* 2003, Thulin 2006). Επίσης, η τιμή Φ_{st} (0,50-0,52), η οποία εκτιμήθηκε με βάση τις συχνότητες και τη γενετική απόσταση των απλοτύπων της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA, δείχνει ότι περίπου το 50% της παρατηρούμενης ποικιλότητας, οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των τεσσάρων κύριων πληθυσμών και υποδηλώνει χαμηλά επίπεδα ανταλλαγής αναπαραγόμενων θηλυκών ατόμων μεταξύ των συγκεκριμένων πληθυσμών. Αντίστοιχες υψηλές τιμές έχουν αναφερθεί σε μελέτες της γενετικής δομής του είδους σε μεγάλη γεωγραφική κλίμακα στην Ιταλία (78% - Lorenzini *et al.* 2002), τη Μ. Βρετανία (61% - Baker 2011), και την Ισπανία (67% - Lorenzini *et al.* 2003). Οι ανά ζεύγος τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0,34 και 0,62.

Οι τιμές του δείκτη συγκαταγωγής που υπολογίστηκε με βάση το μιτοχονδριακό DNA είναι αρκετά υψηλότερες σε σχέση με αυτές που υπολογίστηκαν με βάση τους μικροδορυφορικούς τόπους. Η αριθμητική υπεροχή του Φ_{st} έναντι του F_{st} έχει παρατηρηθεί, ανεξάρτητα της γεωγραφικής κλίμακας, σε όλες τις μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μιτοχονδριακό και πυρηνικό DNA για την περιγραφή της δομής και της γενετικής ποικιλότητας πληθυσμών ζαρκαδιού, (π.χ. Lorenzini *et al.* 2002,2003, Randi *et al.* 2004, Zachos *et al.* 2006, Lorenzini & Lovari 2006, Royo *et al.* 2007). Ουσιαστικά αντικατοπτρίζει μια διαφορά στη διακριτική ικανότητα των μοριακών δεικτών να αποκαλύψουν και να περιγράψουν την υπάρχουσα γενετική δομή του ζαρκαδιού (Zachos *et al.* 2006) και μπορεί να οφείλεται σε μια σειρά παραγόντων.

Ο διαφορετικός τρόπος κληρονομής του μιτοχονδριακού DNA (μητρική κληρονομία) έναντι των πυρηνικών τόπων (διαγονεϊκή) έχει ως αποτέλεσμα το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού για το πρώτο να είναι κατά τέσσερις φορές μικρότερο (Zhang & Hewitt 2003). Εξαιτίας αυτού, η επίδραση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης αναμένεται να είναι ταχύτερη στο μιτοχονδριακό DNA (Wilson *et al.* 1985), οδηγώντας σε αυξημένα ποσοστά εξαφάνισης απλοτύπων (έναντι αλληλομόρφων μικροδορυφορικών τόπων) και επομένως σε ένα ισχυρότερο «σήμα» διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών.

Η ύπαρξη φυλοεξαρτώμενων προτύπων συμπεριφοράς σε σχέση με τη διασπορά και τη μετανάστευση ενός είδους είναι ένα επιπλέον ενδεχόμενο που μπορεί να ευθύνεται για το διαφορετικό βαθμό απομόνωσης των γενετικών δεξαμενών των δύο δεικτών και επομένως για τα διαφορετικά αποτελέσματα από τη χρήση του ενός ή του άλλου (π.χ. Tiedemann *et al.* 1999, Rueness *et al.* 2003). Γενικά θεωρείται ότι τα αρσενικά ζαρκάδια εμφανίζουν σημαντικότερη ικανότητα διασποράς σε σχέση με τα θηλυκά, τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονη φιλοπατρία, τείνουν δηλαδή να αναπαράγονται πολύ κοντά στην περιοχή όπου γεννήθηκαν (Wahlström and Liberg 1995, Coulon *et al.* 2004). Εφόσον τα θηλυκά άτομα διασπείρονται σε μικρότερες αποστάσεις σε σχέση με τα αρσενικά τότε ενδέχεται να προκύπτουν υψηλότερα επίπεδα διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών όταν η εκτίμηση γίνεται με βάση το μητρικώς κληρονομούμενο μιτοχονδριακό DNA (Nies *et al.* 2005). Πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, θέτουν υπό αμφισβήτηση την ύπαρξη φυλοεξαρτώμενων προτύπων διασποράς στο ζαρκάδι, ειδικά σε μικρή γεωγραφική κλίμακα (βλ. Gaillard *et al.* 2008, Bonnot *et al.* 2010)

Η ομοπλασία, που συμβαίνει ως αποτέλεσμα του κορεσμού των μεταλλάξεων σε κάποιους γενετικούς τόπους (όταν το χρονικό διάστημα διαχωρισμού των πληθυσμών είναι σημαντικό), είναι ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του βαθμού της διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών (Nyakaana *et al.* 2002). Οι Lorenzini & Lovari (2006) θεωρούν ως πιθανή ερμηνεία της απόκλισης των τιμών F_{st} , που υπολόγισαν με βάση τις συχνότητες των απλοτύπων του μιτοχονδριακού DNA και τις συχνότητες των αλληλομόρφων μικροδορυφορικών γενετικών τόπων, τη διαφορετική συμπεριφορά μετάλλαξης των γονιδίων. Στους μικροδορυφορικούς τόπους, ο υψηλότερος ρυθμός μετάλλαξης αφενός και το μοτίβο των μεταλλάξεων (αλλαγές αριθμού επαναλήψεων με συγκεκριμένους περιορισμούς) αφετέρου μπορούν να οδηγήσουν ταχύτερα σε ομοπλασίες που «θολώνουν» την εικόνα διαφοροποίησης.

Η σημαντικότερη ίσως ένδειξη περί ύπαρξης γενετικής δομής στο ελληνικό ζαρκάδι είναι η ισχυρή αντιστοίχιση των ατόμων σε διακριτές γενετικές ομάδες, όπως προκύπτει από τις αναλύσεις ομαδοποίησης αγνοώντας τη γεωγραφική ταυτότητα των ατόμων. Τόσο η ανάλυση FCA όσο κυρίως η ανάλυση Μπεϋζιανής ομαδοποίησης αποκάλυψαν ότι τα άτομα από τις τέσσερις βασικές περιοχές δειγματοληψίας ανήκουν σε ανεξάρτητες γενετικές

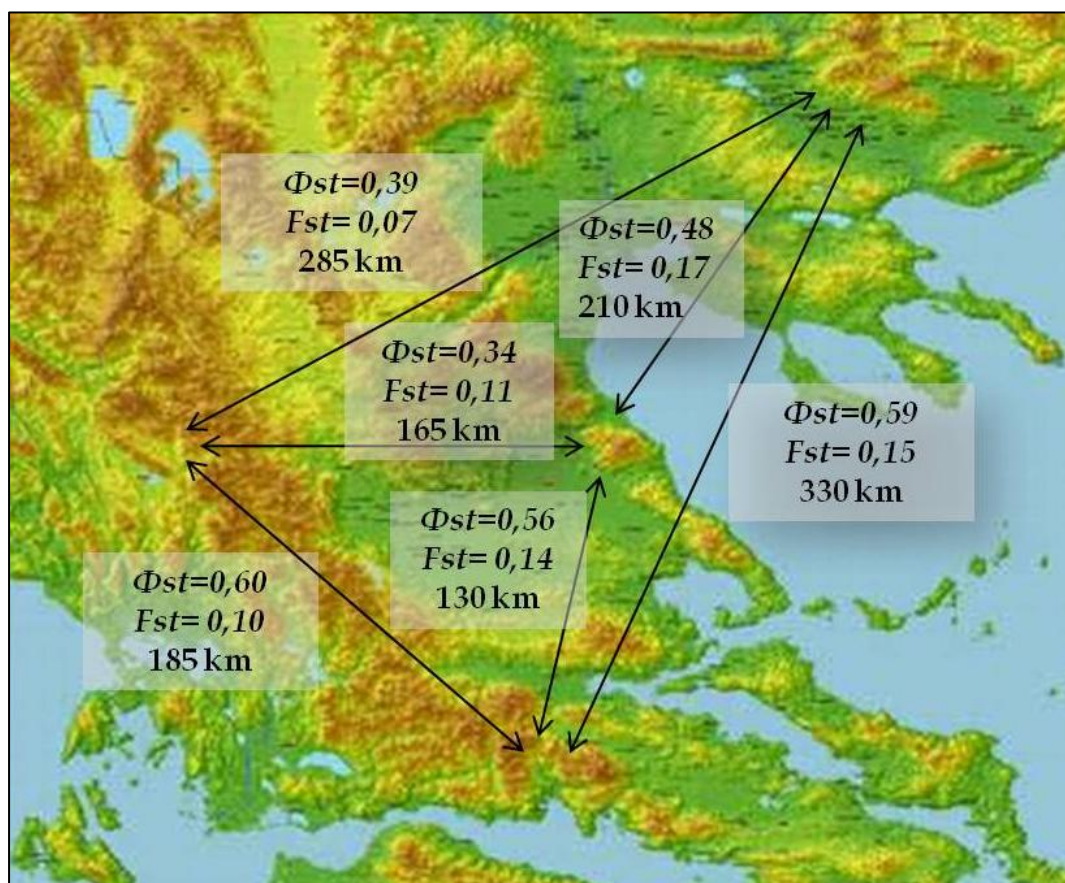
δεξαμενές. Επομένως ο «γεωγραφικός» ορισμός των πληθυσμών που έγινε εκ των προτέρων και με μοναδικό κριτήριο τη γεωγραφική συγγένεια των δειγμάτων ταυτίζεται σε υψηλό βαθμό με έναν «γενετικό» ορισμό που στηρίζεται στο γενετικό τους προφίλ ($Q > 80\%$). Ο μικρός βαθμός ανάμειξης των γενετικών αυτών ομάδων μαρτυρά χαμηλά ή ακόμη και μηδενικά επίπεδα γονιδιακής ροής.

Εντός των τεσσάρων πληθυσμών δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω εσωτερική δομή, γεγονός που δείχνει ότι τα ζαρκάδια που ζουν στις συγκεκριμένες περιοχές διασταυρώνονται ελεύθερα και τυχαία, χωρίς να συγκροτούν διακριτές γενετικές υποομάδες. Μια πιθανή εξήγηση για το αποτέλεσμα αυτό είναι ότι η δειγματοληψία μας ήταν τοπικά εστιασμένη μιας και κάλυψε μικρές σχετικά εκτάσεις της τάξης λίγων τετραγωνικών χιλιομέτρων. Επιπλέον, το περιβάλλον των ορεινών περιοχών που μελετήθηκαν χαρακτηρίζεται από την έλλειψη κατακερματισμένων ενδιαιτημάτων ή σημαντικών φυσικών φραγμάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ασυνέχειες της γονιδιακής ροής και επακόλουθη εσωτερική διάρθρωση των τοπικών πληθυσμών.

Ως προς την μεταξύ των πληθυσμών παρατηρούμενη διαφοροποίηση φαίνεται ότι σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό όλοι οι πληθυσμοί είναι σημαντικά διαφοροποιημένοι. Το πρότυπο διαφοροποίησης είναι κοινό με βάση τις γενετικές αποστάσεις που εκτιμήθηκαν με τον ίδιο μοριακό δείκτη αλλά διαφέρει μεταξύ των μοριακών δεικτών (βλ. αποτελέσματα συσχετίσεων και Εικόνα 2.4.3). Αντίστοιχη απόκλιση προτύπων ανάλογα με το μοριακό δείκτη που χρησιμοποιείται έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες και έχει αποδοθεί στη διακριτική ικανότητα των δεικτών (ενδεικτικά βλ. Feulner *et al.* 2004, Nies *et al.* 2005, Hmwe *et al.* 2006).

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών που υπολογίστηκαν με βάση το μιτοχονδριακό DNA (συμπεριλαμβανομένων των ανά ζεύγος Φ_{st}) ουσιαστικά διερευνούν τη φυλογενετική τους συγγένεια. Αυτή η «κάθετη» προσέγγιση (στηριγμένη στη γενεαλογία των αλληλουχιών) σε αντίθεση με την «οριζόντια» (στηριγμένη στην κατανομή των αλληλουχιών) έχει αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις ότι δεν περιγράφει με ακρίβεια τα τρέχοντα πρότυπα γεωγραφικής διαφοροποίησης των πληθυσμών (βλ. Feulner *et al.* 2004, Hmwe *et al.* 2006), εξαιτίας συγκεκριμένων μειονεκτημάτων του μιτοχονδριακού DNA. Πιο συγκεκριμένα, οι μιτοχονδριακές γενεαλογικές γραμμές μπορεί να είναι πολύ παλιές για να περιγράψουν πληθυσμιακές συγγένειες ή διαφοροποιήσεις που προέκυψαν από πρόσφατες δημογραφικές διακυμάνσεις (σε συμφωνία με Cronin 1993, Taberlet *et al.* 1998, Funk & Omland 2003). Επιπλέον το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται ως μια μονάδα, γεγονός που το καθιστά ουσιαστικά έναν και μόνο γενετικό τόπο. Πολύ παραστατικά η Αντωνίου (2008) περιγράφει τη χρήση του μιτοχονδριακού DNA στις αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής ως μια «πρεσβυωπική» θέαση των εξελικτικών διαδικασιών. Αντίθετα και εξαιτίας των υψηλών μεταλλακτικών ρυθμών και του επαγόμενου υψηλού πολυμορφισμού, οι μικροδορυφορικοί

δείκτες παρέχουν συνήθως περισσότερη πληροφορία σε σχέση με την περιγραφή πρόσφατων πληθυσμιακών γεγονότων όπως οι απομονώσεις, οι στενωποί, οι μετατοπίσεις ή τα τρέχοντα πρότυπα διασποράς παρά με την περιγραφή της ιστορίας των προγονικών (ancestral) πληθυσμών (Coulon *et al.* 2004, Randi *et al.* 2004). Με βάση όσα προαναφέρθηκαν το πρότυπο που προέκυψε από την ανάλυση των μικροδορυφορικών τόπων στη μελέτη μας θα πρέπει να θεωρηθεί περισσότερο αντιπροσωπευτικό.



Εικόνα 2.4.3 : Γενετικές και γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών

Σε γενικές γραμμές τα πρότυπα γενετικής δομής και διαφοροποίησης συνδέονται συχνά με τη διάρκεια της αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ των πληθυσμών. Δύο πληθυσμοί που παραμένουν επί μακρόν απόλυτα απομονωμένοι ή παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα ανταλλαγής γονιδίων, αναμένεται να οδηγηθούν σε διαφορετικές αλληλικές συχνότητες εξαιτίας της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Είναι προφανές πως αν το δραστικό μέγεθος των πληθυσμών είναι μικρό τότε η επαγόμενη διαφοροποίηση μπορεί να προκύψει ταχύτερα και να είναι εντονότερη (Frankham *et al.* 2002).

Ένας σημαντικός παράγοντας που οδηγεί σε αναπαραγωγική απομόνωση είναι η γεωγραφική απόσταση μεταξύ των πληθυσμών (Wright 1943). Το ζαρκάδι θεωρείται ότι,

παρά τη δυνατότητα μεγάλων μετακινήσεων, δεν διασπείρεται σε μακρινές αποστάσεις αλλά παραμένει κοντά στην περιοχή που γεννήθηκε (Linnel *et al.* 1998). Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα οι απομακρυσμένοι πληθυσμοί να διαφοροποιούνται περισσότερο σε σχέση με τους γειτονικούς λόγω μειωμένης γονιδιακής ροής. Σε αρκετές μελέτες η διαφοροποίηση και τα πρότυπα γενετικής δομής του ζαρκαδιού ή άλλων ελαφοειδών εξηγήθηκαν σε συνάρτηση με το μοντέλο απομόνωσης λόγω απόστασης του Wright (isolation by distance) (π.χ. Nies *et al.* 2005, Kuehn *et al.* 2007, Pérez-Espona *et al.* 2009, Baker 2011). Στην Ελλάδα το πρότυπο διαφοροποίησης δεν φαίνεται να ερμηνεύεται με το συγκεκριμένο μοντέλο μιας και δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της γεωγραφικής απόστασης και οποιουδήποτε μέτρου γενετικής απόστασης μεταξύ των πληθυσμών. Βέβαια, ο μικρός αριθμός πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν καθιστά πολύ πιθανή την έλλειψη στατιστικής ισχύος (βλ. Jenkins *et al.* 2010). Ωστόσο, το γεγονός ότι υπήρξαν απρόβλεπτα αποτελέσματα ως προς τα αναμενόμενα επίπεδα διαφοροποίησης μεταξύ κάποιων ζευγών πληθυσμών συνηγορεί υπέρ του ενδεχομένου άλλοι παράγοντες (εξελικτικοί, οικολογικοί ή δημογραφικοί) να διαμόρφωσαν τη σύγχρονη γενετική δομή. Οι πληθυσμοί του Ζαγορίου και του Λαϊλιά για παράδειγμα, ενώ απέχουν σχεδόν 300 χιλιόμετρα εμφανίζουν τη μικρότερη διαφοροποίηση ($F_{st}=0,07$), σε αντίθεση με τις υψηλότερες τιμές που παρατηρούνται μεταξύ του Ζαγορίου και της Παρνασσίδας ($F_{st}=0,10$) ή του Ζαγορίου και της Όσσας ($F_{st}=0,11$), όπου οι αποστάσεις κυμαίνονται μεταξύ 150 και 200 χιλιομέτρων.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι πρότυπα απομόνωσης λόγω απόστασης αναμένεται να παρατηρηθούν σε πληθυσμούς που βρίσκονται σε ισορροπία γενετικής παρέκκλισης και γονιδιακής ροής (Slatkin 1993). Η πρόσφατη ιστορία του ελληνικού ζαρκαδιού καθιστά απίθανη της ύπαρξη μιας τέτοιας ισορροπίας. Ο κατακερματισμός των ενδιαιτημάτων και η μείωση της αφθονίας των πληθυσμών του, γεγονότα που συντελέστηκαν κυρίως κατά τους τελευταίους αιώνες, θεωρούμε ότι οδήγησαν αφενός σε ελάττωση των επιπέδων γονιδιακής ροής και αφετέρου σε εντατικότερη απώλεια απλοτύπων και αλληλομόρφων λόγω της γενετικής παρέκκλισης. Τοπικά φαινόμενα γενετικών στενωπών ή έντονης γεωγραφικής απομόνωσης (όπως στην περίπτωση της Όσσας) μπορούν να εξηγήσουν τόσο τη χαμηλή γενετική ποικιλότητα όσο και τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών (Randi *et al.* 2004). Παραδείγματα ισχυρών διαπληθυσμιακών διαφοροποιήσεων εξαιτίας της γενετικής παρέκκλισης έχουν αναφερθεί σε μικρή γεωγραφική κλίμακα ακόμη και για είδη με μεγάλη ικανότητα διασποράς (Goodman *et al.* 2001, Kuehn *et al.* 2003, Dixon *et al.* 2007).

Βέβαια δεν θα πρέπει να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η σημαντική διαφοροποίηση των συγκεκριμένων ελληνικών πληθυσμών που μελετήσαμε να οφείλεται και σε πολύ παλαιότερες και παρατεταμένες απομονώσεις ή στενωπούς. Για παράδειγμα, η γενετική

παρέκλιση δεν μπορεί από μόνη της να ερμηνεύσει την ύπαρξη ενός τόσο μεγάλου αριθμού ιδιωτικών απλοτύπων και αλληλομόρφων. Η αποσαφήνιση της σχετικής συνεισφοράς ιστορικών και σύγχρονων παραγόντων στη δημιουργία γενετικής δομής δεν αποτελεί μια εύκολη διαδικασία, ειδικά στην περίπτωση που απουσιάζουν ιστορικά στοιχεία της δημογραφίας και της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών και για το λόγο αυτό δεν αποτέλεσε εξαρχής αντικειμενικό στόχο της παρούσας μελέτης. Σε κάθε περίπτωση, η δειγματοληψία ενός μεγαλύτερου αριθμού πληθυσμών και μάλιστα εκείνων που κατανέμονται σε ενδιάμεσες θέσεις και αποστάσεις σε σχέση με τους τέσσερις πληθυσμούς που μελετήσαμε, θα μπορούσε να βοηθήσει στον εντοπισμό της ακριβούς θέσης των γενετικών ασυνεχειών.

Από την περιγραφή στη διαχείριση

Οι σημαντικές πληροφορίες που προέκυψε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης σε σχέση με τη φυλογεωγραφική θέση, τα επίπεδα γενετικής ποικιλοτήτας καθώς και τη γενετική δομή του ελληνικού ζαρκαδιού μπορούν να αξιοποιηθούν για τη διατύπωση χρήσιμων διαχειριστικών προτάσεων, που αφορούν στην προστασία και τη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας και του εξελικτικού δυναμικού του. Επίσης, η ίδια πληροφορία δίνει τη δυνατότητα αξιολόγησης των διαχειριστικών πρακτικών που έχουν εφαρμοστεί μέχρι σήμερα αλλά και επισήμανσης ενδεχόμενων κινδύνων γενετικής υποβάθμισης που ελλοχεύουν για το ζαρκάδι στη χώρα μας.

Βασική προϋπόθεση για τον επιτυχή σχεδιασμό διαχειριστικών προγραμμάτων απειλούμενων ειδών ή πληθυσμών είναι ο εντοπισμός σαφών μονάδων διατήρησης (conservation units) οι οποίες αντιστοιχούν συχνά σε διακριτές εξελικτικές γραμμές εντός του είδους και οι οποίες θα πρέπει να προστατευθούν κατά προτεραιότητα (Avisé 1994). Η κληρονομούμενη γενετική πληροφορία προσφέρει έναν αντικειμενικό τρόπο οριοθέτησης τέτοιων μονάδων, παρέχοντας το απαραίτητο εξελικτικό πλαίσιο. Διάφορα κριτήρια (φυλογενετικά ή/και οικολογικά) και ιεραρχικές βαθμίδες έχουν προταθεί για τον καθορισμό διακριτών μονάδων διατήρησης σε επίπεδο κατώτερο του είδους (π.χ. ESUs, MUs, βλ. Ryder 1986, Waples 1991, Moritz 1994, Crandall *et al.* 2000, Fraser & Bernatchez 2001, Palsbøll *et al.* 2007).

Τα αποτελέσματα της φυλογεωγραφικής ανάλυσης έδειξαν ότι τα ελληνικά ζαρκάδια ανήκουν σε έναν και μόνο φυλογενετικό κλάδο εντός του είδους, στον Ανατολικό. Ο κλάδος αυτός θα μπορούσε με βάση τα κριτήρια του Moritz (1994) να χαρακτηριστεί ως Σημαντική Εξελικτική Μονάδα (Evolutionary Significant Unit - ESU) μιας και είναι αμοιβαία

μονοφυλετικός ως προς το μιτοχονδριακό DNA σε σχέση με τους άλλους κλάδους του ζαρκαδιού (Κεντρικό, Δυτικό, Ιβηρικό). Οι πληθυσμοί του είδους στην Ελλάδα είναι αυτόχθονες, ιστορικά απομονωμένοι από τους άλλους υπολειμματικούς πληθυσμούς των καταφυγίων της Ιβηρικής και Ιταλικής χερσονήσου. Επίσης διαφέρουν γενετικά από τους πληθυσμούς που εξαπλώνονται στην Κεντρική Ευρώπη ενώ δεν φαίνεται να έχουν υποστεί πρόσφατα καμία γενετική ανάμειξη λόγω ανεξέλεγκτων απελευθερώσεων. Η γενετική διαφοροποίηση λόγω της ιστορικής αναπαραγωγικής απομόνωσης και η ύπαρξη μοναδικών ή διαφορετικών προσαρμογών έχουν θεωρηθεί απαραίτητες παράμετροι για τον ορισμό εξελικτικά σημαντικών μονάδων (Ryder 1986, Warples 1991). Αν και δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που να δείχνουν το βαθμό διαφοροποίησης των ελληνικών πληθυσμών ως προς το πυρηνικό DNA ή να περιγράφουν την κληρονομούμενη φαινοτυπική ποικιλομορφία, δεν θα πρέπει να αποκλειστεί η ενδεχόμενη ύπαρξη ιδιαίτερων προσαρμοστικών χαρακτήρων ως αποτέλεσμα της μακράιωνης απομόνωσης του ζαρκαδιού στα οικοσυστήματα της Βαλκανικής.

Με βάση τα στοιχεία που προαναφέρθηκαν, θεωρούμε ότι το ελληνικό ζαρκαδί φέρει ένα σημαντικό μέρος της εξελικτικής κληρονομιάς και ταυτόχρονα ένα διακριτό γενετικό απόθεμα απαραίτητο για τη μελλοντική εξέλιξη του είδους (Warples 1995). Θα πρέπει επομένως να προστατευθεί ως ανεξάρτητη εξελικτική μονάδα τόσο από γενετική υποβάθμιση όσο και από γενετική ανάμειξη με αλλόχθονες γενετικές δεξαμενές. Υπό αυτό το πρίσμα κάθε μελλοντική διαχειριστική προσπάθεια διατήρησης του ελληνικού ζαρκαδιού, ή αποκατάστασης της ιστορικής του κατανομής, είναι προτιμότερο να γίνει είτε με μέτρα που θα επιτρέψουν τη φυσική επανάκαμψη της αφθονίας και της συνδεσιμότητας των υπάρχοντων πληθυσμών (π.χ. αποτελεσματικότερος έλεγχος παράνομου κυνηγιού) είτε με στοχευμένες επανεισαγωγές ζαρκαδιών, που όμως θα προέρχονται αποκλειστικά από την Ελλάδα. Στην τελευταία αυτή περίπτωση θα απαιτηθεί υποχρεωτικά η χρήση γενετικών μεθόδων ταυτοποίησης ατόμων και πληθυσμών.

Σε μια προσπάθεια καθορισμού μονάδων διατήρησης σε χαμηλότερο ιεραρχικό επίπεδο από την εξελικτική μονάδα ο Moritz (1994) πρότεινε τις Διαχειριστικές Μονάδες (Management Units - MU). Ως διαχειριστικές μονάδες θεωρούνται πληθυσμοί που παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των απλοτύπων ή των αλληλομόρφων τους από άλλους πληθυσμούς του ίδιου είδους, υποδεικνύοντας την ύπαρξη χαμηλών επιπέδων γονιδιακής ροής μεταξύ τους (Palsbøll *et al.* 2007). Οι πληθυσμοί αυτοί δεν έχουν διαφοροποιηθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να χαρακτηρίζονται φυλογενετικά μοναδικοί, ωστόσο είναι λειτουργικά και δημογραφικά ανεξάρτητοι (Moritz 1994). Ο εντοπισμός διαχειριστικών μονάδων κατέχει κεντρική θέση στην προσπάθεια βραχυπρόθεσμης διαχείρισης και διατήρησης των φυσικών πληθυσμών και τυπικά χρησιμοποιείται για την οριοθέτηση προγραμμάτων συστηματικής παρακολούθησης της γενετικής ποικιλότητας (genetic

monitoring - Schwartz *et al.* 2007). Είναι προφανές ότι η διατήρηση των διαχειριστικών μονάδων εντάσσεται στη γενικότερη αναγκαιότητα διατήρησης των εξελικτικών μονάδων.

Όπως με λεπτομέρεια περιγράφηκε προηγουμένως το ελληνικό ζαρκάδι δεν συγκροτεί έναν ενιαίο παμμικτικό πληθυσμό αλλά χαρακτηρίζεται από έντονη γενετική δομή και διαπληθυσμιακή διαφοροποίηση. Τουλάχιστον οι τέσσερις πληθυσμοί που μελετήθηκαν διαφέρουν σημαντικά ως προς την συχνότητα τόσο των μιτοχονδριακών απλοτύπων όσο και των αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων και φαίνεται ότι παρουσιάζουν χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα γονιδιακής ροής. Επομένως θα πρέπει να θεωρούνται ανεξάρτητες διαχειριστικές μονάδες (*sensu* Moritz 1994) που χρήζουν ιδιαίτερων μέτρων προστασίας και διαχείρισης ως σημαντικές μονάδες της γενετικής ποικιλότητας του ελληνικού ζαρκαδιού. Αντίστοιχες διαχειριστικές μονάδες μπορούμε να υποθέσουμε ότι συνιστούν και άλλοι σημαντικοί πληθυσμοί του είδους στην Ελλάδα οι οποίοι κατανέμονται σε διακριτές γεωγραφικές ενότητες και εμφανίζουν ενδείξεις παρατεταμένης γενετικής απομόνωσης (π.χ ο πληθυσμός της χερσονήσου του Άθω). Μια μελλοντική διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας σε ευρύτερη δειγματοληπτική κλίμακα είναι δυνατόν να αποκαλύψει με ακρίβεια τον αριθμό και τα όρια των διαχειριστικών μονάδων. Αξίζει, ωστόσο, σε αυτό το σημείο να προχωρήσουμε σε λεπτομερέστερο σχολιασμό της γενετικής κατάστασης και στη διατύπωση διαχειριστικών προτάσεων για τις διαχειριστικές μονάδες που εντοπίσαμε στην παρούσα μελέτη.

Ο πληθυσμός της Όσσας εμφανίζει έντονη γεωγραφική και γενετική απομόνωση αλλά και πολύ χαμηλή γενετική ποικιλότητα. Η πρόσφατη γενετική στενωπός -ανεξάρτητα από τα αίτια που την προκάλεσαν- υποδεικνύει ότι το δραστικό μέγεθος του συγκεκριμένου πληθυσμού έχει υποστεί σημαντική συρρίκνωση. Αν και η τιμή του συντελεστή ενδογαμίας που υπολογίστηκε ήταν χαμηλή και στατιστικά μη σημαντική ($F_{IS}=0,07$), τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με το στατιστικά σημαντικό έλλειμμα ετεροζυγωτίας που προέκυψε από τον έλεγχο για ισορροπία *Hardy-Weinberg*, καθιστούν πιθανό το ενδεχόμενο ο πληθυσμός να αντιμετωπίζει ήδη ή να κινδυνεύει στο άμεσο μέλλον να αντιμετωπίσει προβλήματα ενδογαμίας και περαιτέρω σημαντικής γενετικής υποβάθμισης. Σύμφωνα με την ερευνητική εμπειρία από άλλα ελαφοειδή, οι μικροί και απομονωμένοι πληθυσμοί με χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε φαινόμενα ενδογαμίας τα οποία απειλούν άμεσα την επιβίωσή τους (βλ. Zachos *et al.* 2007).

Η γεωγραφική θέση του ορεινού όγκου της Όσσας και η διαμόρφωση των ενδιαιτημάτων στη γύρω περιοχή περιορίζουν σημαντικά τη δυνατότητα μετανάστευσης ζαρκαδιών προς τον τοπικό πληθυσμό. Στα δυτικά και νότια, οι εκτεταμένες πεδινές εκτάσεις του θεσσαλικού κάμπου αποτελούν μια αφιλόξενη «θάλασσα» η οποία λειτουργεί ως φράγμα στην επικοινωνία με τους πληθυσμούς της οροσειράς της Πίνδου. Οι Coulon *et al.* (2004) έδειξαν ότι η γονιδιακή ροή σε μικρογεωγραφική κλίμακα επιτυγχάνεται στο ζαρκάδι κυρίως

μέσω δασωμένων διαδρόμων (corridors) και επομένως η γενετική συνδεσιμότητα μεταξύ των πληθυσμών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαμόρφωση του τοπίου. Επίσης οι Wang & Schreiber (2001) υποστήριξαν ότι ο βαθμός αστικοποίησης (έκταση γης που καλύπτεται από δρόμους, πόλεις, χωριά) συνδέεται με τα επίπεδα της γενετικής διαφοροποίησης αφού οδηγεί σε κατακερματισμό των ενδιατημάτων. Η μόνη δίοδος επικοινωνίας με γειτονικούς βόρειους πληθυσμούς (π.χ. του Ολύμπου), η οποία ενδέχεται να επιτρέπει τη γονιδιακή ροή προς τον πληθυσμό της Όσσας, είναι τα στενά των Τεμπών. Η ύπαρξη εκεί, ωστόσο, ενός σημαντικού οδικού άξονα ταχείας κυκλοφορίας (εθνική οδός Αθηνών- Θεσσαλονίκης) δημιουργεί ένα επιπλέον φράγμα που περιορίζει τη δυνατότητα διασποράς (Kuehn *et al.* 2007).

Αυτή η απομόνωση του πληθυσμού της Όσσας δείχνει ότι θα πρέπει να θεωρείται απίθανη, βραχυπρόθεσμα τουλάχιστον, η φυσική ανανέωση της γενετικής του δεξαμενής μέσω της γονιδιακής ροής, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά ο κίνδυνος μεγαλύτερης γενετικής υποβάθμισης λόγω της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Ως άμεσο διαχειριστικό μέτρο προτείνεται η απαγόρευση του κυνηγιού του ζαρκαδιού στην Ελεγχόμενη Κυνηγετική Περιοχή Όσσας καθώς και η εκτίμηση της αφθονίας και άλλων δημογραφικών παραμέτρων του πληθυσμού του. Είναι πολύ πιθανό το κυνήγι να αποτέλεσε την αιτία της πρόσφατης γενετικής στενωπού, ενώ έχει αναφερθεί ότι γενικά επηρεάζει σημαντικά τόσο τα επίπεδα γονιδιακής ροής όσο και την αναλογία δραστικού και πραγματικού μεγέθους του πληθυσμού N_e/N οδηγώντας σε απώλεια γενετικής ποικιλότητας (Harris *et al.* 2002, Allendorf *et al.* 2008). Η μεταφορά και απελευθέρωση ζαρκαδιών από άλλους ελληνικούς πληθυσμούς είναι μια ακόμη διαχειριστική πρακτική, η οποία μπορεί να ενισχύσει το τοπικό γενετικό απόθεμα.

Η Παρνασσίδα (Οίτη, Βαρδούσια, Γκιώνα, Παρνασσός) φιλοξενεί τον νοτιότερο φυσικό πληθυσμό ζαρκαδιών της Βαλκανικής χερσονήσου. Το γεγονός, μάλιστα, ότι τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια προς νότο επέκταση της εξάπλωσης του είδους στη συγκεκριμένη περιοχή της Στερεάς Ελλάδας (βλ. Γενική Εισαγωγή, σελ.18) ενδεχομένως να συνδέεται με την αύξηση της πυκνότητας του τοπικού πληθυσμού. Ο πληθυσμός δεν παρουσιάζει ενδείξεις ενδογαμίας λόγω μη τυχαίας αναπαραγωγής των ατόμων που τον απαρτίζουν. Η γενετική ποικιλότητα, παρόλα αυτά, είναι πολύ χαμηλή και ειδικά για το μιτοχονδριακό DNA είναι η χαμηλότερη μεταξύ των ελληνικών πληθυσμών που μελετήθηκαν (μόλις δύο απλότυποι). Η ανάλυση για την ύπαρξη γενετικών στενωπών δεν ήταν θετική αλλά αυτό δεν αποκλείει το ενδεχόμενο η μείωση του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού να συντελείται με ήπιο τρόπο (σταδιακά και όχι απότομα) οδηγώντας σε σημαντική απώλεια απλοτύπων και αλληλομόρφων ή εναλλακτικά η στενωπός να έγινε αρκετά παλιότερα και όχι πρόσφατα (Luikart & Cornuet 1998). Ο πληθυσμός της Παρνασσίδας εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τον πληθυσμό του Ζαγορίου, γεγονός μάλλον μη αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη η συνεχής κατανομή του είδους κατά μήκος της οροσειράς της Πίνδου (βλ. Εικόνα 1.2.2, σελ. 19). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα

ενισχύει την υπόθεση ότι οι πληθυσμοί του ζαρκαδιού στην Ελλάδα είναι κατακερματισμένοι και εμφανίζουν μειωμένη γονιδιακή ροή ακόμα και σε περιοχές όπου θεωρητικά αναμενόταν παμμικτικοί ή έστω ελάχιστα διαφοροποιημένοι.

Η γεωγραφική θέση του πληθυσμού της Παρνασσίδας τον καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό από διαχειριστικής άποψης, αφού η αύξηση της αφθονίας του θα επιταχύνει τη διαδικασία φυσικής επέκτασης της σημερινής κατανομής του είδους. Η απαγόρευση του κυνηγιού στην Ελεγχόμενη Κυνηγετική Περιοχή Παρνασσίδας, ίσως πρέπει να αποτελέσει ένα πρώτο διαχειριστικό μέτρο, τουλάχιστον μέχρι να εκτιμηθεί η αφθονία και άλλες δημογραφικές παράμετροι του τοπικού πληθυσμού των ζαρκαδιών. Επιπλέον, μια πιο συστηματική και γεωγραφικά ευρύτερη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας θα μπορούσε να δώσει τη δυνατότητα εντοπισμού ενδεχόμενων σημαντικών φραγμάτων στη γενετική συνδεσιμότητα με τους βορειότερους πληθυσμούς της Πίνδου. Η φυσική προς βορρά επικοινωνία, που είναι και η μοναδική δυνητική οδός ανταλλαγής γονιδίων βραχυπρόθεσμα, θα πρέπει να ενισχυθεί.

Ο πληθυσμός του Λαϊλιά θηρεύεται –όπως και οι προηγούμενοι- στα πλαίσια μιας Ελεγχόμενης Κυνηγετικής Περιοχής. Σε αντιδιαστολή όμως με τους πληθυσμούς της Όσσας και της Παρνασσίδας, παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, αντίστοιχα με εκείνα του πληθυσμού του Ζαγορίου. Το δάσος του Λαϊλιά στο όρος Βροντούς έχει αναφερθεί ότι φιλοξενεί έναν από τους πλέον εύρωστους πληθυσμούς του ζαρκαδιού στη Μακεδονία (Adamakopoulos *et al.* 1991). Αν και σε αυτή την περίπτωση απουσιάζουν αξιόπιστα στοιχεία για την πυκνότητα και την αφθονία, θεωρούμε ότι η γενετική επικοινωνία με μεγάλους πληθυσμούς στα ανατολικά απέτρεψε την εμφάνιση στενωπών και σημαντικών γενετικών απομονώσεων. Πράγματι, η οροσειρά της Ροδόπης και τα γειτονικά όρη Όρβηλος, Μενοίκιο, Φαλακρό συγκροτούν μαζί με τη Βροντού μια ενιαία γεωγραφική ενότητα στην οποία το είδος παρουσιάζει συνεχή κατανομή (βλ. Εικόνα 1.2.2). Η καταλληλότητα των ενδιαιτημάτων (παρθένα δάση) σε συνδυασμό με την απουσία έντονης ανθρώπινης δραστηριότητας (χαμηλή πυκνότητα οικισμών και οδικού δικτύου) κατά μήκος των ελληνοβουλγαρικών συνόρων, είναι πολύ πιθανό να κατέστησαν την περιοχή ιδανικό καταφύγιο για τους πληθυσμούς του ζαρκαδιού, αποτρέποντας την μέχρι εξοντώσεως θήρευση κατά το πρόσφατο παρελθόν.

Η απουσία ενδείξεων σοβαρής γενετικής υποβάθμισης στον πληθυσμό του Λαϊλιά θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα επαρκές υποστηρικτικό στοιχείο για τη συνέχιση της ελεγχόμενης θήρευσής του. Ωστόσο, μόνο μια συστηματική παρακολούθηση της γενετικής του ποικιλότητας (genetic monitoring - Schwartz *et al.* 2007) είναι δυνατόν να επιβεβαιώσει τις υποθέσεις που διατυπώθηκαν παραπάνω και επομένως να υποστηρίξει διαχειριστικά την ελεγχόμενη θήρευση. Επιπλέον, δεν νοείται διαχείριση ενός πληθυσμού χωρίς τη γνώση βασικών δημογραφικών παραμέτρων. Η έλλειψη συστηματικών και επιστημονικά άρτιων

εκτιμήσεων της αφθονίας των πληθυσμών των ΕΚΠ είναι μια διαπίστωση που προέκυψε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης και δείχνει ότι η διαχείριση εξακολουθεί να στηρίζεται στην «εμπειρική» και την υποκειμενική εκτίμηση των πληθυσμιακών τάσεων.

Το Ζαγόρι εντάσσεται στη γεωγραφική ενότητα της βόρειας Πίνδου, η οποία περιλαμβάνει ορεινές εκτάσεις με σχετικά αδιατάρακτα δασικά οικοσυστήματα φυλλοβόλων και κωνοφόρων αλλά και μια από τις μεγαλύτερες χερσαίες Προστατευόμενες Περιοχές στη χώρα μας (Εθνικό Πάρκο Βόρειας Πίνδου). Το καθεστώς προστασίας, η ποικιλία των οικοτόπων και η περιορισμένη ένταση των οχλήσεων ευνόησαν την επιβίωση σημαντικών πληθυσμών του ζαρκαδιού στη συγκεκριμένη περιοχή. Όπως έδειξε η γενετική ανάλυση της παρούσας μελέτης, η ποικιλότητα αν και συγκριτικά χαμηλότερη σε σχέση με άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς του είδους, είναι μεταξύ των υψηλότερων στην Ελλάδα. Ο πληθυσμός του Ζαγορίου δεν φαίνεται να αντιμετωπίζει προβλήματα γενετικής υποβάθμισης και δεν χρήζει ιδιαίτερων διαχειριστικών παρεμβάσεων, πέραν του αποτελεσματικού ελέγχου της παράνομης θήρευσης, η οποία -όπως για πολλές περιοχές στην Ελλάδα- πιθανολογείται ότι εξακολουθεί να αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα για την αύξηση της αφθονίας και της διασποράς του είδους. Είναι ωστόσο, σημαντικό να μελετηθεί η τυχόν επίδραση που μπορεί να είχαν μεγάλα κατασκευαστικά έργα οδοποιίας (Εγνατία Οδός) στη γενετική δομή και την απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών της ευρύτερης περιοχής της βόρειας Πίνδου.

Εδική μνεία και σχολιασμός από διαχειριστικής σκοπιάς θα πρέπει να γίνει και για τον εκτρεφόμενο πληθυσμό των Καλαβρύτων. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί έναν πολύ μικρό (19-64 άτομα βλ. Κεφάλαιο 3), απόλυτα απομονωμένο και χωρικά περιορισμένο πληθυσμό, δεν φαίνεται να αντιμετωπίζει προβλήματα ενδογαμίας αφού βρίσκεται σε ισορροπία *Hardy-Weinberg*. Επιπλέον, η γενετική του ποικιλότητα είναι εντός του εύρους τιμών των φυσικών πληθυσμών και σίγουρα όχι η χαμηλότερη. Αν και τα συγκεκριμένα αποτελέσματα υπόκεινται σε ενδεχόμενο μεροληπτικό σφάλμα λόγω του μικρού δειγματοληπτικού μεγέθους, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν μη αναμενόμενα. Συνήθως οι πληθυσμοί που δημιουργούνται από μικρό αριθμό γεννητόρων και παραμένουν γενετικά απομονωμένοι έχουν χαμηλότερη γενετική ποικιλότητα και μπορεί να αντιμετωπίζουν έντονα φαινόμενα ενδογαμίας (π.χ. Liberg *et al.* 2005). Τα ζαρκάδια που εισήχθησαν στο εκτροφείο των Καλαβρύτων προέρχονταν τουλάχιστον από τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς (βλ. Πίνακα 2 Παραρτήματος). Η ανάμειξη αυτή διαφορετικών γενετικών δεξαμενών είναι δυνατόν να εξηγήσει την ικανοποιητική γενετική ποικιλότητα. Θα πρέπει, ωστόσο, να επισημανθεί ότι σταδιακά ο πληθυσμός αναμένεται να οδηγηθεί σε σημαντική απώλεια αλληλομόρφων λόγω της γενετικής παρέκκλισης και με δεδομένη την παύση της γονιδιακής ροής. Μόνο νέες επανεισαγωγές, δηλαδή η τεχνητή ανανέωση της γενετικής του δεξαμενής θα αποτρέψει τη σημαντική γενετική του υποβάθμιση στο μέλλον.

Ο σκοπός δημιουργίας του πληθυσμού των Καλαβρύτων είναι απροσδιόριστος και εντάσσεται μάλλον στα πλαίσια ασαφών και χωρίς συγκεκριμένη στόχευση διαχειριστικών σχεδίων των αρμόδιων κρατικών υπηρεσιών. Ο συγκεκριμένος πληθυσμός θα μπορούσε, ωστόσο, να αξιοποιηθεί σε μια μελλοντική προσπάθεια επανεισαγωγής του ζαρκαδιού στην Πελοπόννησο, η οποία αποτελούσε μέχρι τις αρχές του προηγούμενου αιώνα σημαντικό τμήμα της ιστορικής κατανομής του είδους στην Ελλάδα. Η απόλυτα φυσική και αντιπροσωπευτική φυσιογνωμία των ενδιαιτημάτων του (βλ. Περιοχή Μελέτης -Κεφάλαιο 3) καθιστά το εκτροφείο Καλαβρύτων ιδανική περιοχή για την ανάπτυξη ενός αρχικού πυρήνα απελευθέρωσης με μεταφορά ζαρκαδιών από ελληνικούς φυσικούς πληθυσμούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων
εκτίμησης της αφθονίας



Εισαγωγή

Σύντομη ανασκόπηση

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ουσιαστική διαχείριση των ειδών άγριας πανίδας είναι η παρακολούθηση των πληθυσμιακών τους διακυμάνσεων στο χώρο και το χρόνο. Είναι επομένως επιβεβλημένη η ανάπτυξη και εφαρμογή συγκεκριμένων μεθοδολογικών εργαλείων προκειμένου να απαντηθούν ερωτήματα που σχετίζονται με το μέγεθος και τη δυναμική των πληθυσμών, τη χωρική κατανομή και τη δημογραφία τους. Η απάντηση ωστόσο της φαινομενικά απλής ερώτησης «πόσα ζώα υπάρχουν;» κάθε άλλο παρά εύκολη αποδεικνύεται στην πράξη. Η εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους των σπηλοφύλων των δασικών οικοσυστημάτων, για παράδειγμα, παραμένει ένα σύνθετο πρόβλημα και ταυτόχρονα ένα ανοικτό πεδίο έρευνας.

Γενικά και με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, πληθώρα διαφορετικών μεθόδων έχει περιγραφεί για την εκτίμηση του μεγέθους και της πυκνότητας πληθυσμών άγριων ζώων (ενδεικτικά.: Putman 1984, Staines & Ratcliffe 1987, Buckland *et al.* 2001, Seber 2002, Borchers *et al.* 2002), οι οποίες θα μπορούσαν να διακριθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: α) τις άμεσες μεθόδους καταμέτρησης όπου καταμετρώνται τα ίδια τα ζώα, β) τις έμμεσες μεθόδους όπου καταμετρώνται βιοδηλωτικά ίχνη των ζώων και γ) τις μεθόδους στοιχείων εξισορροπητικού αποδεκατισμού (cull data) που χρησιμοποιούνται για θηρεύσιμα είδη. Η καταλληλότητα της κάθε μεθόδου και επομένως τα κριτήρια επιλογής της καθορίζονται από την οικολογία και τη συμπεριφορά του υπό μελέτη είδους, τα ακριβή διαχειριστικά ερωτήματα που τίθενται κάθε φορά και τη φυσιογνωμία της περιοχής μελέτης (π.χ. είδη ενδιαιτημάτων, μορφολογία εδάφους) (Mayle *et al.* 1999, Marques *et al.* 2001, Smart *et al.* 2004). Οι απαιτήσεις σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό για την εφαρμογή κάθε μεθόδου συνιστούν παράγοντες που πολλές φορές θέτουν περιορισμούς και υπαγορεύουν την τελική επιλογή.

Στις άμεσες μεθόδους απαραίτητη προϋπόθεση είναι ο οπτικός εντοπισμός ή ακόμη και η σύλληψη των ζώων. Γενικά επιτρέπουν, πέρα από την αφθονία, τη μελέτη της πληθυσμιακής δομής, αφού στα συλλεχθέντα στοιχεία περιλαμβάνονται το φύλο και η ηλικία των ζώων. Συνήθως εφαρμόζονται σε ανοιχτούς βιοτόπους όπου η παρατήρηση είναι σχετικά εύκολη ή για μικρόσωμα είδη που η παγίδευσή τους δεν συνιστά ουσιαστικό εμπόδιο από τεχνικής άποψης. Στις έμμεσες μεθόδους ο στόχος της έρευνας είναι ο εντοπισμός και η καταγραφή βιοδηλωτικών ίχνων των ζώων. Ως τέτοια θεωρούνται τα περιττώματα, τα αποτυπώματα των πελμάτων σε μαλακό έδαφος ή στο χιόνι, τα ίχνη τροφοληψίας, οι θέσεις ανάπαυσης (γιατάκια), οι φωλιές κ.ά. Η έμμεση επιβεβαίωση της παρουσίας ενός ζώου δεν παρέχει συνήθως άλλες πληροφορίες χρήσιμες για την περιγραφή της δομής ενός πληθυσμού

όπως για παράδειγμα η ηλικία και το φύλο του, αλλά μπορεί να αποκαλύψει στοιχεία της οικολογίας (τροφικές συνήθειες, επιλογή ενδιαιτήματος) και της συμπεριφοράς του.

Η αξιοπιστία των εκτιμήσεων της πληθυσμιακής πυκνότητας που προκύπτουν σε κάθε μεθοδολογική προσέγγιση εξαρτάται από δύο βασικά χαρακτηριστικά, την ευστοχία (accuracy) και την ακρίβεια (precision) (Norton-Griffiths 1978, Mayle *et al.* 1999, Barnes 2001, Smart *et al.* 2004). Ως ευστοχία εννοείται η εγγύτητα μιας εκτίμησης στην πραγματική τιμή και μπορεί να εκφραστεί ως ποσοστό απόκλισης από αυτή. Η ακρίβεια αναφέρεται στη στατιστική ισχύ και περιγράφει το αν και κατά πόσο οι επαναλαμβανόμενες μετρήσεις δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Ως μέτρα της ακρίβειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν το τυπικό σφάλμα (SE), τα όρια εμπιστοσύνης (π.χ. 95% CI) ή ο συντελεστής μεταβολής %CV (coefficient of variation) της εκτιμούμενης τιμής (Sokal & Rohlf 1995). Ένα σημαντικό κριτήριο της χρηστικής αξίας μιας μεθόδου είναι η προσπάθεια (effort) που απαιτείται για να οργανωθεί και να εφαρμοστεί (Hochachka *et al.* 2000, Walsh *et al.* 2001, Gaidet-Drapier *et al.* 2006). Ιδανικά, μια μέθοδος για να έχει διαχειριστική αξία, θα πρέπει να παρέχει εύστοχες και ακριβείς εκτιμήσεις της πυκνότητας και της αφθονίας με όσο το δυνατόν λιγότερη προσπάθεια δηλαδή χαμηλότερο κόστος σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό (Mayle *et al.* 1999).

Η καταμέτρηση των περιπτωμάτων ως έμμεση μέθοδος εκτίμησης της αφθονίας

Η συλλογή και μελέτη των περιπτωματικών αποθέσεων έχει προταθεί ως μια εναλλακτική προσέγγιση έμμεσης, μη παρεμβατικής δειγματοληψίας για την εξακρίβωση της κατανομής και του μεγέθους ενός πληθυσμού, για τη μελέτη της τροφικής οικολογίας και της συμπεριφοράς ή ακόμη και της γενετικής ποικιλομορφίας ενός είδους (Putman 1984, Kohn & Wayne 1997). Τα περιπτώματα αποτελούν αδρανή και διαρκή στοιχεία καταγραφής και είναι δυνατόν να συλλεχθούν σχετικά εύκολα στο πεδίο, με δειγματοληψίες που δεν προκαλούν οχλήσεις στα μελετώμενα είδη. Η αφθονία τους είναι μεγαλύτερη από την αφθονία των ζώων που τα παράγουν, γεγονός που εξηγεί την εκτεταμένη χρήση τους στη μελέτη ειδών με έντονα κρυπτική συμπεριφορά και χαμηλές πληθυσμιακές πυκνότητες, δηλαδή σε περιπτώσεις που οι συμβατικές μέθοδοι όπως η άμεση παρατήρηση και η σύλληψη είναι δύσκολο να εφαρμοστούν ή παρέχουν πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων. (Putman 1984, Kohn & Wayne 1997).

Ειδικά στο πεδίο της Πληθυσμιακής Βιολογίας, οι καταμετρήσεις των περιπτωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε διάφορες μεθοδολογικές προσεγγίσεις για την εκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας ενός πληθυσμού. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι

μέθοδοι καταμέτρησης κοπρανosoφρών παρέχουν αξιόπιστες εκτιμήσεις της αφθονίας ενός πληθυσμού (Neff 1968, Mandujano & Gallina 1995, McIntosh *et al.* 1995, Barnes 2001). Ο αριθμός των περιττωμάτων ενός είδους που συσσωρεύονται για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον προκύπτει ως αποτέλεσμα δυο αντισταθμιστικών διαδικασιών: της καθημερινής απόθεσής τους από τα ζώα (αφόδευση) και της εξαφάνισής τους εξαιτίας περιβαλλοντικών, κλιματικών ή άλλων παραγόντων. Επομένως αν σε μια περιοχή υπολογιστεί η πυκνότητα των περιττωμάτων και προσδιοριστούν οι ρυθμοί των διαδικασιών αυτών, είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η πυκνότητα των ζώων που τα παρήγαγαν. Με βάση την απλή αυτή συλλογιστική, έμμεσες μέθοδοι εκτίμησης της αφθονίας αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν σε είδη με πολύ διαφορετικό μέγεθος και οικολογία, όπως σαύρες (Avery & Perkins 1989), κουνέλια (Taylor & Williams 1956), αλεπούδες (Webb *et al.* 2004) ή ελέφαντες (Barnes 2001).

Η χρήση των μεθόδων καταμέτρησης περιττωμάτων στα ελαφοειδή

Η ομάδα, ωστόσο, στην οποία υπήρξε η μεγαλύτερη ένταση χρήσης, αξιολόγησης και τεχνικής εξέλιξης της συγκεκριμένης μεθοδολογίας -όπως προκύπτει και από την εκτεταμένη σχετική βιβλιογραφία- είναι τα ελαφοειδή. Πολλά ελαφοειδή εμφανίζουν έντονα κρυπτική συμπεριφορά (π.χ. ζαρκάδι) και ζουν σε κλειστούς βιοτόπους (δάση). Επίσης μπορούν να απομακρυνθούν γρήγορα πριν εντοπιστούν από τον παρατηρητή και η σύλληψή τους είναι δύσκολη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι μέθοδοι που στηρίζονται στην καταμέτρηση των περιττωματικών αποθέσεων αποτελούν τους πρακτικότερους τρόπους εκτίμησης της αφθονίας και της πυκνότητας των πληθυσμών τους (Putman 1984, Mayle 1996, Buckland *et al.* 2001, Marques *et al.* 2001, Laing *et al.* 2003). Επιπλέον αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν τη μελέτη της επιλογής και χρήσης ενδιαιτήματος, αφού ο υπολογισμός της αφθονίας γίνεται σε βάθος χρόνου (Leopold *et al.* 1984, Loft & Kie 1988, Marques *et al.* 2001).

Σε αντίθεση με άλλα θηλαστικά (π.χ. σαρκοφάγα), τα ελαφοειδή φαίνεται ότι αποδεύουν με τυχαίο και συνεχή τρόπο στο χώρο και το χρόνο, χωρίς να επιλέγουν κάποια ειδική περιοχή (latrine) και χωρίς να χρησιμοποιούν τα περιττώματα για να σημαδέψουν το χώρο επικράτειάς τους (Mitchell *et al.* 1985). Αφήνουν τα περιττώματά τους σε διακριτούς σωρούς που αποτελούνται από πολυάριθμα κόπρανα (κοπρανosoφοί). Η μορφή και το μέγεθος των κοπράνων διαφέρει από είδος σε είδος αλλά και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και τη διαθεσιμότητα ή την ποιότητα της τροφής (Mayle *et al.* 1999). Η χρήση εξειδικευμένων οδηγιών αναγνώρισης και η απόκτηση σχετικής εμπειρίας από τον ερευνητή διευκολύνει την ορθή διάκρισή τους στο πεδίο και την αποφυγή εσφαλμένων

αντιστοιχίσεων, ιδιαίτερα στην περίπτωση που στην ίδια περιοχή συνυπάρχουν περισσότερα του ενός είδη.

Δύο είναι οι βασικές μέθοδοι εκτίμησης της πληθυσμιακής πυκνότητας ελαφοειδών που στηρίζονται στην καταμέτρηση των κοπρανοσωρών και οι οποίες έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί με διάφορες παραλλαγές δειγματοληπτικού σχεδιασμού: η μέθοδος εκτίμησης του ρυθμού συσσώρευσης κοπρανοσωρών (Faecal Accumulation Rate) που πλέον θα αναφέρεται για χάρη συντομίας ως FAR και η μέθοδος καταμέτρησης κοπρανοσωρών (Faecal Standing Crop) που θα αναφέρεται ως FSC (Staines & Ratcliffe 1987, McIntosh *et al.* 1995, Mayle *et al.* 1999, Marques *et al.* 2001, Smart *et al.* 2004, Campbell *et al.* 2004). Και στις δύο μεθόδους είναι απαραίτητη η γνώση δύο παραμέτρων, του ρυθμού αφόδευσης (defecation rate) και του χρόνου αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών (decay time).

Ως ρυθμός αφόδευσης ορίζεται ο αριθμός των κοπρανοσωρών που αποτίθενται από ένα ζώο την ημέρα. Ο ρυθμός αυτός γενικά ποικίλλει μεταξύ των ειδών αλλά και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους (Mayle *et al.* 1999). Διαφοροποιείται ανάλογα με την εποχή και επηρεάζεται κυρίως από την ποιότητα του ενδιαιτήματος (πλούσιο ή φτωχό σε τροφικούς πόρους) και από τις διαφορές στη διατροφική συμπεριφορά που παρουσιάζουν τα δύο φύλα και οι ηλικιακές κλάσεις (Neff 1968, Mitchell *et al.* 1985, Mayle *et al.* 1999, Marques *et al.* 2001). Επίδραση στο συγκεκριμένο ρυθμό μπορεί επίσης να έχουν διάφορες μορφές stress, οι οποίες οφείλονται σε ποικίλα αίτια (Neff 1968, Rollins *et al.* 1984, McIntosh *et al.* 1995). Ιδανικά, ο ρυθμός αφόδευσης θα έπρεπε να εκτιμάται κάθε φορά για τον υπό μελέτη πληθυσμό. Ωστόσο, κάτι τέτοιο αποδεικνύεται πρακτικά μη εφικτό και έτσι οι ρυθμοί αφόδευσης καθορίζονται από μελέτες σε ζώα που ζουν σε αιχμαλωσία και σε περιβάλλοντα που προσομοιάζουν τα φυσικά (Mayle *et al.* 1999, Marques *et al.* 2001). Μια εναλλακτική λύση που συνήθως επιλέγεται είναι η χρήση δημοσιευμένων τιμών (Mayle *et al.* 1999).

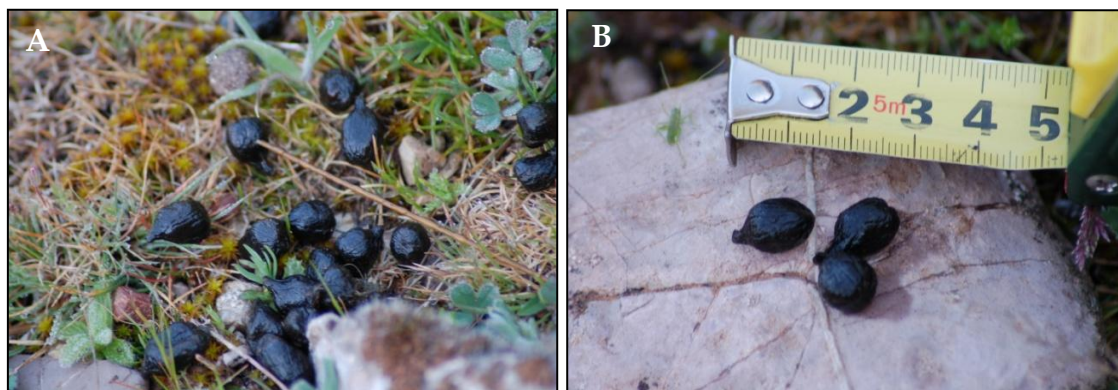
Η αποικοδόμηση των περιττωμάτων (dung decay) αναφέρεται στην εξαφάνιση των αποτεθέντων κοπρανοσωρών από το έδαφος με το πέρασμα του χρόνου, ανεξαρτήτως του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιήθηκε αυτή η διαδικασία. Η απώλεια των κοπρανοσωρών μπορεί για παράδειγμα να οφείλεται σε οργανική αποσύνθεση μέσω της δράσης μικροοργανισμών και ασπονδύλων, σε καταστροφή ή διασκορπισμό από τις μηχανικές δυνάμεις της βροχής, του ανέμου και από διερχόμενα ζώα ή απλά στην κάλυψή τους από βλάστηση ή από πεσμένα φύλλα. Η ποιότητα της τροφής, τα ειδικά χαρακτηριστικά της θέσης όπου αποτίθενται οι κοπρανοσωροί (π.χ. κλίση, βλάστηση), η υγρασία του εδάφους και διάφοροι άλλοι κλιματικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το χρόνο αποικοδόμησης, ο οποίος επομένως είναι ειδικός για κάθε είδος, ενδιαιτήμα και εποχή (Eberhardt *et al.* 1956, Neff 1968, Mayle *et al.* 1999, Marques *et al.* 2001, Laing *et al.* 2003, Charman 2004, Hemami & Dollman 2005). Η εξάρτηση της συγκεκριμένης παραμέτρου (χρόνος αποικοδόμησης) από παράγοντες που ποικίλλουν έντονα στο χώρο και το χρόνο

καθιστά αναγκαία την ακριβή εκτίμησή της ειδικά για κάθε πληθυσμό και περιοχή μελέτης τη χρονική περίοδο που πραγματοποιείται η έρευνα (Welch *et al.* 1990, Mayle *et al.* 1999).

Η βασική διαφορά μεταξύ των μεθόδων FSC και FAR έγκειται στον αριθμό των σταδίων τα οποία περιλαμβάνει η δειγματοληψία. Η FSC πραγματοποιείται σε μία επίσκεψη στην περιοχή μελέτης κατά την οποία καταμετρώνται οι κοπρανοσωροί και με τη χρήση του ρυθμού αφόδευσης και του χρόνου αποικοδόμησης υπολογίζεται η αφθονία των ζώων. Η FAR αντίθετα περιλαμβάνει δύο επισκέψεις. Στην πρώτη απομακρύνονται οι προϋπάρχοντες κοπρανοσωροί ενώ στη δεύτερη, που πρέπει να πραγματοποιείται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να εξασφαλίζεται μηδενική αποικοδόμηση, γίνεται η καταμέτρηση. Η αφθονία υπολογίζεται με βάση το ρυθμό αφόδευσης και το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο επισκέψεων (χρόνος συσσώρευσης).

Τα περιττώματα του ζαρκαδιού

Τα κόπρανα του ζαρκαδιού (βλ Εικόνα 3.1.1) είναι μικρά σε μέγεθος (14-18 mm μήκος και 6-9 mm πλάτος) ενώ το χρώμα τους είναι συνήθως μαύρο ή σκούρο καφέ (Bang & Dahlstrøm 2001). Ο αριθμός των κοπράνων που αποβάλλονται σε μία αφόδευση και επομένως συγκροτούν έναν κοπρανοσωρό ποικίλλει ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και τη διαίτα του ατόμου (Mayle *et al.* 1999). Έχουν αναφερθεί μέσες τιμές που κυμαίνονται από 50-70 κόπρανα (Mitchell *et al.* 1985). Συνήθως το ζαρκάδι αποβάλλει τα κόπρανά του στις περιοχές που τρέφεται ή αναπαύεται, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις αποδεύει καθώς κινείται, με αποτέλεσμα οι κοπρανοσωροί να βρίσκονται διασκορπισμένοι κατά μήκος της διαδρομής που έχει ακολουθήσει (Bang & Dahlstrøm 2001)



Εικόνα 3.1.1 : Α. Κοπρανοσωρός ζαρκαδιού

Β. Κόπρανα ζαρκαδιού

Στόχοι και ερωτήματα

Πληθώρα μεθοδολογικών προσεγγίσεων έχει προταθεί και εφαρμοστεί για την εκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας πληθυσμών του ζαρκαδιού στην Ευρώπη (για ανασκόπηση βλ. Meriggi *et al.* 2008). Η άμεση μέθοδος καταμέτρησης των ζώων με δειγματοληψία αποστάσεων (distance sampling) και οι έμμεσες μέθοδοι καταμέτρησης κοπρανosoωρών (pellet counts) προκρίνονται από τους ερευνητές ως επιστημονικά και τεχνικά άριστες αλλά ταυτόχρονα ακριβείς, οικονομικές και λιγότερο χρονοβόρες (Meriggi *et al.* 2008). Η πρακτική εφαρμογή και η αποδοτικότητα των μεθόδων καταμέτρησης κοπρανosoωρών έχει αξιολογηθεί κυρίως σε ενδιαιτήματα εύκρατων δασών (temperate forests) και λιβαδιών της ευρωπαϊκής ενδοχώρας και της Μεγάλης Βρετανίας (Mayle *et al.* 1999, Smart *et al.* 2004, Campbell *et al.* 2004, Hemami & Dolman 2005, Theuerkauf *et al.* 2008), που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ήπιου γεωμορφολογικού ανάγλυφου και συγκεκριμένων κλιματολογικών συνθηκών. Αντίθετα ελάχιστες είναι οι σχετικές μελέτες και οι δημοσιευμένες εργασίες σε πληθυσμούς του είδους που ζουν σε μεσογειακά οικοσυστήματα (Fattorini *et al.* 2010, Acevedo *et al.* 2010).

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόσαμε πιλοτικά τις δύο βασικές μεθόδους καταμέτρησης κοπρανosoωρών (FAR και FSC) πραγματοποιώντας δύο χρονικά ανεξάρτητα πειράματα εκτίμησης της αφθονίας των ζαρκαδιών που ζουν στο εκτροφείο Σουβάρδου Καλαβρύτων (Κεφάλαια 3.3. & 3.4). Στην περίπτωση της μεθόδου FSC, αντί της παραδοσιακής τεχνικής δειγματοληψίας σε επιφάνειες (plot sampling) χρησιμοποιήσαμε την πιο σύγχρονη τεχνική δειγματοληψίας αποστάσεων (distance sampling). Επιπλέον υπολογίσαμε το μέσο χρόνο αποικοδόμησης των κοπρανosoωρών, που ήταν απαραίτητος στη μέθοδο FSC (Κεφάλαιο 3.5). Πέραν της εκτίμησης της πυκνότητας και της αφθονίας ενός τοπικού πληθυσμού, η μελέτη μας είχε ως κύριο στόχο την αξιολόγηση των δύο μεθόδων. Οι συγκεκριμένες μεθοδολογικές προσεγγίσεις εξάλλου εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Τα ερωτήματα που τέθηκαν θα μπορούσαν σύντομα να διατυπωθούν ως εξής:

- A. Ποια τα πλεονεκτήματα, τα μειονεκτήματα και οι τεχνικές δυσκολίες εφαρμογής των μεθόδων σε ένα χαρακτηριστικό ορεινό μεσογειακό οικοσύστημα;
- B. Πόσο ακριβείς είναι οι εκτιμήσεις αφθονίας που προκύπτουν με αυτές τις μεθόδους;
- Γ. Ποιο το σχετικό τους κόστος σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό;
- Δ. Θα μπορούσαν οι συγκεκριμένες μέθοδοι να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο μιας συστηματικής παρακολούθησης των πληθυσμών των ζαρκαδιών (monitoring) στην Ελλάδα;

Περιοχή και πληθυσμός μελέτης

Το εκτροφείο Σουβάρδου (38°03'-04'N και 22°09'-10'E) είναι μια ορεινή δασική περιοχή στις βορειοδυτικές πλαγιές του Χελμού στην Πελοπόννησο. Πρόκειται για μια πλήρως περιφραγμένη έκταση με επιφάνεια 3,18 km² περίπου, που ελέγχεται και φυλάσσεται από το Δασαρχείο Καλαβρύτων. Σκοπός της δημιουργίας του εκτροφείου υπήρξε η εκτροφή θηραματικών ειδών και για το λόγο αυτό μεταφέρθηκαν και εγκλεισθηκαν σε αυτό από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 ζαρκάδια, ελάφια (*Cervus elaphus*) και αγριοπρόβατα (*Ovis aries*).

Το σχήμα του εκτροφείου είναι περίπου ορθογώνιο με τη μεγαλύτερη διάσταση κατά τη διεύθυνση Βορρά - Νότου (Εικόνα 3.2.1). Η περιοχή χαρακτηρίζεται από την παρουσία αλλεπάλληλων πλαγιών με ήπιες ή ισχυρές κλίσεις (0 - 70°) και το υψόμετρο κυμαίνεται μεταξύ 750 και 1200m. Γενικά παρατηρείται αύξηση του υψομέτρου στην κατεύθυνση Δύση - Ανατολή. Στο βόρειο, κυρίως, τμήμα του εκτροφείου συναντάμε χαρακτηριστικά απόκρημνα και βραχώδη πρανή. Στα σημεία όπου εμφανίζονται ήπιες κλίσεις το βάθος και η γονιμότητα των εδαφών είναι αυξημένα ενώ στις πλαγιές με ισχυρή κλίση τα εδάφη εμφανίζονται σκελετικά και άγονα. Το υδρογραφικό δίκτυο χαρακτηρίζεται από την παρουσία χειμάρρων και ρεμάτων.

Το κλίμα στην ευρύτερη περιοχή περιγράφεται ως «ηπειρωτικό των ορεινών παραμεσόγειων περιοχών» (Μαυροματίης 1978). Ο χειμώνας είναι σχετικά ψυχρός με μέση θερμοκρασία τους 6 °C και με συχνούς παγετούς, ενώ το καλοκαίρι είναι δροσερό με μέση θερμοκρασία τους 22 °C. Το μέσο ετήσιο ύψος βροχής κυμαίνεται μεταξύ 1100 και 1600 mm, ανάλογα με το υψόμετρο, και η κατανομή του είναι άνιση κατά μήνα και εποχές. Έτσι, το καλοκαίρι είναι ξηρό ενώ οι περισσότερες βροχοπτώσεις παρατηρούνται κατά τους φθινοπωρινούς και τους χειμερινούς μήνες. Χαρακτηριστικό της περιοχής είναι οι συχνές χιονοπτώσεις κατά τη διάρκεια του χειμώνα, που έχουν σαν αποτέλεσμα την κάλυψη της περιοχής με χιόνι, πολλές φορές για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, ιδιαίτερα στα μεγάλα υψόμετρα.

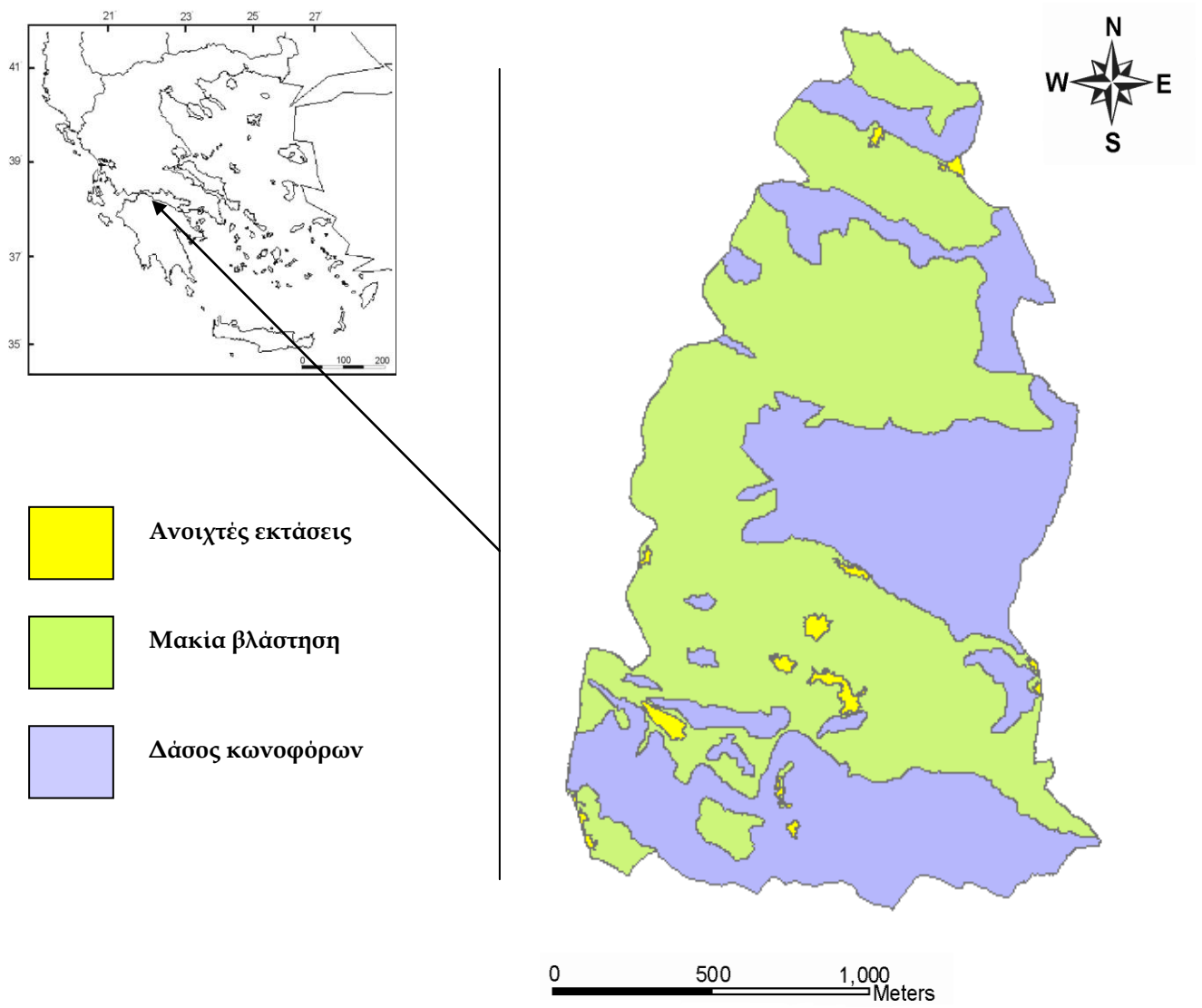
Στην περιοχή μελέτης συναντάμε τρεις βασικούς τύπους ενδιαιτημάτων που εμφανίζουν μικρό βαθμό επικάλυψης. Το μεγαλύτερο ποσοστό της έκτασης του εκτροφείου (55,6%) καταλαμβάνεται από μακία βλάστηση (**M**), με πυκνές συστάδες αειφύλλων σκληρόφυλλων ειδών και κυρίαρχα είδη τα *Quercus coccifera* (πουρνάρι), *Phillyrea media* (φιλλόκι), *Spartium junceum* (σπάρτο) και *Fraxinus ornus* (φράξος). Μικρότερη έκταση (43,2%) καταλαμβάνει ένα ώριμο δάσος κωνοφόρων (**F**) με κυρίαρχο είδος την κεφαλληνιακή ελάτη (*Abies cephalonica*), το οποίο εμφανίζει συνεχή κατανομή στη νότια και ανατολική πλευρά του εκτροφείου αλλά και διάσπαρτες νησίδες εντός της μακίας σε όλη την έκταση της περιοχής

μελέτης. Χαρακτηριστικό του ενδιαιτήματος είναι η απουσία πυκνού υποορόφου που συγκροτείται κυρίως από διάσπαρτους κέδρους (*Juniperus oxicedrus*). Με ποσοστό κάλυψης μόλις 1,2% επί της συνολικής έκτασης απαντώνται, τέλος, «ανοιχτές» χορτολιβαδικές εκτάσεις, που συγκροτούν τον τρίτο τύπο ενδιαιτήματος (Ο). Πρόκειται για μικρά ξέφωτα (διάκενα) των δασοσκεπών ή θαμνοσκεπών εκτάσεων αλλά και για εγκαταλελειμμένους αγρούς (κυρίως αμπελοκαλλιέργειες). Καλύπτονται από ποώδη ή θαμνώδη χαμηλή βλάστηση αγρωστωδών και ψυχανθών (*Phleum pretense*, *Brachypodium pinnatum*, *Poa bulbosa*, *Lusula sp.* κ.ά).

Οι ανθρώπινες παρεμβάσεις θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν περιορισμένες και πάντως όχι ικανές να αλλοιώσουν τη φυσιογνωμία της περιοχής ή να της προσδώσουν ένα χαρακτήρα τεχνητού οικοσυστήματος. Εκτός της συρμάτινης περιφραξης ύψους δύο μέτρων που κατασκευάστηκε για να οριοθετήσει το εκτροφείο και να προστατέψει τα ζώα από το παράνομο κυνήγι και τους φυσικούς θηρευτές τους, έχει διανοιχτεί ένα μικρό δίκτυο χωμάτινων δρόμων συνολικού μήκους περίπου τεσσάρων χιλιομέτρων και έχει χτιστεί μια μικρή ξύλινη αποθήκη κοντά στην είσοδο του εκτροφείου. Η πρόσβαση στο εκτροφείο επιτρέπεται μόνο στους αρμόδιους φύλακες του Δασαρχείου και συνεπώς η όχληση περιορίζεται στο ελάχιστο.

Η απουσία αξιόπιστων χαρτογραφικών δεδομένων που ήταν απαραίτητα για τη διεξαγωγή οποιασδήποτε έρευνας οδήγησε στην ανάγκη χαρτογράφησης της περιοχής μελέτης. Αρχικά με τη χρήση φορητής συσκευής GPS, προσδιορίστηκε επακριβώς η περίμετρος της περιοχής μελέτης σε επίπεδο συντεταγμένων. Στη συνέχεια, με τη χρήση του προγράμματος Arc Map (©ESRI, Inc), δορυφορικές απεικονίσεις και επιτόπια παρατήρηση, κατέστη δυνατή η αποτύπωση της κατανομής και ο υπολογισμός της επιφάνειας που καλύπτουν τα διάφορα είδη ενδιαιτήματος (βλ. Χάρτη εικόνας 3.2.1).

Μια σειρά χαρακτηριστικών του πληθυσμού ζαρκαδιών των Καλαβρύτων, τον καθιστούν ιδανική επιλογή για την εφαρμογή μεθόδων πληθυσμιακής εκτίμησης. Καταρχάς, πρόκειται για έναν κλειστό πληθυσμό, γεγονός που αποκλείει τη διακόμανση του μεγέθους του λόγω μεταναστεύσεων κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των ερευνών. Επίσης, σύμφωνα με προϋπάρχουσες εμπειρικές εκτιμήσεις από το προσωπικό του Δασαρχείου, ο πληθυσμός θα μπορούσε να χαρακτηριστεί «εύρωστος», με μέγεθος περίπου 50-60 ατόμων, αριθμός που μεταφράζεται σε μια εκτιμώμενη πυκνότητα 15-18 ατόμων ανά τετραγωνικό χιλιόμετρο. Επιπλέον ο πληθυσμός αυτός ζει σε μια περιοχή σαφώς ορισμένη και περιορισμένης έκτασης, γεγονός που επιτρέπει εντατική διερεύνηση συμβατή με το διαθέσιμο χρόνο και το ανθρώπινο δυναμικό. Η φυσιογνωμία της βλάστησης και η διαμόρφωση του τοπίου είναι αντιπροσωπευτικές των ορεινών μεσογειακών οικοσυστημάτων και απαντώνται σε αρκετές περιοχές της Ελλάδας, όπου εξαπλώνεται φυσικά το ζαρκάδι (Εικόνες 3.2.2 & 3.2.3)



Εικόνα 3.2.1 : Χάρτης περιοχής εκτροφείου Σουβάρδου



Εικόνα 3.2.2 : Εκτροφείο Σουβάρδου. Μερική άποψη όπου διακρίνεται η μακία βλάστηση και ένα χαρακτηριστικό διάκενο



Εικόνα 3.2.3 : Εκτροφείο Σουβάρδου. Μερική άποψη των δασοσκεπών εκτάσεων.

Εφαρμογή της μεθόδου FAR

1. Γενικά

Η μέθοδος FAR έχει προταθεί ως μια αξιόπιστη και πρακτική μέθοδος εκτίμησης της πληθυσμιακής πυκνότητας των ελαφοειδών και έχει εφαρμοστεί σε ποικιλία δασικών οικοσυστημάτων (Padaiga & Marma 1979, Bailey & Putman 1981, Putman 1984, Mitchell *et al.* 1985, Staines & Ratcliffe 1987, Prokešová *et al.* 2006). Πρόκειται στην ουσία για μια περίπτωση δειγματοληψίας με πλήρη καταγραφή σε δειγματοληπτικές επιφάνειες (plot sampling). Στις δειγματοληψίες αυτές ένα μόνο μέρος της περιοχής μελέτης ερευνάται για άτομα ή βιοδηλωτικά ίχνη και υπολογίζεται η αφθονία τους σε επιφάνειες (plots) συγκεκριμένου σχήματος και διαστάσεων (βλ. Εικόνα 3.3.1). Η βασική αρχή είναι η αναγωγή (“scale up”) της εκτιμώμενης πυκνότητας από την περιοχή έρευνας (το σύνολο δηλαδή των δειγματοληπτικών επιφανειών) σε ολόκληρη την περιοχή μελέτης (Borchers *et al.* 2002). Το σχήμα των δειγματοληπτικών επιφανειών μπορεί να είναι τετράγωνο, λωρίδα (strip) ή κύκλος χωρίς να υπάρχει διαφοροποίηση στην στατιστική επεξεργασία. Σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ώστε να εξασφαλίζεται η αντικειμενικότητα των μετρήσεων είναι η τυχαία επιλογή των δειγματοληπτικών επιφανειών στην περιοχή μελέτης.

Η FAR ως έμμεση μέθοδος, όπως έχει προαναφερθεί, στηρίζεται στην εκτίμηση της πυκνότητας κοπρανοσωρών για τον υπολογισμό της πυκνότητας των ζώων που τα παρήγαγαν σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Περιλαμβάνει μεθοδολογικά τα παρακάτω βήματα (Bailey & Putman 1981, Putman 1984, Mitchell *et al.* 1985, Mayle *et al.* 1999):

- μία πρώτη επίσκεψη στην περιοχή μελέτης, κατά την οποία ορίζεται η δειγματοληπτική επιφάνεια και καθαρίζεται από προϋπάρχοντες κοπρανοσωρούς.
- ένα μεσοδιάστημα κατά τη διάρκεια του οποίου συσσωρεύονται τα περιττώματα των μελετώμενων ζώων και
- μία δεύτερη επίσκεψη στην οποία καταμετρώνται και καταγράφονται οι συσσωρευμένοι κοπρανοσωροί.

Η δεύτερη επίσκεψη πρέπει να γίνεται σε ένα επαρκώς σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να εξασφαλίζεται ότι κανένας από τους κοπρανοσωρούς που αποτέθηκαν δεν αποικοδομήθηκε. Με αυτό τον τρόπο αίρεται η ανάγκη υπολογισμού του μέσου χρόνου αποικοδόμησης (decay rate) και απαιτείται μόνο η γνώση του ρυθμού αφόδευσης (defecation rate) για την εκτίμηση της πυκνότητας του υπό μελέτη πληθυσμού (Mayle 1996).

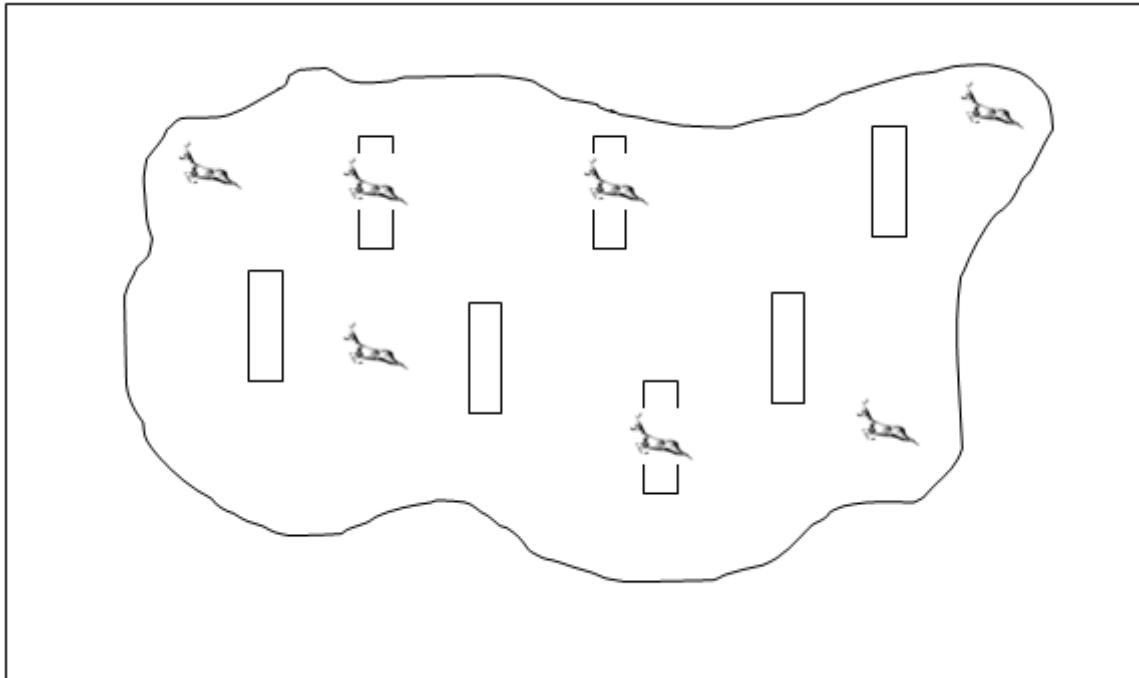
Βασική υπόθεση για την ισχύ της μεθόδου και επομένως την αμερόληπτη εκτίμηση της πληθυσμιακής πυκνότητας είναι η καταμέτρηση όλων των κοπρανοσωρών που συσσωρεύτηκαν σε κάθε δειγματοληπτική επιφάνεια (Mayle 1996). Η ελλιπής καταμέτρηση των κοπρανοσωρών, λόγω αδυναμίας εντοπισμού τους, οδηγεί σε υποεκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας των ζώων. Η τήρηση της συνθήκης απόλυτου εντοπισμού υπαγορεύει εν πολλοίς το μέγεθος που πρέπει να έχουν οι δειγματοληπτικές επιφάνειες. Επιφάνειες πολύ μεγάλου εμβαδού είναι δύσκολο να ερευνηθούν με αξιοπιστία και επομένως μπορεί να οδηγήσουν σε ελλείψεις καταμετρήσεις των κοπρανοσωρών.

Σύμφωνα με τους Mitchell *et al.* (1985) και Mayle *et al.* (1999) η καλύτερη χρονική περίοδος για τη διεξαγωγή FAR πειραμάτων είναι τα τέλη του χειμώνα ή οι αρχές της άνοιξης, ενώ το διάστημα συσσώρευσης 2-3 μηνών είναι σε γενικές γραμμές ικανοποιητικό. Οι καιρικές συνθήκες αυτής της εποχής (κυρίως η θερμοκρασία) δεν επιτρέπουν την ταχεία αποσύνθεση των κοπρανοσωρών ενώ αποκλείεται και η δράση κοπροφάγων εντόμων (π.χ. κολεοπτέρων). Επίσης, η ανάπτυξη των ποωδών φυτών είναι μικρή, γεγονός που επιτρέπει την ευκολότερη ανίχνευση των κοπράνων στο έδαφος.

Σημαντικός περιορισμός στη χρήση και την αξιοπιστία της FAR θεωρείται σύμφωνα με αρκετές μελέτες (π.χ. Mayle *et al.* 1999, Smart *et al.* 2004) η χαμηλή πυκνότητα ζώων στην περιοχή μελέτης, αφού οδηγεί σε μεγάλο αριθμό μηδενικών παρατηρήσεων (πολλές δειγματοληπτικές επιφάνειες χωρίς συσσώρευση κοπρανοσωρών) και επομένως σε χαμηλή ακρίβεια (precision). Η αύξηση του μεγέθους των δειγματοληπτικών επιφανειών και του χρόνου συσσώρευσης μειώνει την πιθανότητα μηδενικών παρατηρήσεων.

Στο σχεδιασμό μιας τέτοιας έρευνας το μέγεθος των δειγματοληπτικών επιφανειών αποκτά κομβική σημασία για την επίτευξη αμερόληπτων μετρήσεων. Οι πολλές και μικρές επιφάνειες πλεονεκτούν γιατί διερευνώνται ευκολότερα και εξασφαλίζουν τον πλήρη εντοπισμό των κοπρανοσωρών αλλά μειονεκτούν γιατί μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένο αριθμό μηδενικών παρατηρήσεων ενώ ταυτόχρονα αποδεικνύονται δαπανηρές σε χρόνο και προσπάθεια, καθώς η μετακίνηση από σημείο σε σημείο συνήθως είναι πιο χρονοβόρα από την ίδια τη διαδικασία καταμέτρησης (Neff 1968, Mitchell *et al.* 1985). Οι λίγες και εκτεταμένες επιφάνειες, από την άλλη, αυξάνουν το ενδεχόμενο συσσώρευσης κοπρανοσωρών και μειώνουν το χρόνο που απαιτείται για τη διεξαγωγή της έρευνας, μειώνοντας το χρόνο των μετακινήσεων (Neff 1968) αλλά δυσχεραίνουν τον εντοπισμό των κοπρανοσωρών. Οι Mitchell *et al.* (1985) πρότειναν ότι για την εκτίμηση ελαφοειδών με τη μέθοδο FAR οι πιο πρόσφορες επιφάνειες είναι αυτές με εμβαδό που κυμαίνεται μεταξύ 50 m² και 200 m². Οι Mayle *et al.* (1999) θεωρούν ότι δειγματοληπτικές επιφάνειες με εμβαδό 100 m² είναι ιδανικές όταν στην δειγματοληψία συμμετέχουν δύο ερευνητές. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι εκτιμήσεις αυτές για το μέγεθος των δειγματοληπτικών επιφανειών έχουν προκύψει από παρατηρήσεις σε δασικά οικοσυστήματα της Μ. Βρετανίας.

Το σχήμα της δειγματοληπτικής επιφάνειας δεν διαφοροποιεί τη στατιστική επεξεργασία αλλά μπορεί ενδεχομένως να επηρεάσει την ευστοχία των μετρήσεων. Γενικά, για σχήματα με την ίδια επιφάνεια προτιμώνται εκείνα με μικρότερη περίμετρο, καθώς όσο μειώνεται το μήκος της περιμέτρου μειώνεται και η πιθανότητα να υποπέσει ο ερευνητής σε σφάλματα ερμηνείας σχετικά με το αν συγκεκριμένοι κοπρανosoφοί κείτονται μέσα στη δειγματοληπτική περιοχή ή όχι (edge effect) (Neff 1968, Krebs 1999, Mayle *et al.* 1999, Marques *et al.* 2001). Ωστόσο, όταν η περιοχή μελέτης παρουσιάζει ετερογένεια και μωσαϊκότητα σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, τα μακρόστενα σχήματα θεωρούνται καταλληλότερα από τα κυκλικά ή τετράγωνα, καθώς είναι πιο αντιπροσωπευτικά (Neff 1968, Krebs 1999). Επίσης η διερεύνηση σε μακρόστενα σχήματα (λωρίδες) αποδεικνύεται πρακτικά ευκολότερη και πιο ακριβής.



Εικόνα 3.3.1: Απλοποιημένο σχήμα δειγματοληψίας με πλήρη καταγραφή σε δειγματοληπτικές επιφάνειες (plot sampling).

2. Έρευνα πεδίου

Η εκτίμηση του πληθυσμού ζαρκαδιών του εκτροφείου με τη χρήση της μεθόδου FAR πραγματοποιήθηκε την άνοιξη του 2006. Η πρώτη επίσκεψη, κατά την οποία καθορίστηκαν οι δειγματοληπτικές επιφάνειες και απομακρύνθηκαν οι κοπρανosoφοί που υπήρχαν ήδη σε αυτές, διήρκεσε συνολικά εννέα ημέρες (1-9 Απριλίου 2006), ενώ η δεύτερη, στην οποία

καταμετρήθηκαν οι συσσωρευμένοι κοπρανοσωροί, ήταν συντομότερη και διήρκεσε συνολικά έξι ημέρες (28 Μαΐου - 2 Ιουνίου 2006). Για τη διενέργεια της όλης έρευνας εργάστηκαν ταυτόχρονα δύο ερευνητές.

Το χρονικό διάστημα συσσώρευσης των κοπρανοσωρών, που αντιστοιχεί και στο χρονικό διάστημα για το οποίο εκτιμήθηκε η πληθυσμιακή πυκνότητα ήταν περίπου δύο μήνες (Απρίλιος και Μάιος). Η επιλογή της συγκεκριμένης περιόδου έγινε ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιδράσεις της αποικοδόμησης και της περιορισμένης ανίχνευσης των κοπρανοσωρών. Η ιδιαίτερη φυσιογνωμία της περιοχής μελέτης (ορεινά ενδιαίτηματα) και οι κλιματικές συνθήκες επέβαλαν τη μετάθεση της περιόδου πραγματοποίησης της έρευνάς μας κατά έναν μήνα (Απρίλιος-Μάιος) σε σχέση με τα προτεινόμενα. Για να εξασφαλίσουμε, ωστόσο, ότι πράγματι δεν υπήρχε αποικοδόμηση κατά το διάστημα συσσώρευσης προχωρήσαμε στη διενέργεια ενός παράλληλου πειράματος ελέγχου της υπόθεσης. Πιο συγκεκριμένα, κατά την πρώτη επίσκεψη εντοπίστηκαν 18 «φρέσκοι» κοπρανοσωροί (έξι για κάθε έναν από τους τρεις τύπους ενδιαιτημάτων F,M,O) σε τυχαία σημεία στην περιοχή μελέτης. Με τη βοήθεια φορητής συσκευής GPS καταγράφηκε η ακριβής θέση τους, καταμετρήθηκε ο αριθμός των κοπράνων και σημάνθηκε το σημείο απόθεσής τους. Στη δεύτερη επίσκεψη ελέγχθηκε εάν και σε ποιο βαθμό είχαν υποστεί αποικοδόμηση.

Το σχήμα της δειγματοληπτικής επιφάνειας (plot) που επιλέχθηκε ήταν ορθογώνιο με διαστάσεις 4×15m. Η ύπαρξη μιας μεγάλης διάστασης (15m) επιτρέπει την αντιπροσωπευτικότερη σάρωση της ποικιλομορφίας του εδάφους και των μικροενδιαιτημάτων. Παρά το γεγονός ότι τα ορθογώνια σχήματα έχουν για το ίδιο εμβαδό μεγαλύτερη περίμετρο σε σχέση με τα τετράγωνα ή τις κυκλικές επιφάνειες και άρα ελλοχεύει ο κίνδυνος αυξημένου *edge effect* (Krebs 1999), η διερεύνηση για τον εντοπισμό των κοπρανοσωρών σε αυτά είναι συγκριτικά ευκολότερη και πιο αξιόπιστη. Επιπλέον, για την αποφυγή σφαλμάτων ελλιπούς ανίχνευσης υιοθετήθηκε μια μεθοδική και συστηματική τακτική αναζήτησης. Ο κάθε ένας από τους δύο ερευνητές ανέλαβε να εξετάσει τη μισή επιφάνεια (2x15m). Μια τέτοια επιφάνεια με μορφή λωρίδας μπορεί να σαρωθεί εύκολα, αποτελεσματικά και χωρίς απώλειες, καθώς ο ερευνητής, κινούμενος κατά μήκος της λωρίδας, μπορεί με επιτυχία να ανιχνεύσει κοπρανοσωρούς που βρίσκονται σε απόσταση ενός μέτρου εκατέρωθέν του. Για την επιβεβαίωση της ορθότητας των μετρήσεων η επιφάνεια σαρώθηκε εις διπλούν με τους δύο ερευνητές να ελέγχουν επαναληπτικά ο ένας την περιοχή του άλλου.

Για την κατανομή των δειγματοληπτικών επιφανειών χρησιμοποιήθηκε ουσιαστικά ένας συνδυασμός τυχαίας και συστηματικής δειγματοληψίας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Με τυχαίο τρόπο (από πρόγραμμα παραγωγής τυχαίων αριθμών) επιλέχθηκε το πρώτο σημείο σε επίπεδο συντεταγμένων, το οποίο αντιστοιχούσε σε μια δειγματοληπτική επιφάνεια. Η απόσταση μεταξύ των δειγματοληπτικών επιφανειών ορίστηκε εκ των προτέρων σε 300m. Στη συνέχεια, με αφετηρία το σημείο αυτό

κατασκευάστηκε ένα συστηματικό πλέγμα (grid) με βάση το οποίο υπολογίστηκαν οι συντεταγμένες των υπόλοιπων σημείων, τα οποία προφανώς ισαπέχουν. Με την επιλογή αυτού του τύπου δειγματοληψίας (τυχαία συστηματική) εξασφαλίζεται η τυχαιότητα και κατ' επέκταση η αποφυγή «μεροληπτικών» σφαλμάτων, αλλά και η ισότιμη διασπορά των δειγματοληπτικών επιφανειών σε ολόκληρη την έκταση της περιοχής μελέτης. Με τη βοήθεια φορητής συσκευής GPS έγινε στο πεδίο ο εντοπισμός του ακριβούς σημείου δειγματοληψίας σύμφωνα με τις εκ των προτέρων και «επί χάρτου» προσδιορισμένες συντεταγμένες του. Συνολικά στα πλαίσια της έρευνας διερευνήθηκαν 44 δειγματοληπτικές επιφάνειες.

Ο καθορισμός της κάθε δειγματοληπτικής επιφάνειας στο πεδίο έγινε με τη χρήση σχοινιών και πάσσαλων (βλ. Εικόνα 3.3.2). Στην πρώτη επίσκεψη τέσσερις πάσσαλοι τοποθετήθηκαν στο έδαφος στις κατάλληλες αποστάσεις, ορίζοντας τις κορυφές ενός ορθογωνίου παραλληλογράμμου. Το σχοινί απλώθηκε οριοθετώντας τις πλευρές. Μετά τον καθαρισμό της επιφάνειας από υπάρχοντες κοπρασφόρους το σχοινί απομακρύνθηκε για να μην επηρεάσει η παρουσία του τη συμπεριφορά των ζώων κατά το διάστημα συσσώρευσης, ενώ οι πάσσαλοι παρέμειναν ώστε να εξασφαλιστεί ότι στη δεύτερη επίσκεψη θα διερευνηθεί ακριβώς η ίδια επιφάνεια. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να οριστούν μόνιμες δειγματοληπτικές επιφάνειες και να επαναλαμβάνεται η μέθοδος FAR σε ετήσια βάση.



Εικόνα 3.3.2 : Δειγματοληπτική επιφάνεια (plot)

Για να θεωρηθεί ένας κοπρανosoωρός ότι δεν έχει αποικοδομηθεί και επομένως να καταμετρηθεί προαποφασίστηκε ότι θα έπρεπε να αποτελείται από τουλάχιστον έξι κόπρανα (Mayle *et al.* 1999, Laing *et al.* 2003, Smart *et al.* 2004) ενώ για την καταμέτρηση στην περίμετρο της δειγματοληπτικής επιφάνειας αποφασίστηκε η συνεκτίμηση των κοπρανosoωρών των οποίων η πλειοψηφία των κοπράνων κείτονταν εντός της οριοθετημένης από το σχοινί γραμμής. Η εκ των προτέρων διατύπωση και τήρηση κανόνων καταμέτρησης ελαττώνει την επίδραση ερμηνευτικών σφαλμάτων και κατά αυτό τον τρόπο εξασφαλίζει την αντικειμενικότητα των μετρήσεων.

Στο εκτροφείο Σουβάρδου υπάρχουν εκτός από το ζαρκαδι δύο ακόμη είδη οπληφόρων (ελάφι και αγριοπρόβατο), τα οποία αφήνουν τα περιττώματά τους σε κοπρανosoωρούς. Η αδυναμία ορθής αναγνώρισης της προέλευσης κάθε κοπρανosoωρού είναι μια πηγή ενδεχόμενου σφάλματος και θα μπορούσε να δημιουργήσει υποεκτιμήσεις ή υπερεκτιμήσεις του αριθμού των κοπρανosoωρών του ζαρκαδιού. Η διάκριση των περιττωμάτων του ελαφιού και του ζαρκαδιού ήταν εύκολη λόγω των σημαντικών διαφορών στη μορφή και το μέγεθος των κοπράνων (Mayle *et al.* 1999, Bang & Dahlstrøm 2001) και δεν αποτέλεσε ουσιαστικό πρόβλημα. Αντίθετα, τα κόπρανα των αγριοπροβάτων έχουν παρόμοιες διαστάσεις (Mayle *et al.* 1999, Bang & Dahlstrøm 2001) με αυτά του ζαρκαδιού, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει την αξιοπιστία των μετρήσεων. Για να περιορίσουμε αυτό το ενδεχόμενο πραγματοποιήσαμε προκαταρκτικές παρατηρήσεις, ώστε να αποκτήσουμε την απαραίτητη εμπειρία αναγνώρισης των κοπράνων στο πεδίο. Η συλλογή κοπρανosoωρών μετά από παρακολούθηση ζώων και των δύο ειδών μας έδωσε τη δυνατότητα να κάνουμε τις απαραίτητες ταυτοποιήσεις. Αναλυτικά στοιχεία για τον τρόπο διάκρισης των κοπρανosoωρών του ζαρκαδιού και του αγριοπροβάτου δίνονται στην εργασία της Σταμούλη (2008).

3. Αναλύσεις

Σε κάθε δειγματοληπτική επιφάνεια (plot) i ($i=1-44$) η εκτιμώμενη πυκνότητα

ζαρκαδιών \hat{D}_i δίνεται από τον τύπο:
$$\hat{D}_i = \frac{n}{d \times \Delta t \times S} \quad [\text{Εξίσωση 3.3.1}],$$

όπου n είναι ο αριθμός των διακριτών κοπρανosoωρών που συσσωρεύτηκαν, d ο ρυθμός αφόδευσης (defecation rate), Δt ο χρόνος συσσώρευσης ή αλλιώς το χρονικό διάστημα μεταξύ πρώτης και δεύτερης επίσκεψης και S η έκταση της δειγματοληπτικής επιφάνειας. Ο ρυθμός αφόδευσης θεωρήθηκε σταθερός και ίσος με 20 κοπρανosoωρούς/ημέρα (Mitchell *et al.* 1985, McIntosh *et al.* 1995, Mayle *et al.* 1999) και η έκταση της κάθε δειγματοληπτικής επιφάνειας σύμφωνα με το σχεδιασμό $s=60\text{m}^2$.

Η μέση πυκνότητα \bar{D} εκτιμήθηκε με βάση τον τύπο: $\bar{D} = \frac{\sum \hat{D}_i}{44}$ [Εξίσωση 3.3.2],

ενώ το τυπικό σφάλμα (se), και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) υπολογίστηκαν με τη διαδικασία bootstrap και πλήθος επαναδειγματοληψιών $B=2000$ (Efron & Tibshirani 1993).

Η εκτίμηση της συνολικής αφθονίας \hat{N} των ζαρκαδιών του εκτροφείου έγινε με τη σχέση: $\hat{N} = \bar{D} \times A$ [Εξίσωση 3.3.3],

όπου A η συνολική έκταση του εκτροφείου που ισούται με $3,18 \text{ km}^2$. Με χρήση των τιμών των ορίων εμπιστοσύνης της μέσης τιμής της πυκνότητας (άνω όριο και κάτω όριο) στην Εξίσωση 3.3.3 καθορίστηκε το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για την τιμή της αφθονίας. Για τους μαθηματικούς υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το πακέτο λογισμικού R v.2.4.0 (R Development Core Team 2006).

Ως μέτρο της ακρίβειας (precision) των εκτιμήσεων της πυκνότητας και της αφθονίας χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής μεταβολής %CV (coefficient of variation), που ισούται με το πηλίκο του τυπικού σφάλματος προς τη μέση τιμή της εκτίμησης (Buckland *et al.* 2001, Marques *et al.* 2001, Campbell *et al.* 2004).

Η περιγραφή της προσπάθειας που καταβλήθηκε στη δειγματοληψία της μεθόδου FAR σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό έγινε με έναν κοινά αποδεκτό όρο, που συνδυάζει τις δύο αυτές παραμέτρους: την ανθρωποημέρα (manday) εργασίας. Η προσπάθεια σε ανθρωποημέρες προκύπτει ως το γινόμενο του αριθμού των ερευνητών που συμμετείχαν στην έρευνα επί τον αριθμό των ημερών που εργάστηκαν στο πεδίο. Προφανώς ο χρόνος εργασίας περιλαμβάνει τόσο το χρόνο δειγματοληψίας όσο και το χρόνο μετακίνησης μεταξύ των δειγματοληπτικών επιφανειών. Η προσπάθεια υπολογίστηκε για κάθε επίσκεψη ξεχωριστά (1^η και 2^η) αλλά και συνολικά.

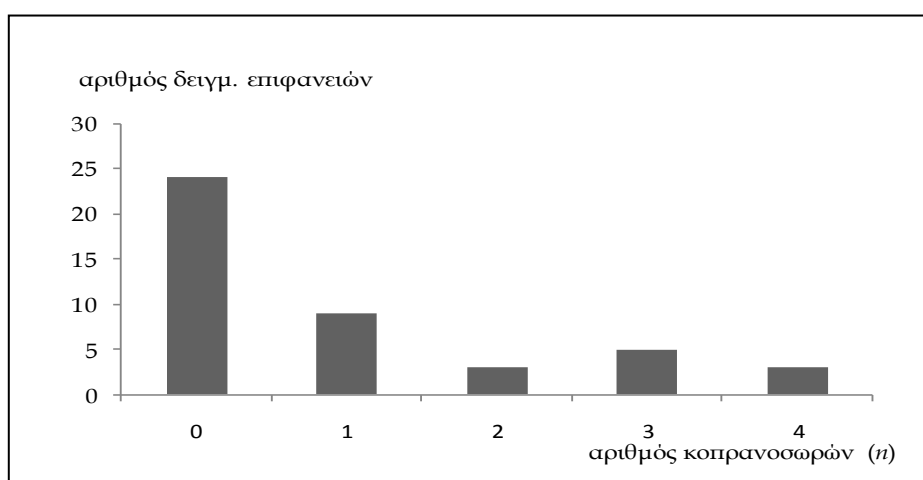
4. Αποτελέσματα

Πείραμα ελέγχου υπόθεσης μηδενικής αποικοδόμησης

Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία, πριν από οποιαδήποτε ενέργεια, πραγματοποιήθηκε επίσκεψη στα σημεία όπου είχαν τοποθετηθεί οι κοπρανοσωροί-μάρτυρες ώστε να ελεγχθεί η ενδεχόμενη αποικοδόμησή τους. Ο αριθμός των κοπράνων είχε μειωθεί αλλά κανείς από τους 18 κοπρανοσωρούς δεν είχε χαθεί ολοκληρωτικά (όλοι περιείχαν τουλάχιστον έξι κόπρανα). Επομένως επιβεβαιώθηκε η υπόθεση την οποία είχαμε κάνει κατά το σχεδιασμό του πειράματος ότι κατά το χρονικό διάστημα των δύο μηνών που επιλέξαμε για τη συσσώρευση των κοπρανοσωρών δεν υπήρξαν απώλειες λόγω αποικοδόμησης.

Συσσωρευμένοι κοπρανοσώροι

Στον Πίνακα 3.3.1 και στις σχετικές στήλες παρουσιάζονται ο αριθμός των κοπρανοσωρών n που συσσωρεύτηκαν σε κάθε δειγματοληπτική επιφάνεια και το αντίστοιχο χρονικό διάστημα συσώρευσης Δt . Κοπρανοσώροι βρέθηκαν σε 20 από τις 44 δειγματοληπτικές επιφάνειες και ο αριθμός τους κυμάνθηκε από έναν έως τέσσερεις ανά επιφάνεια. Αναλυτικά η συχνότητα του αριθμού κοπρανοσωρών παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.3.1. Συνολικά σε όλες τις δειγματοληπτικές επιφάνειες συσσωρεύτηκαν 42 κοπρανοσώροι.



Γράφημα 3.3.1 : Συχνότητα του αριθμού κοπρανοσωρών (n)

Ποκνότητα

Με αντικατάσταση των τιμών για n , Δt , S και $d=20$ στην Εξίσωση 3.3.1 υπολογίστηκε η εκτιμώμενη με βάση την κάθε δειγματοληπτική επιφάνεια ποκνότητα \hat{D}_1 , \hat{D}_2 ... \hat{D}_{44} . Τα αποτελέσματα, που δίνονται στον πίνακα 3.3.1, δείχνουν μια διακύμανση της εκτιμώμενης ποκνότητας από 0 έως 60,61 ζαρκάδια/km².

Η μέση ποκνότητα που υπολογίστηκε με βάση την Εξίσωση 3.3.2 ήταν: $\bar{D} = 13,86$ άτομα/km² με τυπικό σφάλμα $se = 2,87$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95% CI= 8,72- 20,02 άτομα/km².

Από τις τιμές της μέσης ποκνότητας και του τυπικού σφάλματος υπολογίστηκε ο συντελεστής μεταβολής: $CV=20,7\%$

Πίνακας 3.3.1 : Αριθμός κοπρανοσφρών που συσσωρεύτηκαν (n) και εκτιμώμενη ποκνότητα ζαρκαδιών (D_i) σε κάθε δειγματοληπτική επιφάνεια (plot)

[S: έκταση δειγματοληπτικής επιφάνειας, Δt : χρονικό διάστημα συσσώρευσης, F: δάσος κωνοφόρων, Μ: μακία βλάστηση, Ο: ανοιχτές εκτάσεις]

plot	ενδιαίτημα	Δt (ημέρες)	n	S (m ²)	D_i (άτομα/ km ²)
1	F	55	4	60	60,6
2	F	55	0	60	0
3	F	57	3	60	43,9
4	M	57	1	60	14,6
5	M	57	0	60	0
6	M	56	0	60	0
7	M	55	0	60	0
8	F	53	0	60	0
9	M	55	0	60	0
10	F	57	0	60	0
11	O	62	4	60	53,8
12	F	62	1	60	13,4
13	F	55	0	60	0
14	F	55	0	60	0
15	M	55	1	60	15,2
16	F	56	3	60	44,6
17	M	56	0	60	0
18	M	58	2	60	28,7
19	F	58	0	60	0
20	F	58	1	60	14,4
21	F	60	1	60	13,9
22	F	56	2	60	29,8
23	M	56	0	60	0
24	F	56	0	60	0
25	O	58	4	60	57,47
26	F	60	0	60	0
27	F	60	1	60	13,9
28	F	54	2	60	30,9
29	M	56	0	60	0
30	F	56	0	60	0
31	F	56	0	60	0
32	M	56	1	60	14,9
33	O	58	3	60	43,1
34	F	57	3	60	43,9
35	F	58	0	60	0
36	F	58	1	60	14,4
37	F	58	0	60	0
38	F	56	0	60	0
39	M	58	0	60	0
40	F	58	0	60	0
41	F	57	0	60	0
42	F	58	0	60	0
43	F	57	1	60	14,6
44	F	57	3	60	43,9

Αφθονία

Η αφθονία των ζαρκαδιών εκτιμήθηκε με τη χρήση της Εξίσωσης 3.3.3 και $A=3,18\text{km}^2$:

$N= 44,07$ ζαρκάδια με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 95% $CI= 27,73- 63,66$ ζαρκάδια.

Προφανώς ο συντελεστής μεταβολής %CV της αφθονίας είναι ίσος με αυτόν της πυκνότητας. Στρογγυλοποιώντας τις τιμές ώστε να είναι ακέραιες μπορούμε να καταλήξουμε στην εκτίμηση:

$N=44$ ζαρκάδια με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 28-64.

Προσπάθεια

Συνολικά για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης έρευνας απαιτήθηκαν 30 ανθρωποημέρες. Η πρώτη φάση ήταν περισσότερο χρονοβόρα καθώς περιελάμβανε τόσο τον ακριβή καθορισμό της κάθε δειγματοληπτικής επιφάνειας (τοποθέτηση πασσάλων και σχοινιών) όσο και τον εξονυχιστικό καθαρισμό της από τους πολλούς προϋπάρχοντες κοπρανοσωρούς (Πίνακας 3.3.2). Με τη συγκεκριμένη προσπάθεια διερευνήθηκε έκταση 2640 m^2 (44 plots) που αντιστοιχεί στο 0,083% της επιφάνειας της περιοχής μελέτης.

Πίνακας 3.3.2 : Προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου FAR

Προσπάθεια	ημέρες	ερευνητές	ανθρωποημέρες	αριθμός plot/ανθρωποημέρα*
1η επίσκεψη	9	2	18	2,4
2η επίσκεψη	6	2	12	3,7
Σύνολο	15	2	30	1,5

* Συμπεριλαμβάνεται ο χρόνος μετακίνησης μεταξύ των δειγματοληπτικών επιφανειών

Εφαρμογή της μεθόδου FSC με δειγματοληψία αποστάσεων (distance sampling)

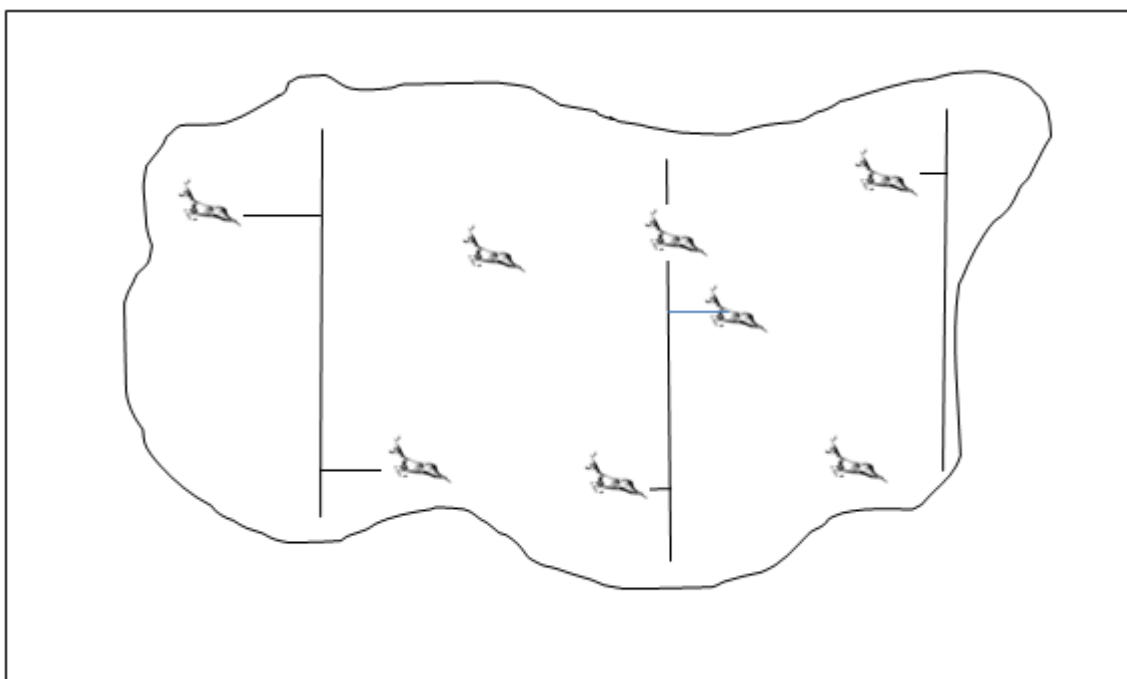
1. Γενικά

Η δειγματοληψία αποστάσεων (Buckland *et al.* 2001) είναι μια από τις πλέον χρησιμοποιούμενες σύγχρονες μεθόδους εκτίμησης της πυκνότητας και της αφθονίας βιολογικών πληθυσμών και έχει εφαρμοστεί στη μελέτη της οικολογίας τόσο χερσαίων (κυρίως πτηνών και θηλαστικών) όσο και θαλάσσιων οργανισμών (θηλαστικά, μαλάκια) (ενδεικτικά: Focardi *et al.* 2002, Calambokidis *et al.* 2004, Ogutu *et al.* 2006, Katsanevakis 2007, Gasner *et al.* 2010). Δύο είναι οι βασικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις που ενσωματώνουν τη φιλοσοφία της δειγματοληψίας αποστάσεων: η γραμμική δειγματοληψία (line transect sampling) (βλ. Εικόνα 3.4.1) και η σημειακή δειγματοληψία (point transect sampling). Και στις δύο περιπτώσεις η βασική ιδέα είναι η ίδια. Ο ερευνητής πραγματοποιεί μια τοποποιημένη έρευνα αναζητώντας τα αντικείμενα του ενδιαφέροντος (συνήθως τα ζώα-στόχους) διατρέχοντας μια σειρά από προκαθορισμένες ευθείες διαδρομές (line transect) ή σημεία (point transect). Για κάθε αντικείμενο που εντοπίζει (μέχρι μια προκαθορισμένη απόσταση από τη γραμμή ή το σημείο) καταγράφει την κάθετη απόσταση από τη γραμμή ή το σημείο. Δεν είναι απαραίτητο και πρακτικά αποδεικνύεται ανέφικτο να εντοπιστούν όλα τα αντικείμενα στις επιφάνειες δειγματοληψίας αλλά βασική υπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι να υπάρχει απόλυτος εντοπισμός των αντικειμένων που βρίσκονται πολύ κοντά στη γραμμή ή το σημείο (σε πρακτικά μηδενική απόσταση). Διαισθητικά θα ανέμενε κανείς ότι όσο πιο απομακρυσμένα είναι τα αντικείμενα τόσο δυσκολότερος είναι ο εντοπισμός τους και επομένως ο αριθμός των παρατηρούμενων αντικειμένων μειώνεται με την απόσταση από τη γραμμή ή το σημείο. Το «κλειδί» στη δειγματοληψία αποστάσεων είναι η προσαρμογή μιας *συνάρτησης ανιχνευσιμότητας* (detection function) στις παρατηρούμενες αποστάσεις και η χρήση αυτής της προσαρμοσμένης συνάρτησης για την εκτίμηση του ποσοστού των αντικειμένων που δεν εντοπίστηκαν. Στη συνέχεια και με βάση την εκτίμηση αυτή είναι δυνατόν να ληφθούν οι σημειακές εκτιμήσεις και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης της πυκνότητας και της αφθονίας των αντικειμένων στην περιοχή μελέτης.

Η δειγματοληψία αποστάσεων έχει εφαρμοστεί με επιτυχία και σε έμμεσες μεθόδους εκτίμησης πληθυσμών. Σε αυτή την περίπτωση τα αντικείμενα στόχος δεν είναι τα ίδια τα ζώα αλλά τα βιοδηλωτικά τους ίχνη, όπως για παράδειγμα περιττώματα ή φωλιές (Plumptre 2000, Newey *et al.* 2003, Ellis & Bernard 2005, van Schaik *et al.* 2005, King *et al.* 2009). Η εκτιμώμενη πυκνότητα των βιοδηλωτικών ίχνων μπορεί να μετατραπεί σε πυκνότητα ζώων με την

προϋπόθεση ότι μπορούν να υπολογιστούν ο ρυθμός «παραγωγής» και ο ρυθμός «εξαφάνισης» τους. Στην παρούσα μελέτη ελέγξαμε τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου FSC με δειγματοληψία αποστάσεων για την εκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας των ζαρκαδιών στο εκτροφείο Σουβάρδου. Η μέθοδος FSC σε αντίθεση με τη μέθοδο FAR πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια μίας και μόνο επίσκεψης στην περιοχή μελέτης. Απαιτείται η γνώση τόσο του ρυθμού αφόδευσης όσο και του χρόνου αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών ώστε να υπολογιστεί η πυκνότητα των ζαρκαδιών.

Θεωρώντας εκ προοιμίου ότι ο πληθυσμός των ζαρκαδιών που ζει στο εκτροφείο Σουβάρδου δεν χρησιμοποιεί όλα τα ενδιαίτηματα με την ίδια ένταση αλλά και ότι η ανιχνευσιμότητα των κοπρανοσωρών και ο ρυθμός αποικοδόμησής τους διαφέρει μεταξύ των ενδιαιτημάτων προχωρήσαμε σε μια στρωματοποιημένη δειγματοληψία. Υπολογίσαμε δηλαδή ανεξάρτητα την πυκνότητα των ζαρκαδιών σε κάθε έναν από τους βασικούς τύπους ενδιαιτημάτων (ανοιχτές εκτάσεις, δάσος κωνοφόρων, μακία βλάστηση). Η στρωματοποίηση με βάση τον τύπο της βλάστησης έχει προταθεί ως μια στρατηγική δειγματοληψίας στις μεθόδους καταμέτρησης κοπρανοσωρών, που αυξάνει την ευστοχία και την ακρίβεια των μετρήσεων και επιτρέπει τη διερεύνηση της διαφορετικής χρήσης των ενδιαιτημάτων (Mayle *et al.* 1999, Fattorini *et al.* 2010)



Εικόνα 3.4.1: Απλοποιημένο σχήμα δειγματοληψίας αποστάσεων (distance sampling).

2. Μεθοδολογία δειγματοληψίας αποστάσεων

Η δειγματοληψία αποστάσεων αποτελεί μια μεθοδολογική επέκταση της δειγματοληψίας επιφανειών (plot sampling). Στην ουσία επιχειρεί να άρει τη βασική υπόθεση ισχύος της δειγματοληψίας επιφανειών που είναι ο εντοπισμός όλων των αντικειμένων εντός της επιφάνειας. Πριν περάσουμε στη λεπτομερή περιγραφή της δικής μας έρευνας θα ήταν χρήσιμο να παρουσιάσουμε τις βασικές αρχές που διέπουν μια γενική περίπτωση δειγματοληψίας αποστάσεων σε ευθεία γραμμή.

Ας θεωρήσουμε ότι επιχειρούμε να εκτιμήσουμε την πυκνότητα κάποιων αντικειμένων σε μια περιοχή έκτασης A . Για το σκοπό αυτό αναπτύσσουμε ένα δίκτυο γραμμικών διαδρομών τυχαία τοποθετημένων πάνω στην περιοχή μελέτης. Έστω λοιπόν ότι, αναζητώντας τα αντικείμενα στόχους μέχρι μια απόσταση w από την κάθε διαδρομή, διατρέχουμε λ ευθείες διαδρομές με μήκη l_1, l_2, \dots, l_k ($\sum l = L$) και ότι εντοπίζουμε n αντικείμενα σε x_1, \dots, x_n κάθετες αποστάσεις. Ουσιαστικά λοιπόν σαρώνεται μια έκταση $a=2wL$ στην περιοχή μελέτης. Είναι εύκολα κατανοητό ότι καθώς αυξάνει η απόσταση από τη γραμμή μικραίνει η διακριτική ικανότητα του παρατηρητή να εντοπίσει ένα αντικείμενο και είναι προφανές ότι στην περιοχή έρευνας a ο παρατηρητής δεν θα καταφέρει να εντοπίσει όλα τα αντικείμενα. Αν P_a είναι η πιθανότητα ένα αντικείμενο που βρίσκεται στην έκταση a να εντοπιστεί και αν υποθέσουμε ότι η πιθανότητα αυτή μπορεί να εκτιμηθεί τότε η εκτιμώμενη πυκνότητα των αντικειμένων D και η αφθονία τους N θα είναι:

$$\hat{D} = \frac{n}{a\hat{P}_a} \Rightarrow \hat{D} = \frac{n}{2wL\hat{P}_a} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.1}]$$

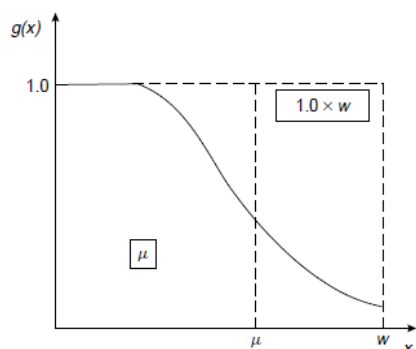
και $\hat{N} = \frac{n}{P_c \hat{P}_a} \Rightarrow \hat{N} = \frac{nA}{2wL\hat{P}_a}$, όπου $P_c = \frac{a}{A}$ είναι το ποσοστό κάλυψης της περιοχής μελέτης. Υποθέτουμε εκ προοιμίου ότι η πιθανότητα ανίχνευσης P_a είναι ανεξάρτητη και κοινή για όλα τα αντικείμενα.

Για τον υπολογισμό του P_a ορίζουμε τη συνάρτηση ανιχνευσιμότητας (detection function) $g(x)$, ως την πιθανότητα ένα αντικείμενο σε απόσταση x με $0 \leq x \leq w$ να εντοπιστεί και με την προϋπόθεση ότι $g(0)=1$, δηλαδή ο εντοπισμός πάνω στη γραμμή να είναι σίγουρος. Η πιθανότητα ανίχνευσης $g(x)$ του αντικειμένου αναμένεται να μειώνεται με ήπιο τρόπο καθώς αυξάνεται η απόσταση από τη γραμμή και πρακτικά τείνει στο μηδέν σε κάποια μακρινή απόσταση. Η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας αποδίδεται γραφικά στο Γράφημα 3.4.1. Η P_a μπορεί να εκφραστεί ως το πηλίκο της επιφάνειας μ που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη προς το γινόμενο $1 \times w$ που αντιστοιχεί στην επιφάνεια του ορθογωνίου και εκφράζει τον απόλυτο εντοπισμό στην περιοχή έρευνας a (βλ. Γράφημα 3.4.1):

$$P_a = \mu/w \quad \text{και} \quad \mu = \int_0^w g(x)dx$$

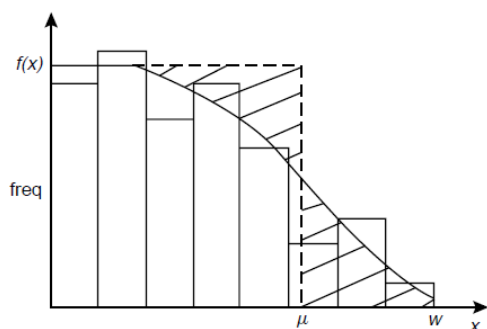
Η παράμετρος μ ονομάζεται ενεργό ημιπλάτος και εκφράζει το ημιπλάτος μιας λωρίδας όπου το πλήθος των αντικειμένων που δεν ανιχνεύονται εντός της είναι ίσο με το πλήθος των αντικειμένων που ανιχνεύονται εκτός της. Η εξίσωση 3.4.1 μπορεί τώρα να μετασχηματιστεί ως εξής:

$$\hat{D} = \frac{n}{2wL\hat{P}_a} = \frac{n}{2wL\hat{\mu}/w} = \frac{n}{2\hat{\mu}L} \quad \text{[Εξίσωση 3.4.2]}$$



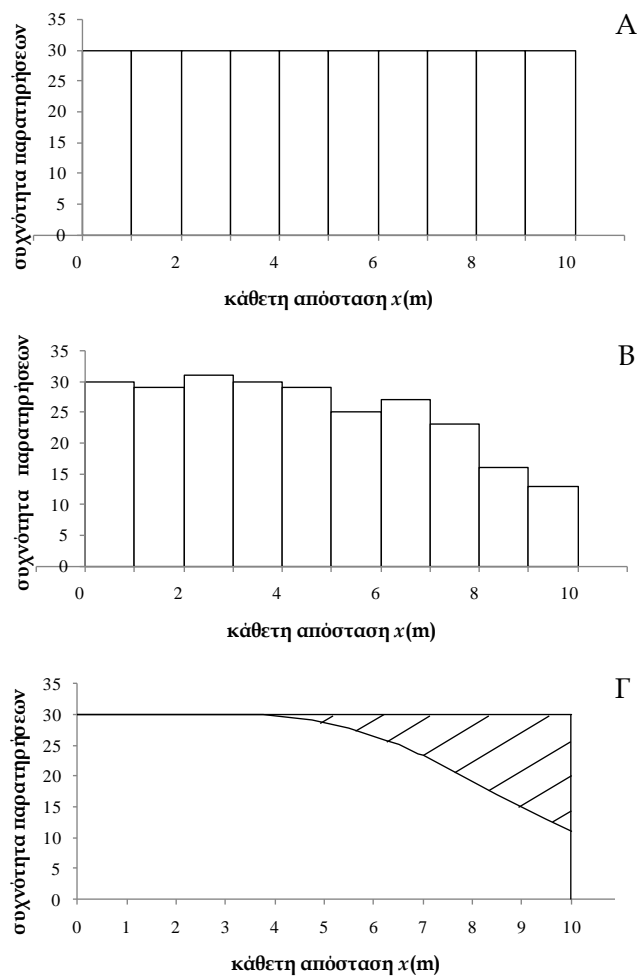
Γράφημα 3.4.1 : Η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας

Τα πρωτογενή δεδομένα (δηλ. αυτά που συλλέγουμε στο πεδίο) είναι το πλήθος των αντικειμένων και οι αποστάσεις τους από την κάθετη γραμμή. Αυτό σημαίνει ότι πρακτικά αυτό που λαμβάνουμε είναι ένα ιστόγραμμα των συχνοτήτων των κάθετων αποστάσεων (βλ. Γράφημα 3.4.2). Η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας (probability density function-pdf) $f(x)$ αποτυπώνει την πιθανότητα κάποιο αντικείμενο που ανιχνεύτηκε να βρίσκεται σε συγκεκριμένη απόσταση. Είναι λοιπόν λογικό $\int_0^w f(x)dx = 1$ δηλαδή η πιθανότητα κάποιο αντικείμενο που εντοπίστηκε στο διάστημα $0 \rightarrow w$ να βρίσκεται στο ίδιο διάστημα είναι απόλυτη.



Γράφημα 3.4.2 : Ιστόγραμμα συχνοτήτων κάθετων αποστάσεων σε μια υποθετική δειγματοληψία αποστάσεων και προσαρμοσμένη συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας.

Η ιδέα για την εκτίμηση της \hat{P}_a από τα δεδομένα των κάθετων αποστάσεων είναι απλή. Αν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε όλα τα αντικείμενα τότε η κατανομή των κάθετων αποστάσεων θα ήταν ομοιόμορφη (βλ. Γράφημα 3.4.3. Α). Οποιαδήποτε μείωση του αριθμού των αντικειμένων που ανιχνεύονται καθώς αυξάνεται η απόσταση από τη γραμμή αντανakλά στην ουσία μια μείωση της πιθανότητας ανίχνευσης ενός αντικειμένου (βλ. Γράφημα 3.4.3. Β). Αν η καμπύλη που εφαρμόζει με τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων στα μέσα σημεία (midpoints) των κλάσεων του ιστογράμματος τυποποιηθεί (διαιρούμενη με την τιμή της για $x=0$) τότε προκύπτει η καμπύλη της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας.



Γράφημα 3.4.3 : (Α) Το αναμενόμενο ιστόγραμμα συχνότητας των κάθετων αποστάσεων όταν εντοπίζονται όλα τα αντικείμενα (ή αλλιώς η πραγματική αναμενόμενη κατανομή των αποστάσεων)
 (Β) Πραγματικό ιστόγραμμα αποστάσεων, όπου φαίνεται η τάση να ανιχνεύονται λιγότερα αντικείμενα σε μεγαλύτερες αποστάσεις
 (Γ) Ένα μοντέλο που περιγράφει την κατανομή των αποστάσεων με βάση το ιστόγραμμα Β. Η σκιασμένη περιοχή είναι ανάλογη του αριθμού των αντικειμένων που δεν εντοπίστηκαν.

Η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας και η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας λοιπόν έχουν το ίδιο σχήμα και μπορεί ναδειχθεί ότι συνδέονται με τη σχέση (Buckland *et al.*, 2001):

$$\hat{f}(x) = \frac{\hat{g}(x)}{\int_0^w \hat{g}(x) dx} \Rightarrow \hat{f}(x) = \frac{\hat{g}(x)}{\mu} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.3}]$$

Αν λάβουμε υπόψη μας τον απόλυτο εντοπισμό πάνω στη γραμμή [$g(0)=1$] τότε έχουμε:

$$\hat{f}(0) = \frac{1}{\mu} \Rightarrow \mu = \frac{1}{\hat{f}(0)} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.4}]$$

Επομένως μπορούμε να υπολογίσουμε την πυκνότητα από τη σχέση:

$$\hat{D} = \frac{n\hat{f}(0)}{2L} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.5}]$$

όπου $f(0)$ είναι η τιμή της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας σε μηδενική απόσταση.

Ανακεφαλαιώνοντας, ας επανέλθουμε στην αρχική υπόθεση εργασίας. Αν θέλουμε να εκτιμήσουμε την πυκνότητα κάποιων αντικειμένων σε μια περιοχή μπορούμε να διατρέξουμε τυχαίες ευθείες διαδρομές και να καταγράψουμε τις κάθετες αποστάσεις από τη γραμμή όσων αντικειμένων εντοπίζουμε. Αν απεικονίσουμε τις καταγεγραμμένες κάθετες αποστάσεις σε ένα ιστόγραμμα τότε ουσιαστικά το πρόβλημα είναι να καθορίσουμε ένα κατάλληλο μοντέλο που να περιγράφει τη συνάρτηση ανιχνευσιμότητας και να προσαρμόσουμε την παραγόμενη καμπύλη ανίχνευσης στο ιστόγραμμα. Στη συνέχεια μπορούμε να υπολογίσουμε τις παραμέτρους $f(0)$, μ και από αυτές την πιθανότητα ανίχνευσης \hat{P}_a και την πυκνότητα \hat{D} των αντικειμένων.

Υπάρχουν τρεις βασικές επιθυμητές ιδιότητες που τα μοντέλα της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας πρέπει να έχουν: η ευρωστία του μοντέλου (model robustness), το κριτήριο σχήματος (shape criterion) και η αποτελεσματικότητα (efficiency) (Buckland *et al.* 2001).

- Η ευρωστία του μοντέλου είναι μια ιδιότητα που υποδηλώνει: α) ότι το μοντέλο είναι γενικό και προσαρμόσιμο στο να παίρνει ποικιλία αληθοφανών σχημάτων και β) ότι μπορούμε να έχουμε μια αξιόπιστη εκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας ακόμη και στην περίπτωση που ενοποιήσουμε δεδομένα υπό τη συνθήκη πολλών παραγόντων που επηρεάζουν την πιθανότητα ανίχνευσης (pooling robustness concept). Πρακτικά η ιδιότητα αυτή επιτρέπει να συνδυάσουμε πολλά σύνολα δεδομένων (π.χ. από διαφορετικούς παρατηρητές ή σε διαφορετικά ενδιαιτήματα) σε μια ενιαία ανάλυση για τον υπολογισμό της πιθανότητας ανίχνευσης. Οι αποστάσεις από τη γραμμή αρκούν για να εκτιμήσουμε την πυκνότητα των αντικειμένων απαλλάσσοντάς μας από την υποχρέωση να διερευνήσουμε τους λόγους που

απέτρεψαν τον εντοπισμό κάποιων αντικειμένων ή τους παράγοντες που οδηγούν σε ετερογένεια στην πιθανότητα ανίχνευσης.

- Το επιθυμητό σχήμα της καμπύλης της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας παρουσιάζει ένα «πλατό» κοντά στη μηδενική απόσταση, γεγονός που σημαίνει ότι ο εντοπισμός παραμένει σχεδόν απόλυτος σε μικρές αποστάσεις από τη γραμμή.
- Το κατάλληλο μοντέλο θα πρέπει να είναι και αποτελεσματικό, δηλαδή να οδηγεί σε σχετικά ακριβείς εκτιμήσεις και αποτελέσματα με μικρή διακύμανση.

Η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας (detection function) $g(x)$ μπορεί να εκτιμηθεί από τις μετρήσεις των αποστάσεων με μια ημιπαραμετρική προσέγγιση, όπως περιγράφεται αναλυτικά από τους Buckland *et al.* (2001). Τα προτεινόμενα μοντέλα έχουν τις επιθυμητές ιδιότητες που προαναφέρθηκαν. Πιο συγκεκριμένα η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας μοντελοποιείται με τη γενική μορφή:

$$g(x) = \frac{key(x)[1 + series(x)]}{key(0)[1 + series(0)]} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.6}]$$

Όπου $key(x)$ είναι η βασική συνάρτηση-κλειδί (key function) και $series(x)$ είναι μια σειρά «ρύθμισης» (series-expansion) που χρησιμοποιείται για προσαρμογή της μορφής της βασικής συνάρτησης. Συνήθως ως πιθανές βασικές συναρτήσεις για τη μοντελοποίηση της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες (Buckland *et al.* 2001):

- ❖ Η ομοιόμορφη συνάρτηση (uniform function) όπου $key(x) = \frac{1}{w}$. Η συνάρτηση αυτή δεν περιλαμβάνει καμία παράμετρο.
- ❖ Η ημικανονική συνάρτηση (half-normal function) όπου $key(x) = \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right)$. Η συνάρτηση αυτή περιλαμβάνει την παράμετρο σ , που είναι μια παράμετρος κλίμακας (scale parameter).
- ❖ Η συνάρτηση ρυθμού κινδύνου (hazard-rate function) όπου $key(x) = 1 - \exp\left[-\left(\frac{x}{\sigma}\right)^b\right]$. Η συνάρτηση περιλαμβάνει εκτός από τη σ και την b , που είναι μια παράμετρος σχήματος (shape parameter).

Οι σειρές ρύθμισης είναι (Buckland *et al.* 2001):

- ❖ η συνημιτονοειδής σειρά (cosine series) $\sum_{j=1}^m a_j \cos(j\pi x / w)$
- ❖ η απλή πολυωνυμική (simple polynomials) της μορφής $\sum_{j=1}^m a_j \left(\frac{x}{w}\right)^{2j}$
- ❖ η ερμιτιανή πολυωνυμική (Hermite polynomials) της μορφής $\sum_{j=2}^m a_j H_{2j}(x / \sigma)$

Τα μοντέλα που περιλαμβάνουν σειρές ρύθμισης είναι ημιπαραμετρικά με την έννοια ότι ο αριθμός των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται (a_j) εξαρτάται από τα πρωτογενή δεδομένα της έρευνας, δηλαδή από τις μετρήσεις των αποστάσεων του εκάστοτε πειράματος. Τυπικά, ένα ισχυρό μοντέλο για το $g(x)$ δεν θα περιλαμβάνει πάνω από τρεις παραμέτρους και συνήθως η βασική συνάρτηση θα είναι επαρκής χωρίς την ανάγκη προσθήκης κάποιας σειράς ρύθμισης. Η εκτίμηση των παραμέτρων στις βασικές συναρτήσεις και στις σειρές ρύθμισης γίνεται με μεθόδους μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood methods) όπως περιγράφονται αναλυτικά από τους Buckland *et al.* (2001).

Στη διαδικασία μοντελοποίησης της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας για ένα σύνολο πρωτογενών δεδομένων πρέπει να διερευνώνται αρκετά πιθανά μοντέλα. Η επιλογή του καταλληλότερου μεταξύ των υποψηφίων μοντέλων μπορεί να γίνει με βάση τη θεωρία της πληροφορίας (information theory, Burnham & Anderson 2002) και το κριτήριο του Akaike, AIC (Akaike 1973, Burnham & Anderson 2002). Η χαμηλή διακύμανση των παραγόμενων από κάθε μοντέλο παραμέτρων $[f(0), \mu]$ και η μη σημαντική τιμή του ελέγχου καλής προσαρμογής χ^2 (chi-square goodness-of-fit value) για την καμπύλη της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας θα πρέπει να συνεκτιμώνται στην τελική επιλογή (Marques *et al.* 2001). Ο αριθμός j των παραμέτρων σε κάθε σειρά ρύθμισης μπορεί επίσης να καθοριστεί χρησιμοποιώντας το κριτήριο AIC μεταξύ μοντέλων με αυξανόμενη σειρά.

Οι ακραίες παρατηρούμενες τιμές αποστάσεων είναι δύσκολο να μοντελοποιηθούν και δεν παρέχουν ουσιαστική πληροφορία για την τιμή της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας στη μηδενική απόσταση $f(0)$, που είναι και το πιο κρίσιμο σημείο της καμπύλης. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να γίνεται αποκοπή (truncation) των ακραίων τιμών (Buckland *et al.*, 2001). Συνήθως αρκεί μια αποκοπή της τάξης του 10% των ακραίων τιμών απόστασης για να βελτιωθεί η προσαρμογή της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας στις παρατηρούμενες μετρήσεις. Ορίζοντας το σημείο αποκοπής πρακτικά καθορίζουμε το μέγεθος του πλάτους της λωρίδας w , το οποίο δεν απαιτείται να έχει προαποφασιστεί.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πιθανότητα ανίχνευσης και το σχήμα της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας μπορεί να εξαρτώνται και από διάφορους άλλους παράγοντες εκτός της απόστασης (x). Εξαιτίας όμως της ευρωστίας των μοντέλων της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας, οι εκτιμήσεις της πυκνότητας και της αφθονίας που προκύπτουν είναι αμερόληπτες (ή σχεδόν αμερόληπτες) ακόμη και αν αγνοηθεί η ετερογένεια στις πιθανότητες ανίχνευσης που οφείλεται σε παράγοντες πέραν της απόστασης (Buckland *et al.* 2001). Για να έχουμε ωστόσο αξιόπιστες εκτιμήσεις της πυκνότητας των αντικειμένων, θα πρέπει να τηρούνται μια σειρά από υποθέσεις και συνθήκες:

1. Η βασική υπόθεση (key assumption) στη γραμμική δειγματοληψία (line transect sampling) είναι ότι όλα τα αντικείμενα που βρίσκονται πάνω στην ευθεία γραμμή εντοπίζονται με βεβαιότητα, δηλαδή $g(0)=1$. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι για την αποφυγή

συστηματικών σφαλμάτων (bias) θα πρέπει ο εντοπισμός πάνω και πολύ κοντά στη γραμμή να είναι σχεδόν απόλυτος (καμία απώλεια καταμέτρησης) και ο σχεδιασμός της όλης έρευνας θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να εξασφαλίζεται η τήρηση της συνθήκης αυτής (Buckland *et al.* 2001).

2. Μια δεύτερη υπόθεση που πρέπει να ισχύει στην περίπτωση κινούμενων αντικειμένων είναι ότι αυτά εντοπίζονται στην αρχική τους θέση, πριν από κάθε κίνηση που μπορεί να προκαλέσει η παρουσία του παρατηρητή που διατρέχει τη γραμμή. Οι κινήσεις προσέλκυσης ή αποφυγής συνήθως προκαλούν μεγάλο συστηματικό σφάλμα στις εκτιμήσεις επηρεάζοντας την ομοιόμορφη κατανομή των καταγραφόμενων από τη γραμμή κάθετων αποστάσεων (Thomas *et al.* 2002). Για μη κινούμενα όπως οι κοπρανοσωροί αυτή η υπόθεση ικανοποιείται προφανώς *a priori*.
3. Οι αποστάσεις των αντικειμένων από τη γραμμή θα πρέπει να μετρώνται με ακρίβεια. Τα τυχαία και μικρά σφάλματα μέτρησης, ιδιαίτερα όταν το πλήθος των μετρήσεων είναι μεγάλο, δεν επηρεάζουν σημαντικά τις εκτιμήσεις της πυκνότητας. Στην περίπτωση, ωστόσο, που παρατηρούνται συστηματικά σφάλματα στις μετρήσεις, όπως για παράδειγμα η τάση προς στρογγυλοποίηση των αποστάσεων κοντά στο μηδέν, οι εκτιμήσεις της πυκνότητας μπορεί να είναι μεροληπτικές (Buckland *et al.* 2001).
4. Δεν είναι απαραίτητο τα αντικείμενα να είναι τυχαία κατανεμημένα στην περιοχή μελέτης (π.χ κατανομή Poisson). Είναι όμως κρίσιμο οι γραμμές να τοποθετηθούν τυχαία σε σχέση με την κατανομή των αντικειμένων στην περιοχή μελέτης. Αυτό εξασφαλίζει ότι τα αντικείμενα που βρίσκονται εντός της περιοχής έρευνας είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε σχέση με την απόσταση από τη γραμμή (Thomas *et al.* 2002).

Ακριβείς εκτιμήσεις μπορούμε να έχουμε ακόμη και στην περίπτωση που παρατηρούνται μεγάλες τοπικές διακυμάνσεις της πυκνότητας στην περιοχή μελέτης. Αν ωστόσο επιθυμούμε αυξημένη ακρίβεια μπορούμε να προχωρήσουμε σε μια στρωματοποιημένη δειγματοληψία, ορίζοντας εκ των προτέρων περιοχές με διαφορετική πυκνότητα.

Σε κάθε περίπτωση η διακύμανση της εκτιμώμενης πυκνότητας αποδίδεται προσεγγιστικά, χρησιμοποιώντας τη «μέθοδο δέλτα» (Seber 2002), από την εξίσωση:

$$\text{v}\hat{\text{a}}\text{r}(\hat{D}) = \hat{D}^2 \left[\frac{\text{v}\hat{\text{a}}\text{r}(n)}{n^2} + \frac{\text{v}\hat{\text{a}}\text{r}(\hat{P}_a)}{\hat{P}_a^2} \right]. \quad [\text{Εξίσωση 3.4.7}]$$

Η $\text{v}\hat{\text{a}}\text{r}(n)$ γενικά μπορεί να εκτιμηθεί είτε από τη διακύμανση των ρυθμών καταμέτρησης (encounter rates) n_i/l_i , σταθμισμένων από τα μήκη των γραμμών l_i ή απλούστερα με τη χρήση ενός μη παραμετρικού bootstrap και επαναδειγματοληψία των γραμμών l . Η

διαδικασία bootstrap (Efron & Tibshirani 1993) έχει προταθεί ως μια καλή εναλλακτική μέθοδος για εκτιμήσεις της διακύμανσης και των ορίων εμπιστοσύνης της πυκνότητας.

Η εκτίμηση της πυκνότητας ενός πληθυσμού αντικειμένων με δειγματοληψία αποστάσεων, όπως περιληπτικά παρουσιάστηκε στις προηγούμενες παραγράφους, αποδεικνύεται μια ιδιαίτερα απαιτητική και πολύπλοκη διαδικασία από υπολογιστικής και στατιστικής άποψης. Το πρόγραμμα λογισμικού DISTANCE (Thomas *et al.* 2006) είναι ένα παραθυρικό και ελεύθερο προς χρήση (freeware) υπολογιστικό πακέτο που παρέχει τη δυνατότητα σχεδιασμού και ανάλυσης τέτοιων μελετών. Ενσωματώνοντας τη βασική θεωρία και τα σχετικά στατιστικά εργαλεία επιτρέπει στον ερευνητή -εισάγοντας ως πρωτογενή δεδομένα τον αριθμό των αντικειμένων που εντοπίστηκαν και τις κάθετες αποστάσεις τους από τη γραμμή- να μοντελοποιήσει τη συνάρτηση ανιχνευσιμότητας και να υπολογίσει την πυκνότητα και την αφθονία του πληθυσμού σε μια διεξαχθείσα έρευνα δειγματοληψίας αποστάσεων.

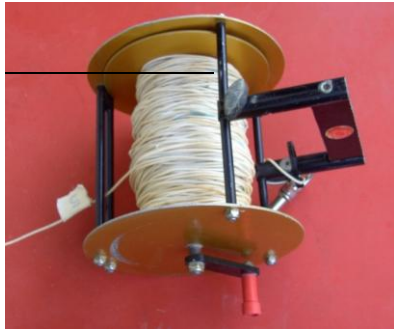
3. Έρευνα πεδίου

Η εκτίμηση του πληθυσμού ζαρκαδιών του εκτροφείου Σουβάρδου με τη χρήση της μεθόδου FSC και δειγματοληψία αποστάσεων πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα από 2 έως 19 Μαΐου 2007. Η εποχή επιλέχθηκε με τα ίδια κριτήρια, που παρουσιάστηκαν αναλυτικά στη έρευνα FAR (βλ. Κεφάλαιο 3.3). Ο σχεδιασμός της έρευνας επικεντρώθηκε στην προσπάθεια τήρησης των απαραίτητων συνθηκών και υποθέσεων που απαιτούνται για αξιόπιστη εκτίμηση της πυκνότητας των κοπρανοσωρών με δειγματοληψία αποστάσεων. Για τη διενέργεια της μελέτης εργάστηκαν ταυτόχρονα δύο ερευνητές.

Για να εξασφαλιστεί η αμεροληψία των μετρήσεων και μια από τις βασικές προϋποθέσεις για τη στατιστική ισχύ της δειγματοληψίας αποστάσεων επιλέχθηκε η εφαρμογή μιας τυχαίας συστηματικής δειγματοληψίας, ανάλογης με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην FAR έρευνα. Ένα πλέγμα (grid) από ευθείες διαδρομές (line transects) μήκους 200 μέτρων που απείχαν μεταξύ τους 200 μέτρα «τοποθετήθηκε» κατά τυχαίο τρόπο επάνω στην περιοχή μελέτης (βλ. Εικόνα 3.4.2). Η διεύθυνση των διαδρομών ακολούθησε τον άξονα ανατολής-δύσης. Η επιλογή αυτή δεν ήταν τυχαία αλλά έγινε σε μια προσπάθεια αντιπροσωπευτικότερης κάλυψης της υψομετρικής διαβάθμισης που ακολουθεί την ίδια διεύθυνση. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας καταγράφηκε το ακριβές μήκος των τμημάτων κάθε ευθείας που αντιστοιχούσε στους τρεις τύπους ενδιαιτημάτων. Αυτό ήταν απαραίτητο για την εφαρμογή στρωματοποιημένης δειγματοληψίας η οποία θεωρήθηκε αναγκαία μιας και η πυκνότητα των κοπρανοσωρών και η πιθανότητα ανίχνευσης τους ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ των ενδιαιτημάτων. Προκειμένου να αυξήσουμε την ένταση της

δειγματοληψίας στα ανοιχτά ενδιαιτήματα, που καλύπτουν μικρό ποσοστό της έκτασης της περιοχής μελέτης (μόλις 1,2%), εφαρμόσαμε επιπλέον διαδρομές σε αυτά. Με επίσης τυχαίο τρόπο λοιπόν τοποθετήθηκαν παράλληλες ευθείες διαδρομές ποικίλου μήκους που απείχαν μεταξύ τους 30 μέτρα σε κάθε ένα ξέφωτο ή εγκαταλελειμμένο αγρό (βλ. Εικόνα 3.4.2).

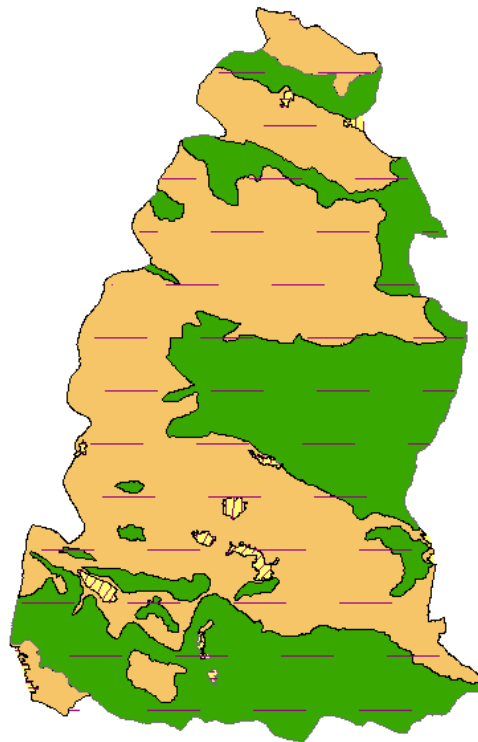
Περνώντας από τον επί χάρτου σχεδιασμό στην κυρίως έρευνα πεδίου, οι θέσεις έναρξης των διαδρομών εντοπίστηκαν με τη βοήθεια φορητής συσκευής GPS. Οι ίδιες οι διαδρομές ορίστηκαν στο πεδίο με τη βοήθεια μίτου (σχοινί) μήκους 200 μέτρων (Εικόνα 3.4.3) που απλώνονταν στο έδαφος. Η χρήση μίτου είναι απαραίτητη για να αποφεύγονται δειγματοληπτικά σφάλματα και μεροληψία στον υπολογισμό των αποστάσεων των κοπρανosoφρών από τη γραμμή. Είναι συνηθισμένη πηγή σφάλματος η τάση των ερευνητών να στρογγυλοποιούν τις μετρούμενες αποστάσεις από τη γραμμή και κυρίως αυτές κοντά στο μηδέν (Marques *et al.* 2001). Ο ερευνητής προχωρά κατά μήκος του μίτου και εντοπίζει πάνω στη γραμμή και εκατέρωθεν αυτής τους κοπρανosoφρούς που έχουν αποθεθεί. Για κάθε κοπρανosoφό μετρά και καταγράφει την κάθετη απόστασή του από τη γραμμή (Εικόνα 3.4.4). Επειδή συνήθως ένας κοπρανosoφρός αποτελείται από πολλά κόπρανα διασκορπισμένα σε μια μικρή έκταση και όχι σημειακά αποτιθέμενα, σε τέτοιες περιπτώσεις μετρήθηκε η μέση απόσταση δηλαδή η απόσταση του «κέντρου» του κοπρανosoφρού από τη γραμμή (Mayle *et al.* 1999). Το κριτήριο των έξι κοπράνων χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή τη δειγματοληψία ως ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός για να αναγνωριστεί ένας κοπρανosoφρός.



Εικόνα 3.4.3 : Μίτος



Εικόνα 3.4.4 : Μέτρηση αποστάσεων



Εικόνα 3.4.2 : Κατανομή διαδρομών στην περιοχή μελέτης

4. Αναλύσεις

Η ανάλυση των δεδομένων στηρίχθηκε στη βασική μεθοδολογία της δειγματοληψίας αποστάσεων όπως αυτή παρουσιάστηκε λεπτομερώς προηγουμένως. Τα αντικείμενα στόχος της έρευνας στην περίπτωση μας ήταν οι κοπρανοσφοί που αφήνουν τα ζαρκάδια στην περιοχή μελέτης. Έχοντας από το σχεδιασμό της έρευνας επιλέξει μια στρωματοποιημένη δειγματοληψία, σε κάθε ενδιαίτημα διατρήθηκαν l_H ευθείες διαδρομές με μήκος l_m η κάθε μία και σε κάθε διαδρομή εντοπίστηκαν n_{Hj} κοπρανοσφοί σε αποστάσεις από 0 μέχρι w από τη γραμμή. Αν κατά την έρευνα στο ενδιαίτημα H εντοπίστηκαν συνολικά

$$n_H = \sum_j n_{Hj}$$

κοπρανοσφοί τότε η μέση πυκνότητά τους στο ενδιαίτημα αυτό δίνεται από τη σχέση:

$$\hat{D}_{GH} = \frac{n_H}{a_H \hat{p}} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.8}]$$

όπου $a_H = 2wL = 2w \sum_{\lambda} l_m$ είναι η έκταση της περιοχής που ερευνήθηκε στο ενδιαίτημα H και \hat{p} είναι η πιθανότητα ανίχνευσης (δηλαδή η πιθανότητα να εντοπιστεί ένας κοπρανοσφοός που βρίσκεται μέσα στην περιοχή έρευνας). Η πιθανότητα ανίχνευσης όπως έχει αναφερθεί υπολογίζεται με μοντελοποίηση της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας.

Η ανιχνευσιμότητα, δηλαδή η ικανότητα εντοπισμού των κοπρανοσφρών είναι πιθανόν να διαφέρει από ενδιαίτημα σε ενδιαίτημα. Οι διαφορές για παράδειγμα που μπορεί να εμφανίζονται μεταξύ των ενδιαιτημάτων σε σχέση με τη φύση και την πυκνότητα της βλάστησης ή ακόμα και σε σχέση με τις συνθήκες φωτισμού (διέλευση ηλιακού φωτός), αναμένεται να επηρεάζουν τη δυνατότητα των ερευνητών να εντοπίζουν τους αποτιθέμενους κοπρανοσφοούς. Άρα γενικά αναμένεται η πιθανότητα ανίχνευσης p_H να διαφέρει ανάλογα με το ενδιαίτημα H . Σε αυτή την περίπτωση η πυκνότητα των κοπρανοσφρών στο ενδιαίτημα H μπορεί να εκτιμηθεί με τη σχέση (Marques & Buckland 2004):

$$\hat{D}_{GH} = \frac{1}{a_H} n_H \frac{1}{\hat{p}_H} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.9}]$$

Για την εκτίμηση του p_H έπρεπε να προσδιοριστεί η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας σε κάθε ενδιαίτημα. Δηλαδή, στις παρατηρούμενες μετρήσεις των κάθετων αποστάσεων των κοπρανοσφρών από τη γραμμή να προσαρμοστεί η κατάλληλη συνάρτηση που να εξηγεί τον τρόπο με τον οποίο μειώνεται η ικανότητα εντοπισμού σε σχέση με την απόσταση. Για τη μοντελοποίηση της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας θεωρήθηκαν έξι υποψήφια μοντέλα όπως προτείνεται από τους Buckland *et al.* (2001).

- Το μοντέλο g_{H1} χρησιμοποιεί ως βασική την ομοιόμορφη συνάρτηση (uniform function) και ως σειρά ρύθμισης τη συνημιτονοειδή σειρά (cosine series) [uniform+cosine]
- Το μοντέλο g_{H2} χρησιμοποιεί επίσης την ομοιόμορφη συνάρτηση αλλά ως σειρά ρύθμισης την απλή πολυωνυμική (simple polynomials) [uniform+simple polynomials]
- Το μοντέλο g_{H3} χρησιμοποιεί την ημικανονική συνάρτηση (half-normal function) και τη συνημιτονοειδή σειρά ρύθμισης [half-normal+ cosine]
- Το μοντέλο g_{H4} χρησιμοποιεί την ημικανονική συνάρτηση και την ερμιτιανή πολυωνυμική (Hermite polynomials) σειρά [half-normal+ Hermite polynomials]
- Το μοντέλο g_{H5} χρησιμοποιεί τη συνάρτηση ρυθμού κινδύνου (hazard-rate function) και τη συνημιτονοειδή σειρά [hazard-rate+ cosine]
- Το μοντέλο g_{H6} χρησιμοποιεί τη συνάρτηση ρυθμού κινδύνου και την απλή πολυωνυμική σειρά [hazard-rate+simple polynomials]

Για κάθε μοντέλο υπολογίστηκαν: ο αριθμός και οι τιμές των παραμέτρων (κλίμακας, σχήματος και σειρών ρύθμισης), η τιμή του κριτηρίου AIC, το ενεργό ημιπλάτος μ και το τυπικό του σφάλμα. Από τα υποψήφια μοντέλα επιλέξαμε ως καταλληλότερο εκείνο με τη χαμηλότερη τιμή AIC (AIC_{\min}) και με βάση αυτό προέκυψε η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας σε κάθε ενδιαίτημα και υπολογίστηκε η τιμή $f(0)$ και η πιθανότητα εντοπισμού p_H . Επίσης έγινε έλεγχος καλής προσαρμογής της παραγόμενης καμπύλης ανιχνευσης στις παρατηρούμενες συχνότητες κάθετων αποστάσεων (ιστόγραμμα συχνοτήτων) με τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων.

Η πυκνότητα των ζαρκαδιών D_{RH} στο ενδιαίτημα H υπολογίστηκε από την πυκνότητα των κοπρανοσωρών σύμφωνα με την εξίσωση (Buckland *et al.* 2001):

$$\hat{D}_{RH} = \frac{\hat{D}_{GH}}{\hat{t}_H \cdot \hat{d}} \quad [\text{Εξίσωση 3.4.10}],$$

όπου \hat{t}_H είναι ο εκτιμώμενος και ειδικός για κάθε ενδιαίτημα μέσος χρόνος αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών τη χρονική στιγμή που πραγματοποιείται η έρευνα και \hat{d} ο εκτιμώμενος ρυθμός αφόδευσης. Σε αυτή την εφαρμογή της μεθόδου θεωρήσαμε ότι ο ρυθμός αφόδευσης είναι ανεξάρτητος από το ενδιαίτημα και ίσος με 20 κοπρανοσωρούς/ημέρα (Mitchell *et al.* 1985, McIntosh *et al.* 1995, Mayle *et al.* 1999), όπως άλλωστε θεωρήθηκε και στην εφαρμογή της μεθόδου FAR. Για να υπολογιστεί ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης για κάθε ενδιαίτημα χρειάστηκε η κατάστρωση και πραγματοποίηση μιας ανεξάρτητης έρευνας. Η αναλυτική παρουσίαση της μεθοδολογίας και των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 3.5). Οι τιμές των χρόνων αποικοδόμησης που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.4 στα Αποτελέσματα.

Η διακύμανση της πυκνότητας των ζαρκαδιών σε κάθε ενδιαίτημα δίνεται από τη σχέση:

$$\hat{\text{var}}(\hat{D}_{RH}) = \hat{D}_{RH}^2 \left[\frac{\text{var}(\hat{D}_{GH})}{\hat{D}_{GH}^2} + \frac{\text{var}(\hat{t}_H)}{\hat{t}_H^2} + \frac{\text{var}(\hat{d})}{\hat{d}^2} \right] \quad [\text{Εξίσωση 3.4.11}]$$

Η $\hat{\text{var}}(\hat{D}_{GH})$ λαμβάνεται από την ανάλυση της δειγματοληψίας αποστάσεων των κοπρανοσωρών και μπορεί να εκτιμηθεί με διαδικασία bootstrap (Efron & Tibshirani 1993) των γραμμών λ_H που διατρέχθηκαν στο ενδιαίτημα H . Η διακύμανση του μέσου χρόνου αποικοδόμησης υπολογίστηκε ανεξάρτητα ενώ θεωρήθηκε ότι ο ρυθμός αφόδευσης δεν παρουσιάζει διακύμανση [$\text{var}(d)=0$]. Ο υπολογισμός του τυπικού σφάλματος (SE) και των ορίων εμπιστοσύνης (95% CI) της πυκνότητας D_{RH} έγινε με διαδικασία bootstrap και 2000 επαναδειγματοληψίες.

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος DISTANCE 5 Release 2 (Thomas *et al.* 2006) και συγκεκριμένα με τη μηχανή CDS.

Η συνολική αφθονία των ζαρκαδιών στην περιοχή μελέτης εκτιμήθηκε από τη σχέση:

$$\hat{N} = \sum_H \hat{D}_{RH} A_H \quad [\text{Εξίσωση 3.4.12}]$$

όπου A_H είναι η έκταση του ενδιαιτήματος H .

Το τυπικό σφάλμα (se), και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) του \hat{N} υπολογίστηκαν με τη διαδικασία bootstrap και πλήθος επαναδειγματοληψιών $B=2000$ (Efron & Tibshirani 1993). Ως μέτρο της ακρίβειας των εκτιμήσεων της πυκνότητας και της αφθονίας χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής μεταβολής %CV, ενώ η προσπάθεια αποτυπώθηκε σε ανθρωποημέρες συνολικής εργασίας στο πεδίο (δειγματοληψίας και μετακίνησης).

5. Αποτελέσματα

Πρωτογενή αποτελέσματα

Στον Πίνακα 3.4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν στο πεδίο. Με βάση τη στρωματοποίηση της δειγματοληψίας ο αριθμός και το μήκος των γραμμών σε κάθε ενδιαίτημα διαφέρει. Το συνολικό μήκος των γραμμών που διατρέχθηκαν ήταν 8.836,5 m και ο αριθμός των κοπρανοσωρών που βρέθηκαν ήταν 570. Ελάχιστοι κοπρανοσωροί μπόρεσαν να εντοπιστούν σε απόσταση μεγαλύτερη των 2,5 μέτρων από τη γραμμή σε όλα τα ενδιαιτήματα και γι αυτό ορίσαμε εκ των υστέρων την απόσταση αυτή ως σημείο αποκοπής ($w=2,5\text{m}$). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη συντριπτική πλειοψηφία των γραμμών εντοπίστηκε τουλάχιστον ένας κοπρανοσωρός δηλαδή οι μηδενικές παρατηρήσεις ήταν ελάχιστες.

Πίνακας 3.4.1 : Ένταση και αποτελέσματα της στρωματοποιημένης δειγματοληψίας.

λ_H : αριθμός γραμμών, A_H : έκταση ενδιαιτήματος, a_H : έκταση δειγματοληψίας σε κάθε ενδιαιτήμα, L : συνολικό μήκος, w : σημείο αποκοπής, n : αριθμός κοπρασωρών

Ενδιαιτήμα	λ_H^*	A_H (km ²)	L (m)	w (m)	$a_H=2wL$ (km ²)	a_H/A_H	n
Δάσος κωνοφόρων	27 (40-200m)*	1,37376	3328,0	2,5	0,01664	1,2%	251
Μακία βλάστηση	32 (20-200m)*	1,76808	4122,0	2,5	0,02061	1,2%	197
Ανοιχτές εκτάσεις	45 (5,5-80m)*	0,03816	1386,5	2,5	0,0069325	18,2%	122
Συνολικά		3,18	8836,5	2,5	0,0441825	1,4%	570

* Σε παρένθεση το εύρος του μήκους των γραμμών σε κάθε ενδιαιτήμα.

Συνάρτηση ανιχνευσιμότητας

Η μοντελοποίηση της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας με τα έξι μοντέλα για κάθε ενδιαιτήμα παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 3.4.2. Και στα τρία ενδιαιτήματα υπερισχύουν (με βάση το χαμηλότερο AIC) τα μοντέλα που περιλαμβάνουν την ημικανονική ως βασική συνάρτηση. Στις ανοιχτές εκτάσεις (O) και στο δάσος κωνοφόρων (F) δεν χρειάστηκε η προσθήκη κάποιας σειράς ρύθμισης, ενώ στη μακία (M) η συνημιτονοειδής σειρά (cosine series) με μία παράμετρο προστέθηκε ώστε να μοντελοποιηθεί η συνάρτηση ανιχνευσιμότητας. Αντικαθιστώντας τις αριθμητικές τιμές των παραμέτρων (των καλύτερων μοντέλων) στους τύπους των βασικών συναρτήσεων, των σειρών ρύθμισης και στην Εξίσωση 3.4.6 προκύπτουν οι συναρτήσεις ανιχνευσιμότητας:

$$g_F(x) = \frac{key_F(x)}{key_F(0)} = \frac{\exp(-x^2/2\sigma_F^2)}{\exp(0^2/2\sigma_F^2)} = \frac{\exp(-x^2/2 \times 100,8^2)}{1} \Rightarrow g_F(x) = \exp(-x^2/20321,28)$$

$$g_O(x) = \frac{key_O(x)}{key_O(0)} = \frac{\exp(-x^2/2\sigma_O^2)}{\exp(0^2/2\sigma_O^2)} = \frac{\exp(-x^2/2 \times 125^2)}{1} \Rightarrow g_O(x) = \exp(-x^2/31250)$$

$$g_M(x) = \frac{key_M(x)[1 + series(x)]}{key_M(0)[1 + series(0)]} = \frac{\exp(-x^2/2\sigma_M^2)[1 + a_2 \cos(2\pi x/w)]}{\exp(0^2/2\sigma_M^2)[1 + a_2 \cos(2\pi 0/w)]} =$$

$$= \frac{\exp(-x^2/2 \times 105,7^2)[1 + 0,2122 \cos(2\pi x/w)]}{1[1 + 0,2122 \cos 0]} = \frac{\exp(-x^2/22344,98)[1 + 0,2122 \cos(2\pi x/w)]}{1,2122}$$

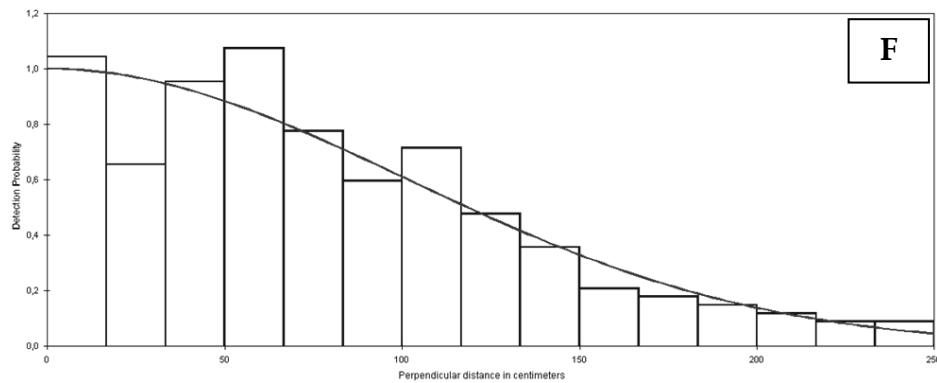
Πίνακας 3.4.2 : Συνοπτική παρουσίαση των μοντέλων που ελέγχθηκαν για τη μοντελοποίηση της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας σε κάθε ενδαιτήμα, οι τιμές των παραμέτρων, οι τιμές AIC και τα εκτιμώμενα ενεργά ημιπλάτη μ με τα τοπικά τους σφάλματα (SE). Έχουν επισημανθεί τα μοντέλα με το χαμηλότερο AIC.

Δάσος κωνοφόρων (F)						
Μοντέλο (key + series expansion)	Αριθμός παραμέτρων		Τιμές παραμέτρων	AIC	μ (cm)	SE(μ) (cm)
	Key	Series expansion				
g_{F1} (Uniform+cosine)	0	1	0,8898	2652,36	132,29	3,3432
g_{F2} (Uniform + simple polynomial)	0	2	-2,285/1,413	2653,42	130,28	4,98
g_{F3} (Half-normal + cosine)	1	0	100,8	2652,13	124,63	6,1661
g_{F4} (Half-normal + Hermite polymomial)	1	0	100,8	2652,13	124,63	6,1661
g_{F5} (Hazard-rate + cosine)	2	0	110/3,039	2653,16	138,18	7,8871
g_{F6} (Hazard-rate + simple polynomial)	2	0	110/3,039	2653,16	138,18	7,8871

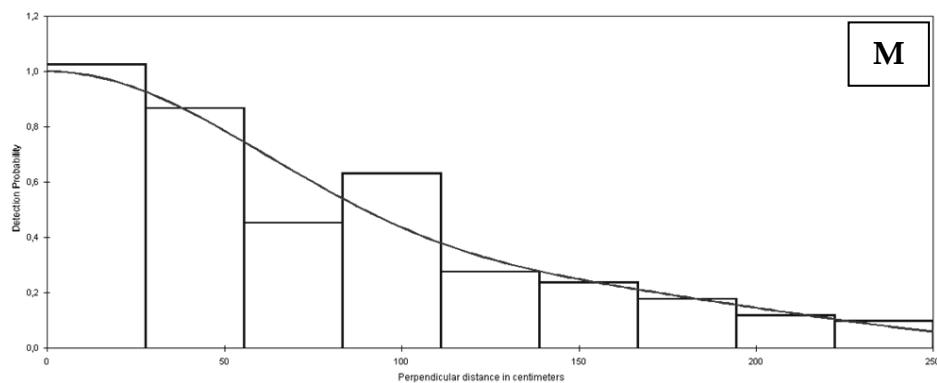
Μακία βλάστηση (M)						
Μοντέλο (key + series expansion)	Αριθμός παραμέτρων		Τιμές παραμέτρων	AIC	μ (cm)	SE(μ) (cm)
	Key	Series expansion				
g_{M1} (Uniform + cosine)	0	2	0,9615/0,2139	2080,76	114,92	7,3067
g_{M2} (Uniform + simple polynomial)	0	3	-3,566/4,928/-2,281	2083,43	117,79	7,1585
g_{M3} (Half-normal + cosine)	1	1	105,7/0,2122	2080,55	107,78	8,8754
g_{M4} (Half-normal + Hermite polymomial)	1	0	101,1	2082,91	125,03	6,3394
g_{M5} (Hazard-rate + cosine)	2	0	60,63/ 1,518	2080,78	103,13	11,696
g_{M6} (Hazard-rate + simple polynomial)	2	0	60,72/1,520	2080,78	103,19	11,689

Ανοιχτές εκτάσεις (O)						
Μοντέλο (key + series expansion)	Αριθμός παραμέτρων		Τιμές παραμέτρων	AIC	μ (cm)	SE(μ) (cm)
	Key	Series expansion				
g_{O1} (Uniform+cosine)	0	1	0,6996	1318,70	147,09	9,0916
g_{O2} (Uniform + simple polynomial)	0	2	-1,539/0,6594	1320,12	154,72	12,069
g_{O3} (Half-normal + cosine)	1	0	125	1318,21	149,51	11,75
g_{O4} (Half-normal + Hermite polymomial)	1	0	125	1318,21	149,51	11,75
g_{O5} (Hazard-rate + cosine)	2	1	161/4,739/0,2297	1321,44	143,22	18,594
g_{O6} (Hazard-rate + simple polynomial)	2	0	142,2/2,958	1321,86	170,54	13,876

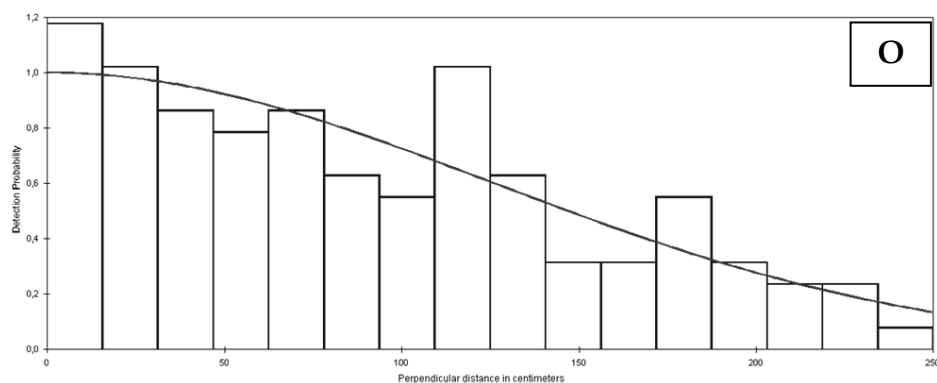
Στο Γράφημα 3.4.4 παρουσιάζεται ο γραφικός και ο στατιστικός έλεγχος προσαρμογής των συναρτήσεων ανιχνευσιμότητας στα ιστογράμματα συχνοτήτων των κάθετων αποστάσεων που μετρήθηκαν κατά τη δειγματοληψία. Τόσο γραφικά όσο και στατιστικά φαίνεται ότι οι συναρτήσεις ανιχνευσιμότητας που προσδιορίστηκαν περιγράφουν ικανοποιητικά τη διαδικασία ανίχνευσης των κοπρανσοσφρών.



$$p_F = 0,81 \gg 0,05$$



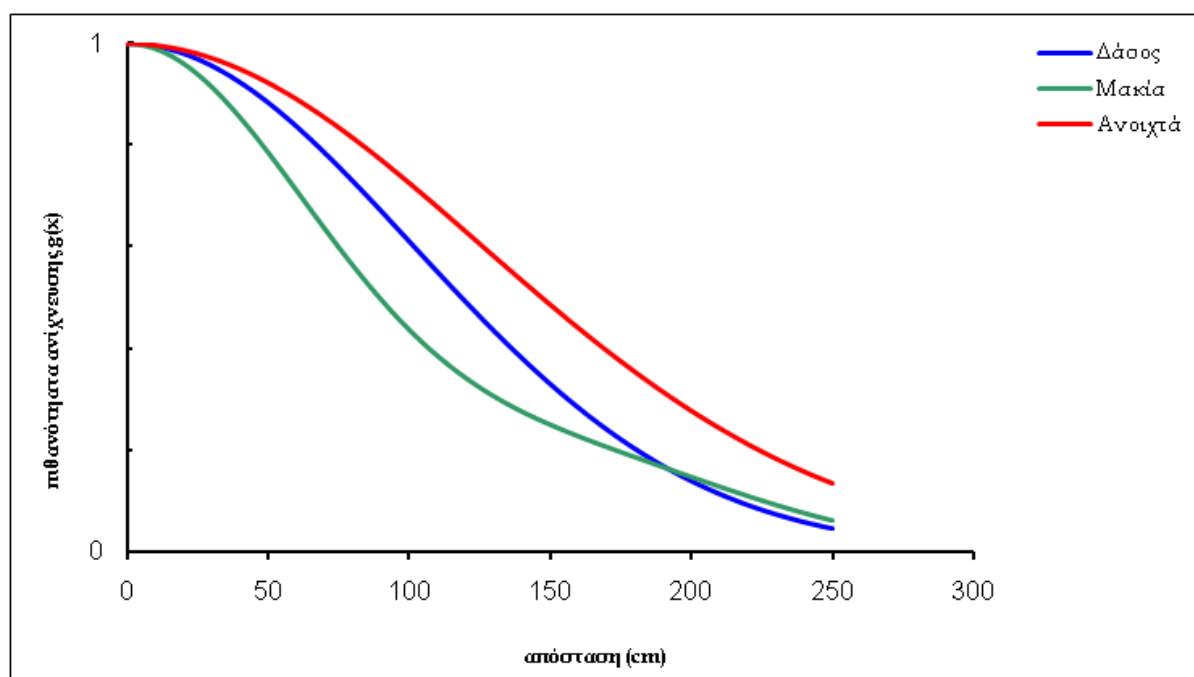
$$p_M = 0,32 \gg 0,05$$



$$p_O = 0,89 \gg 0,05$$

Γράφημα 3.4.4 : Γραφικός και στατιστικός (χ^2 test) έλεγχος της απόκλισης των παρατηρούμενων συχνοτήτων κάθετων αποστάσεων από τις θεωρητικά αναμενόμενες σύμφωνα με τις συναρτήσεις ανιχνευσιμότητας στα ενδαιτήματα F, M και O.

Η κοινή απεικόνιση των γραφικών παραστάσεων της συνάρτησης ανιχνευσιμότητας (Γράφημα 3.4.5) αποκαλύπτει διαφορές στην ικανότητα εντοπισμού των κοπρανοσωρών μεταξύ των ενδιαιτημάτων. Ευκολότερος ήταν ο εντοπισμός στις ανοιχτές εκτάσεις, όπου η πιθανότητα ανίχνευσης μειώνεται με ήπιο τρόπο σε σχέση με την απόσταση. Στο άλλο άκρο, στη μακία βλάστηση η πιθανότητα ανίχνευσης παρουσιάζει μια απότομη μείωση μετά τα 50cm, γεγονός που υποδηλώνει τον δυσκολότερο εντοπισμό των κοπρανοσωρών σε τέτοιου είδους ενδιαιτήματα. Μια ενδιάμεση κατάσταση παρατηρείται στο δάσος των κωνοφόρων. Η διαφορετική ικανότητα καταμέτρησης κοπρανοσωρών στα τρία ενδιαιτήματα αποτυπώνεται αριθμητικά από τις τιμές της πιθανότητας ανίχνευσης (p) και του ενεργού ημιπλάτους (μ) (βλ. Πίνακα 3.4.3). Μεταξύ των ανοιχτών εκτάσεων και της μακίας βλάστησης οι διαφορές των τιμών είναι στατιστικά σημαντικές (t-test $p=0,01$).



Γράφημα 3.4.5 : Οι συναρτήσεις ανιχνευσιμότητας στα τρία ενδιαιτήματα Ε,Μ,Ο.

Πυκνότητα

Οι σημειακές εκτιμήσεις της μέσης πυκνότητας των κοπρανοσωρών και των ζαρκαδιών σε κάθε ενδιαίτημα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.4. Η υψηλότερη πυκνότητα κοπρανοσωρών μετρήθηκε στο δάσος κωνοφόρων ενώ η πυκνότητα ζαρκαδιών ήταν μεγαλύτερη στις ανοιχτές εκτάσεις. Αν και οι τιμές των πυκνοτήτων ήταν διαφορετικές μεταξύ των τριών ενδιαιτημάτων, οι διαφορές αυτές δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικές, όπως έδειξε ο έλεγχος t-test.

Αφθονία

Η συνολική αφθονία των ζαρκαδιών στην περιοχή μελέτης, όπως εκτιμήθηκε με τη χρήση της εξίσωσης 3.3.12 είναι $N=27,31$ ζαρκάδια (σημειακή εκτίμηση) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% $CI= 18,58-36,08$.

Από το τυπικό σφάλμα που είναι $SE=4,46$, προκύπτει ο συντελεστής μεταβολής της αφθονίας: $CV=16,33\%$

Η στρογγυλοποίηση των τιμών ώστε να έχουν φυσική σημασία οδηγεί στην τελική εκτίμηση:

$N=27$ ζαρκάδια με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 19-36.

Προσπάθεια

Συνολικά για τη διεξαγωγή της δειγματοληψίας απαιτήθηκαν 34 ανθρωποημέρες, αφού δύο ερευνητές εργάστηκαν για 17 ημέρες. Με τη συγκεκριμένη προσπάθεια διερευνήθηκε έκταση 44182,5 m² (βλ. Πίνακα 3.4.1) που αντιστοιχεί στο 1,39% της επιφάνειας της περιοχής μελέτης.

Πίνακας 3.4.3 : Τα μοντέλα που επιλέχθηκαν, οι συναρτήσεις ανιχνευσιμότητας, οι τιμές $f(0)$, τα ενεργά ημιπλάτη (μ) και οι εκτιμώμενες πιθανότητες ανίχνευσης για κάθε ενδιαίτημα. Στην τελευταία στήλη ο συντελεστής μεταβολής των $f(0)$, μ και p . Σε παρένθεση τα 95% όρια εμπιστοσύνης.

Ενδιαίτημα	Μοντέλο	Συνάρτηση $g(x)$	$f(0)$	μ (cm)	p	% CV
Δάσος κωνοφόρων	Half normal	$g_F(x) = \exp(-x^2/20321,28)$	0,0080 (0,0073-0,0088)	124,63 (113,06-137,37)	0,4985 (0,4523-0,5495)	4,95
Μακία βλάστηση	Half normal/Cosine	$g_M(x) = \frac{\exp(-x^2/22344,98)[1 + 0,2122 \cos(2\pi x/w)]}{1,2122}$	0,0093 (0,0079-0,0109)	107,78 (91,649-126,75)	0,4311 (0,3666-0,5070)	8,23
Ανοιχτές εκτάσεις	Half normal	$g_O(x) = \exp(-x^2/31250)$	0,0067 (0,0057-0,0078)	149,51 (128,00-174,64)	0,5980 (0,5120-0,6986)	7,86

Πίνακας 3.4.4 : Σημειακές εκτιμήσεις της πυκνότητας των κοπρασωρών (D_G) και των ζαρκαδιών (D_R) σε κάθε ενδιαίτημα.

Τα τοπικά σφάλματα (SE), τα όρια εμπιστοσύνης (95%CI) και οι %CV υπολογίστηκαν με 2000 επαναδειγματοληψίες.

Ενδιαίτημα	D_G (κοπρασωροί/km ²)	% CV	Ρυθμός απόδεσης	*Χρόνος αποικοδόμησης (ημέρες)	D_R (άτομα/km ²)	SE	95% CI	%CV
Δάσος κωνοφόρων	30259,05	19,21	20	154,8 (SE: 13,8)	9,7735	2,069	5,718-13,829	21,17
Μακία βλάστηση	22172,27	21,34	20	143,9 (SE: 19,5)	7,7037	1,945	3,892-11,516	25,25
Ανοιχτές εκτάσεις	29428,54	17,60	20	126,4 (SE: 23)	11,6410	2,948	5,864-17,418	25,32

*Υπολογίστηκε σε ανεξάρτητη έρευνα που παρουσιάζεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3.5

Πείραμα υπολογισμού του χρόνου αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών

1. Γενικά

Ο χρόνος που οι κοπρανοσωροί των οπληφόρων παραμένουν στο περιβάλλον εξαρτάται από παράγοντες οι οποίοι ποικίλλουν έντονα τόσο εποχιακά όσο και μεταξύ των ενδιαιτημάτων (Aulak & Babińska-Werka 1990, Massei *et al.* 1998, Hemami & Dolman 2005). Ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης (mean time to decay) επομένως θα πρέπει να εκτιμάται για τους κοπρανοσωρούς οι οποίοι αποτέθηκαν μέχρι και τη στιγμή που πραγματοποιείται η κυρίως έρευνα (FSC) (Mayle *et al.* 1999, Marques *et al.* 2001). Μια απλή μέθοδος για να επιτευχθεί αυτή η εκτίμηση είναι να εντοπιστούν και να σημειωθούν φρέσκοι κοπρανοσωροί σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά το διάστημα που προηγείται της κυρίως έρευνας και να επιστρέψουμε μόνο μία φορά (τη χρονική στιγμή διεξαγωγής της έρευνας) για να καταγράψουμε εάν και πόσοι έχουν αποικοδομηθεί (Buckland *et al.* 2001, Laing *et al.* 2003). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές μπορεί να γίνει μοντελοποίηση της πιθανότητας επιβίωσης των κοπρανοσωρών και ο υπολογισμός του μέσου χρόνου αποικοδόμησης. Η διάρκεια του πειράματος αποικοδόμησης επιλέγεται να είναι τέτοια ώστε το ποσοστό των κοπρανοσωρών που είναι παλαιότεροι και δεν έχουν υποστεί αποικοδόμηση να είναι πολύ μικρό. Οι εκτιμήσεις του μέσου χρόνου αποικοδόμησης που προκύπτουν με αυτή τη μέθοδο θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν «αναδρομικές» επειδή το πείραμα υπολογισμού του χρόνου αποικοδόμησης προηγείται της διεξαγωγής της FSC έρευνας (Laing *et al.* 2003).

Μετρήσεις του μέσου χρόνου αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών του ζαρκαδιού έχουν πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους σε πληθυσμούς του είδους που ζουν σε εύκρατα οικοσυστήματα της δυτικής και κεντρικής Ευρώπης (Aulak & Babińska-Werka 1990, Mayle *et al.* 1999, Laing *et al.* 2003, Hemami & Dolman 2005, Theuerkauf *et al.* 2008). Αντιθέτως καμία σχετική έρευνα δεν έχει διενεργηθεί στα μεσογειακά οικοσυστήματα. Ο σχεδιασμός του πειράματός μας και η επακόλουθη μοντελοποίηση των δεδομένων επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της εξάρτησης του μέσου χρόνου αποικοδόμησης από τον τύπο ενδιαιτήματος. Με άλλα λόγια, ο στόχος ήταν να ελεγχθεί αν και κατά πόσο ο τύπος του ενδιαιτήματος στον οποίο αποτίθεται ο κοπρανοσωρός επηρεάζει το ρυθμό αποικοδόμησης του ή αυτός εξαρτάται μόνο από τον χρόνο.

Η μοντελοποίηση βασίστηκε στη θεωρία της πληροφορίας (information theory), η οποία εφαρμόστηκε σχετικά πρόσφατα στις βιολογικές επιστήμες και έχει αρκετά διαφορετική φιλοσοφία από την κλασική θεώρηση που στηρίζεται στον έλεγχο της μηδενικής

υπόθεσης. Η θεωρία της πληροφορίας έχει προταθεί ως μια εναλλακτική μέθοδος που πλεονεκτεί σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους για την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου (Burnham & Anderson 2002, Katsanevakis 2006, Katsanevakis *et al.* 2007). Σύμφωνα με την θεωρία αυτή, η ανάλυση δεδομένων νοείται ως η ενοποιημένη διαδικασία (α) του εκ των προτέρων καθορισμού ενός συνόλου υποψήφιων μοντέλων (που έχουν θεωρητική ή εμπειρική βάση), (β) της επιλογής του κατάλληλου μοντέλου με βάση την αρχή της φειδωλότητας και (γ) της εκτίμησης των σχετικών παραμέτρων και της ακρίβειάς τους. Η αρχή της φειδωλότητας υπαγορεύει την επιλογή ενός μοντέλου με τον μικρότερο δυνατό αριθμό παραμέτρων για την επαρκή περιγραφή των δεδομένων, κάνοντας έναν συμβιβασμό μεταξύ της επίτευξης μικρής απόκλισης παρατηρούμενων - εκτιμώμενων τιμών και της επίτευξης μικρής αβεβαιότητας στην παραμετροποίηση του μοντέλου.

Όταν τα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη περισσότερων του ενός μοντέλων τότε η εκτίμηση ενός «μέσου» σταθμισμένου μοντέλου είναι πλεονεκτική προσέγγιση για να οδηγηθούμε σε πιο ισχυρά συμπεράσματα που δεν προκύπτουν υπό τη συνθήκη ενός μόνο συγκεκριμένου μοντέλου. Η εκτίμηση των παραμέτρων μπορεί να γίνει στηριζόμενοι σε κάποια ή και σε όλα τα μοντέλα που έχουν περιληφθεί και όχι μόνο στο «καλύτερο». Αυτή η διαδικασία μπορεί να οριστεί ως *πολυμοντελική συμπερασματολογία* (multi-model inference, MMI) και παρουσιάζει σημαντικά θεωρητικά και πρακτικά πλεονεκτήματα (Burnham & Anderson 2002).

2. Εργασία πεδίου

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή μελέτης εννέα επισκέψεις, οι οποίες ισαπέχαν χρονικά μεταξύ τους, κατά το διάστημα από 13 Σεπτεμβρίου 2006 (1^η επίσκεψη) έως 10 Μαΐου 2007 (τελευταία επίσκεψη). Στις πρώτες οκτώ επισκέψεις ο στόχος ήταν να διερευνηθεί η περιοχή και να εντοπιστούν «φρέσκοι» κοπρανosoωροί. Κάθε κοπρανosoωρός σημαίνονταν και η ακριβής του θέση καταγράφονταν με τη χρήση φορητής συσκευής GPS. Ο χαρακτηρισμός «φρέσκοι» αναφέρεται σε κοπρανosoωρούς που είχαν αποθεθεί το πολύ τρεις ημέρες πριν τον εντοπισμό τους, γεγονός που κρίνονταν εμπειρικά με βάση την υγρασία, την υφή, το χρώμα και την οσμή τους. Για τους σκοπούς της ανάλυσης ορίσαμε την «ηλικία» των κοπρανosoωρών που εντοπιζόνταν σε 1,5 ημέρες (η μέση ηλικία των κοπρανosoωρών που χαρακτηρίζονται ως «φρέσκοι»). Η σήμανση γινόταν με τη χρήση μικρών πασάλων που τοποθετούνταν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην επηρεάζεται η διαδικασία της αποικοδόμησης. Η διερεύνηση της περιοχής μελέτης σε κάθε επίσκεψη αποσκοπούσε στο να επιτευχθούν:

- A. Ο εντοπισμός δέκα ή περισσότερων «φρέσκων» κοπρανοσωρών, από τους οποίους τρεις τουλάχιστον να βρεθούν σε κάθε έναν από τους τρεις διαφορετικούς τύπους ενδιατημάτων.
- B. Να υπάρχει αντιπροσωπευτικό δείγμα κοπρανοσωρών. Η αναζήτηση δεν περιοριζόταν σε κάποιο μόνο τμήμα του εκτροφείου αλλά γινόταν διατρέχοντας τυχαίες διαδρομές σε ολόκληρη την περιοχή μελέτης. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται το ενδεχόμενο μεροληψίας κατά τη δειγματοληψία.

Συνολικά εντοπίστηκαν και σημάνθηκαν 107 κοπρανοσωροί σε οκτώ επισκέψεις, αριθμός που κρίνεται ιδιαίτερα ικανοποιητικός αφού σύμφωνα με τους Buckland *et al.* (2001) 50 κατ' ελάχιστο κοπρανοσωροί θεωρούνται αρκετοί σε τέτοιου είδους πειράματα.

Στην τελευταία επίσκεψη, η οποία συμπίπτει χρονικά με την κυρίως έρευνα (FSC), επισκεφθήκαμε όλους τους σημασμένους κοπρανοσωρούς προκειμένου να ελέγξουμε το βαθμό αποικοδόμησής τους. Ως αποικοδόμηση θεωρείται, όπως προαναφέρθηκε, η «εξαφάνιση» ενός κοπρανοσωρού ανεξαρτήτως του μηχανισμού με τον οποίο αυτή συντελείται. Το κριτήριο για τον καθορισμό του πότε θεωρούμε ότι ένας κοπρανοσωρός έχει αποικοδομηθεί ορίστηκε να είναι το όριο των έξι κοπράνων. Αν τα αναγνωρίσιμα κόπρανα ήταν πάνω από έξι τότε ο κοπρανοσωρός θεωρούνταν μη αποικοδομημένος.

3. Ανάλυση

Για κάθε σημασμένο κοπρανοσωρό i ($i=1, \dots, n$) μια τυχαία μεταβλητή Y_i ορίστηκε να παίρνει τιμή 1 εάν ο κοπρανοσωρός βρέθηκε να μην έχει αποικοδομηθεί κατά την τελευταία επίσκεψη ή 0 εάν είχε αποικοδομηθεί. Ο χρόνος μεταξύ της παραγωγής ενός κοπρανοσωρού και της τελευταίας επίσκεψης (ή αλλιώς, η «ηλικία» του κοπρανοσωρού τη στιγμή της τελευταίας επίσκεψης) ορίστηκε ως t_i . Το ενδιαίτημα H αποτέλεσε μια κατηγορική μεταβλητή που μπορεί να λάβει τρεις τιμές : F για το δάσος κωνοφόρων, M για τη μακία βλάστηση και O για τις ανοιχτές εκτάσεις.

Για να μοντελοποιηθεί η πιθανότητα $p_i=E(Y_i)$ ένας κοπρανοσωρός i να παραμείνει στο πεδίο μέχρι την τελευταία επίσκεψη, χρησιμοποιήθηκε η λογιστική παλινδρόμηση (logistic regression) όπως προτάθηκε από τους Laing *et al.* (2003). Επομένως στη γενική περίπτωση υποθέσαμε ότι:

$$p_i = E(Y_i) = \frac{\exp(b_0 + \sum_j b_j x_{ij})}{1 + \exp(b_0 + \sum_j b_j x_{ij})} \quad [\text{Εξίσωση 3.5.1}]$$

Όπου x_{ij} είναι η τιμή της συμμεταβλητής j ($j \geq 1$) για τον κοπρανοσωρό i και b_j είναι εκτιμώμενες παράμετροι ($j \geq 0$). Με βάση την τυπολογία των γενικευμένων γραμμικών μοντέλων (generalized linear models) (McCullagh & Nelder 1989) η Εξίσωση 3.5.1 παίρνει τη μορφή:

$$g(p_i) = \text{logit}(p_i) = b_0 + \sum_j b_j x_{ij} \quad [\text{Εξίσωση 3.5.2}]$$

Το 'logit' χρησιμοποιήθηκε ως συνάρτηση σύνδεσης (link function) και ορίζεται ως ο φυσικός λογάριθμος του λόγου της πιθανότητας ένας κοπρανοσωρός να παραμείνει έως την τελευταία επίσκεψη προς την πιθανότητα να έχει αποικοδομηθεί.

$$\text{logit}(p_i) = \ln \frac{p_i}{1 - p_i} \quad [\text{Εξίσωση 3.5.3}]$$

Τέσσερα υποψήφια μοντέλα (f_m , $m=0$ έως 3) με τη μορφή της Εξίσωσης 3.5.2 χρησιμοποιήθηκαν για να μοντελοποιηθεί η πιθανότητα p_i .

- Το μηδενικό μοντέλο f_0 δεν περιλάμβανε καμία μεταβλητή: $f_0 : \text{logit}(p_i) = b_0$.
- Στο μοντέλο f_1 η μόνη μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η «ηλικία» των κοπρανοσωρών, t : $f_1 : \text{logit}(p_i) = b_0 + b_1 t$.
- Στο f_2 προστέθηκε ο τύπος ενδαιτήματος H ως κατηγορική μεταβλητή, ενώ ο συντελεστής της ηλικίας ήταν κοινός σε όλα τα ενδαιτήματα ($t+H$): $f_2 : \text{logit}(p_i) = b_0 + b_1 t + b_2 H \Leftrightarrow \text{logit}(p_i) = [b_0 + b_2 H] + b_1 t$.
- Στο μοντέλο f_3 τέλος, προστέθηκε ένας όρος αλληλεπίδρασης ηλικίας και ενδαιτήματος. Ο συμβολισμός $t \times H$ χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει την ύπαρξη τόσο της κυρίως επίδρασης των δύο συμμεταβλητών όσο και της αλληλεπίδρασής τους. Με αυτό τον τρόπο επιτρέπεται η ύπαρξη διαφορετικών συντελεστών του t για κάθε τύπο ενδαιτήματος:

$$f_3 : \text{logit}(p_i) = b_0 + b_1 t + b_2 H + b_3 H t \Leftrightarrow \text{logit}(p_i) = [b_0 + b_2 H] + [b_1 + b_3 H] t$$

Για την επιλογή μοντέλου χρησιμοποιήθηκε η διορθωμένη μορφή, AIC_c (Hurvich & Tsai 1989), του κριτηρίου του Akaike, AIC (Akaike 1973, Burnham & Anderson 2002). Η διόρθωση συνίσταται στον περιορισμό του συστηματικού σφάλματος που υπάρχει λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος. Το μοντέλο με τη μικρότερη τιμή AIC_c ($AIC_{c,\min}$) επιλέχθηκε ως το καλύτερο ανάμεσα σε αυτά που ελέγχθηκαν. Επίσης, υπολογίστηκαν οι διαφορές AIC_c για όλα τα υποψήφια μοντέλα: $\Delta_m = AIC_{c,m} - AIC_{c,\min}$.

Σύμφωνα με τους Burnham & Anderson (2002) μοντέλα με $\Delta_m > 10$ δεν έχουν ουσιαστικά καμία υποστήριξη και μπορούν να παραληφθούν από τη μετέπειτα επεξεργασία.

Τα μοντέλα με $\Delta_m < 2$ εμφανίζουν ουσιαστική στήριξη ενώ αυτά με $4 < \Delta_m < 7$ σαφώς μικρότερη.

Για να ποσοτικοποιηθεί η αληθοφάνεια κάθε μοντέλου, υπολογίστηκαν τα «σταθμά Akaike» (Akaike weights): $w_m = \frac{\exp(0.5\Delta_m)}{\sum_{k=0}^3 \exp(0.5\Delta_k)}$ που μπορούν να θεωρηθούν ότι

εκφράζουν την πιθανότητα το μοντέλο m να είναι το βέλτιστο μεταξύ του συνόλου των υποψήφιων μοντέλων (Akaike 1983, Buckland *et al.* 1997, Burnham & Anderson 2002). Τα σταθμά Akaike μπορούν να ερμηνευθούν ως μια εκ των υστέρων προκύπτουσα κατανομή πιθανοτήτων επί του συνόλου των υποψήφιων μοντέλων.

Για να έχουμε μια πιο ισχυρή συμπερασματολογία, τα τελικά αποτελέσματα στηρίχθηκαν σε μια διαδικασία μοντελοποίησης της εξαρτημένης μεταβλητής με συνυπολογισμό όλων των μοντέλων (model average) χρησιμοποιώντας τα σταθμά Akaike (πολυμοντελική συμπερασματολογία -MMI) (Burnham & Anderson 2002).

Ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης $\hat{\mu}$ εκτιμήθηκε για κάθε τύπο ενδιαιτήματος ξεχωριστά και για κάθε ένα από τα μοντέλα f_1 , f_2 και f_3 χρησιμοποιώντας τον τύπο (Laing *et al.* 2003):

$$\hat{\mu} = \int_0^{\infty} \frac{-\beta_1 t [1 + \exp(-\beta_0)] \exp(-(\beta_0 + \beta_1 t))}{[1 + \exp(-(\beta_0 + \beta_1 t))]^2} dt \quad [\text{Εξίσωση 3.5.4}]$$

όπου τα β_0 and β_1 αντικαθίστανται από τις εκτιμώμενες παραμέτρους της λογιστικής παλινδρόμησης του Y με το t (το β_0 αντιστοιχεί στον σταθερό όρο και το β_1 στο συντελεστή του t).

Ακολουθώντας την προσέγγιση MMI, ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης, $\hat{\mu}$, εκτιμήθηκε για κάθε τύπο ενδιαιτήματος ως μια σταθμισμένη μέση τιμή χρησιμοποιώντας όλα τα υποψήφια μοντέλα με την πρόβλεψη κάθε μοντέλου σταθμισμένη με w_m :

$$\hat{\mu} = \sum_{m=0}^3 w_m \hat{\mu}_m \quad [\text{Εξίσωση 3.5.5}]$$

Το τυπικό σφάλμα του $\hat{\mu}$ εκτιμήθηκε με δύο τρόπους:

Α) Σύμφωνα με τους Burnham & Anderson (2002) ως:

$$se(\hat{\mu}) = \sum_{m=0}^3 w_m \sqrt{(\text{var}(\hat{\mu}_m | f_m) + (\hat{\mu}_m - \hat{\mu})^2)} \quad [\text{Εξίσωση 3.5.6}]$$

Όπου $\text{var}(\hat{\mu}_m | f_m) = [se(\hat{\mu}_m | f_m)]^2$ είναι η διακύμανση του εκτιμώμενου μέσου χρόνου αποικοδόμησης υπό τη συνθήκη του μοντέλου f_m . Όλα τα τυπικά σφάλματα $se(\hat{\mu}_m | f_m)$ και

τα αντίστοιχα 95% όρια εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν με τη διαδικασία bootstrap και πλήθος επαναδειγματοληψιών $B=10000$ (Efron & Tibshirani 1993).

B) Επίσης υπολογίστηκε ένα bootstrap ($B=10.000$) τυπικό σφάλμα και τα 95% όρια εμπιστοσύνης του μ . Για να επιτευχθεί αυτό έγιναν τα ακόλουθα για κάθε bootstrap δείγμα b :

(1) εκτίμηση του μέσου χρόνου αποικοδόμησης $\hat{\mu}_{m,b}$ υπό τη συνθήκη του κάθε μοντέλου m ,
 (2) υπολογισμός των σταθμών Akaike, (3) υπολογισμός του μέσου μοντέλου και του πολυμοντελικού μέσου χρόνου αποικοδόμησης $\hat{\mu}_b$. Από την κατανομή των μέσων χρόνων αποικοδόμησης στα bootstrap δείγματα έγινε εκτίμηση του τυπικού σφάλματος και του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης του $\hat{\mu}_b$.

Οι στατιστικοί και μαθηματικοί υπολογισμοί για όλες τις αναλύσεις του πειράματος πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πακέτο λογισμικού R v.2.4.0 (R Development Core Team 2006).

4. Αποτελέσματα

Αποικοδόμηση κοπρανοσωρών

Στον Πίνακα 3.5.2 παρουσιάζονται τα πρωτογενή αποτελέσματα της δειγματοληψίας, δηλαδή ποιοι κοπρανοσωροί «επιβίωσαν» μέχρι την τελευταία επίσκεψη. Οι κοπρανοσωροί που είχαν σημειωθεί τον Σεπτέμβριο και τον Οκτώβριο σε όλα τα ενδιαυτήματα είχαν αποικοδομηθεί πλήρως. Με βάση τα πρωτογενή δεδομένα και για κάθε ένα από τα υποψήφια μοντέλα υπολογίστηκαν AIC_c , Δ_m and w_m και οι τιμές τους δίνονται στον Πίνακα 3.5.1.

Πίνακας 3.5.1 : Υποστήριξη μοντέλων

Μοντέλο	Συμμεταβλητές	AIC_c	Δ_m	w_m (%)
f_0	καμία	170,0	50,2	0,0
f_1	t	120,9	1,1	24,3
f_2	$t+H$	119,8	0,0	42,0
f_3	t^*H	120,2	0,4	33,7

Πίνακας 3.5.2 : Πρωτογενή αποτελέσματα δειγματοληψιών

Κωδικός σημείου	Ημερομηνία	ενδιαίτημα	Υ	t (ημέρες)	Κωδικός σημείου	Ημερομηνία	ενδιαίτημα	Υ	t
A1		F	0		E1		O	0	
A2		F	0		E2		O	1	
A3		F	0		E3		F	1	
A4		F	0		E4		F	1	
A5		F	0		E5		O	0	
A6		M	0		E6		M	1	
A7		M	0		E7		F	0	
A8	13/9/2006	M	0	240,5	E8	8/1/2007	M	1	123,5
A9		M	0		E9		O	1	
A10		M	0		E10		O	0	
A11		O	0		E11		F	1	
A12		O	0		E12		F	1	
A13		O	0		E13		M	0	
A14		O	0		E14		M	0	
A15		O	0		E15		M	1	
B1		O	0		F1		F	0	
B2		O	0		F2		F	1	
B3		O	0		F3		O	1	
B4		M	0		F4		M	0	
B5	13/10/2006	M	0	210,5	F5		O	1	
B6		O	0		F6		M	0	
B7		O	0		F7		O	1	
B8		F	0		F8	6/2/2007	M	1	94,5
B9		F	0		F9		M	1	
B10		F	0		F10		F	1	
C1		O	1		F11		F	1	
C2		F	0		F12		F	1	
C3		F	1		F13		O	0	
C4		M	1		F14		O	0	
C5	15/11/2006	O	0	177,5	F15		M	1	
C6		O	1		G1		O	0	
C7		O	1		G2		O	0	
C8		M	1		G3		F	1	
C9		M	0		G4		F	1	
D1		O	0		G5		F	1	
D2		O	0		G6		M	0	
D3		F	1		G7	7/3/2007	O	1	65,5
D4		F	1		G8		M	1	
D5		O	1		G9		O	0	
D6		O	0		G10		M	1	
D7		O	0		G11		O	0	
D8	8/12/2006	F	0	154,5	G12		F	1	
D9		F	0		G13		M	1	
D10		F	1		H1		O	1	
D11		F	0		H2		O	1	
D12		M	1		H3		F	1	
D13		M	0		H4		F	1	
D14		M	0		H5		F	1	
D15		M	1		H6		M	1	
					H7		M	1	
					H8	2/4/2007	O	1	39,5
					H9		O	0	
					H10		M	1	
					H11		F	1	
					H12		O	1	
					H13		M	1	
					H14		F	1	
					H15		M	0	

Τα μοντέλα f_1 , f_2 and f_3 παρουσίασαν σημαντική υποστήριξη ($\Delta_m < 2$) από τα δεδομένα σε αντίθεση με το μηδενικό μοντέλο το οποίο λόγω έλλειψης στατιστικής υποστήριξης ($\Delta_0 = 50,2$) παραλήφθηκε από την περαιτέρω επεξεργασία. Οι εξισώσεις των τριών μοντέλων είχαν ως εξής:

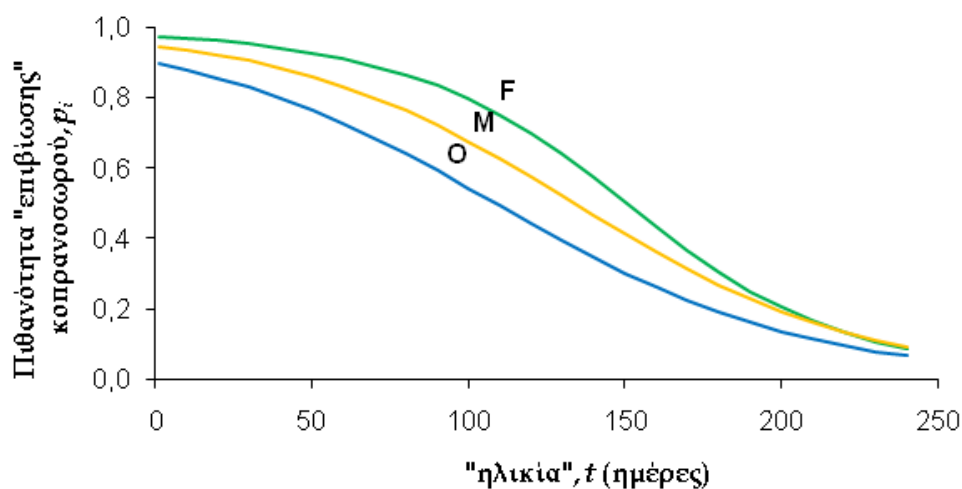
$$f_1: \text{logit}(p_i) = 2,857 - 0,00218 \times t, \text{ για F, M, O}$$

$$f_2: \text{logit}(p_i) = \begin{cases} 3,625 - 0,0228 \times t, \text{ για το F} \\ 3,059 - 0,0228 \times t, \text{ για το M} \\ 2,319 - 0,0228 \times t, \text{ για το O} \end{cases}$$

$$f_3: \text{logit}(p_i) = \begin{cases} 6,312 - 0,0414 \times t, \text{ για το F} \\ 2,757 - 0,0203 \times t, \text{ για το M} \\ 1,723 - 0,0173 \times t, \text{ για το O} \end{cases}$$

Τα μοντέλα f_2 και f_3 , τα οποία υποθέτουν ειδικές για κάθε ενδιαίτημα πιθανότητες αποικοδόμησης, εμφανίζουν τη μεγαλύτερη υποστήριξη με βάση τα δεδομένα μας ($\Delta_2 = 0,0$ and $\Delta_3 = 0,4$) σε σχέση με το μοντέλο f_1 , το οποίο υποθέτει κοινές πιθανότητες αποικοδόμησης και στους τρεις τύπους ενδιαιτημάτων ($\Delta_1 = 1,1$). Αν και το μοντέλο f_2 είναι το «καλύτερο», κανένα από τα δύο μοντέλα που εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές Δ (f_1 και f_3) δεν μπορεί να απορριφθεί ως αβάσιμο, τουλάχιστον με βάση τα υπάρχοντα από τη δειγματοληψία μας δεδομένα. Οπότε και τα τρία μοντέλα συμπεριλήφθηκαν στην επακόλουθη επεξεργασία.

Η καμπύλη λογιστικής παλινδρόμησης της πιθανότητας να έχει «επιβιώσει» ένας κοπρανοσωρός κατά την τελευταία επίσκεψη p_i σε συνάρτηση με την «ηλικία» του κοπρανοσωρού t_i υπολογίστηκε για κάθε ενδιαίτημα ως ο σταθμισμένος μέσος όρος των τριών σημαντικών μοντέλων (model averaging). (Γράφημα 3.5.1)



Γράφημα 3.5.1 : Καμπύλες λογιστικής παλινδρόμησης

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3.5.1 όσο παλαιότερος είναι ένας κοπρανosoωρός τόσο αυξημένη είναι η πιθανότητα να έχει αποικοδομηθεί. Η διαφορετική κλίση των καμπωλών στα τρία ενδιαυτήματα αποτελεί μια σαφή ένδειξη πως η αποικοδόμηση συντελείται με διαφορετικούς ρυθμούς. Πιο γρήγορη αναμένεται η αποικοδόμηση στις ανοιχτές εκτάσεις ενώ πιο αργή στο δάσος κωνοφόρων. Ένας κοπρανosoωρός που αποτέθηκε για παράδειγμα 60 ημέρες πριν την ημερομηνία καταμέτρησης (10 Μαΐου) εμφανίζει άνω του 25% πιθανότητα να έχει αποικοδομηθεί αν η απόθεση έγινε σε ανοιχτές εκτάσεις, περίπου 15% στη μακία βλάστηση και λιγότερο από 5% στο δάσος κωνοφόρων.

Μέσος χρόνος αποικοδόμησης

Ο ειδικός για κάθε ενδιαυτήριο μέσος χρόνος αποικοδόμησης των κοπρανosoωρών του ζαρκαδιού, υπό τη συνθήκη του καθενός από τα τρία μοντέλα, υπολογίστηκε από την Εξίσωση 3.5.4. Οι πολυμοντελικά εκτιμώμενες τιμές του μέσου χρόνου αποικοδόμησης προέκυψαν από την Εξίσωση 3.5.5. (Πίνακας 3.5.3).

Πίνακας 3.5.3 : Εκτιμήσεις μέσου χρόνου αποικοδόμησης

μοντέλο	μέσος χρόνος αποικοδόμησης, μ (ημέρες)			
	σημειακή εκτίμηση	S.E.	95% CI	% CV
Δάσος κωνοφόρων (F)				
f_1	141,0	10,1	122,0-161,7	7
f_2	164,5	15,5	138,0-199,8	9,4
f_3	152,5	12,5	126,6-176,9	8
model-averaged	154,8	se ₁ : 16.1 se ₂ : 13.8	131,1-185,9	10,4 8,9
Μακία βλάστηση (M)				
f_1	141,0	10,1	122,0-161,7	7
f_2	142,7	17,5	109,9-178,5	12,3
f_3	147,4	23,7	110,2-200,9	16,1
model-averaged	143,9	se ₁ : 18.0 se ₂ : 19.5	110,6-188,8	12,5 13,5
Ανοιχτές περιοχές (O)				
f_1	141,0	10,1	122,0-161,7	7
f_2	116,3	16,2	86,4-150,6	13,9
f_3	128,5	25,7	91,9-199,2	20
model-averaged	126,4	se ₁ : 21.0 se ₂ : 23.0	87,9-177,4	16,6 18,2

Κόστος εφαρμογής

Για τη πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος απαιτήθηκαν 8 επισκέψεις από έναν ερευνητή πριν από την κυρίως δειγματοληψία της μεθόδου FSC, στις οποίες εντοπίστηκαν και σημάνθηκαν οι κοπρανοσφωροί. Συνολικά επομένως χρειάστηκαν 8 ανθρωποημέρες εργασίας. Ο έλεγχος της αποικοδόμησης για το σύνολο των κοπρανοσφωρών έγινε κατά τη διάρκεια της κυρίως FSC δειγματοληψίας και επομένως η απαιτούμενη προσπάθεια έχει ήδη συνοπολογιστεί.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόσαμε πιλοτικά δύο έμμεσες μεθόδους πληθυσμιακής εκτίμησης με καταμέτρηση κοπρανοσφρών (FAR & FSC distance sampling) προκειμένου να υπολογίσουμε την πυκνότητα και την αφθονία του πληθυσμού ζαρκαδιών που ζει στο εκτροφείο Σουβάρδου Καλαβρύτων. Στον Πίνακα 3.6.1 παρατίθενται συγκεντρωτικά τα βασικά στοιχεία του δειγματοληπτικού σχεδιασμού και τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τις δύο έρευνες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε διαδοχικές χρονιές και όχι παράλληλα. Με την πρώτη έρευνα (μέθοδος FAR- Κεφάλαιο 3.3) υπολογίστηκαν η μέση πυκνότητα και η αφθονία των ζαρκαδιών στο σύνολο της περιοχής μελέτης κατά την περίοδο Απριλίου-Μαΐου 2006. Με τη δεύτερη (μέθοδος FSC distance sampling-Κεφάλαιο 3.4) εκτιμήθηκαν οι μέσες πυκνότητες σε κάθε ένα από τα ενδιαιτήματα και η μέση αφθονία στο σύνολο της περιοχής μελέτης για ένα χρονικό διάστημα περίπου 8 μηνών πριν από τον Μάιο του 2007.

Πίνακας 3.6.1 : Συγκριτική παράθεση των ερευνών πληθυσμιακής εκτίμησης

Έρευνα (έτος)		Α (2006)		Β (2007)	
Μέθοδος		FAR		FSC distance sampling	
δειγματοληψία		τυχαία συστηματική χωρίς στρωματοποίηση		τυχαία συστηματική με στρωματοποίηση	
δειγματοληπτικές μονάδες	συνολικά	44 plots		104 ευθείες διαδρομές	
	ανοιχτές εκτάσεις	3		45	
	δάσος	29		27	
	μακία	12		32	
Πυκνότητα (άτομα/km ²)	D	13,9	20,7%	-	-
	D _{ανοιχ.εκτάσεις}	-	-	11,64	21,17%
	D _{δάσος}	-	-	9,77	25,25%
	D _{μακία}	-	-	7,70	25,32%
Αφθονία (άτομα)	N	44		27	
	95% CI	28-64		19-36	
	CV	20,7%		16,3%	
Προσπάθεια	Ανθρωποημέρες	30		34 (+8)*	
Έκταση δειγματοληψίας	συνολική επιφάνεια (m ²)	2640		44182,5	
Δείκτης δειγματοληπτικής προσπάθειας	ανθρωποημέρες /1000m ²	11,36		0,84 (+8)*	

* Συμπεριλαμβανομένου του πειράματος υπολογισμού του χρόνου αποικοδόμησης

Ευστοχία

Βασική παράμετρος που καθορίζει το βαθμό αξιοπιστίας μιας μεθόδου είναι η ορθότητα των εκτιμήσεών της. Για να αποφανθούμε για την ευστοχία μιας εκτίμησης πρέπει να γνωρίζουμε την πραγματική αφθονία του πληθυσμού τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο που πραγματοποιείται η σχετική δειγματοληψία. Το μόνο στοιχείο, ωστόσο, που είχαμε στη διάθεσή μας ήταν μια εμπειρική και αόριστη εκτίμηση από τους υπαλλήλους του Δασαρχείου Καλαβρύτων, σύμφωνα με την οποία η αφθονία των ζαρκαδιών του εκτροφείου Σουβάρδου κυμαίνεται μεταξύ 50 και 60 ατόμων. Η αμφίβολη εγκυρότητα αυτής της εκτίμησης δεν επιτρέπει τη χρήση της ως αναφορά για την αξιολόγηση της ευστοχίας των δικών μας εκτιμήσεων. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι δύο έρευνες πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετική περίοδο καθιστά κάθε προσπάθεια μεταξύ τους σύγκρισης παρακινδυνευμένη. Παρόλο που ο πληθυσμός είναι κλειστός και προστατευμένος, κανένα στοιχείο δεν μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι το μέγεθός του παρέμεινε σταθερό κατά το διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ των δύο δειγματοληψιών.

Έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα συμπεράσματα σε σχέση με τη συγκριτική αξιολόγηση της ευστοχίας των μεθόδων FSC και FAR. Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η FSC παρέχει λιγότερο εύστοχες εκτιμήσεις σε σχέση με την FAR, γιατί απαιτεί μεθοδολογικά τον υπολογισμό του χρόνου αποικοδόμησης και επομένως ενσωματώνει μια επιπλέον πηγή ενδεχόμενου δειγματοληπτικού σφάλματος (Mitchell & McCowan 1979, Nchanji & Plumptre 2001, Mayle *et al.* 1999). Ωστόσο, σύμφωνα με την έρευνα των Smart *et al.* 2004 οι οποίοι πραγματοποίησαν αναλύσεις προσομοιώσεων δειγματοληψίας σε πληθυσμούς ζαρκαδιών γνωστού μεγέθους, η ευστοχία των εκτιμήσεων της μεθόδου FSC υπερτερούσε και για τις τρεις διαφορετικές πληθυσμιακές πυκνότητες που ελέγχθηκαν. Ως απαραίτητη προϋπόθεση για τη λήψη ορθών εκτιμήσεων της αφθονίας με τη χρήση οποιασδήποτε μεθόδου είναι να τηρούνται απαρέγκλιτα στην πρακτική εφαρμογή οι θεωρητικές υποθέσεις ισχύος της και να περιορίζονται τα συστηματικά σφάλματα. Όπως λεπτομερώς εξηγήθηκε προηγουμένως δεν είναι δυνατό με βάση τα δεδομένα μας να αξιολογηθεί η ευστοχία των εκτιμήσεων της παρούσας μελέτης. Είναι ωστόσο χρήσιμο στο σημείο αυτό να αναφερθεί και να σχολιαστεί μια συγκεκριμένη επιλογή, που εκτιμούμε ότι μπορεί να επηρέασε την ορθή εφαρμογή των μεθόδων και επομένως την ευστοχία των εκτιμήσεών τους.

Ο ρυθμός απόδευσης είναι απαραίτητος τόσο στη μέθοδο FAR όσο και στην FSC για τη μετατροπή της πυκνότητας των κοπρασωρών σε πυκνότητα ατόμων (βλ Εξισώσεις 3.3.1 & 3.4.10) και επομένως μια λανθασμένη τιμή του επηρεάζει αρνητικά την ευστοχία των εκτιμήσεων αφθονίας. Μεθοδολογικά ορθό θα ήταν να εκτιμήσουμε το ρυθμό απόδευσης για τον πληθυσμό που μελετήσαμε (Mayle *et al.* 1999). Αυτό ωστόσο αποδείχθηκε πρακτικά αδύνατο στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης και ως καλύτερη λύση επιλέχθηκε η χρήση μιας

δημοσιευμένης τιμής (20 κοπρανοσώροι/ημέρα, Mitchell *et al.* 1985). Η τακτική αυτή αποτελεί μεν τη συνήθη πρακτική σε πολλές έρευνες (ενδεικτικά βλ. Mayle *et al.* 1999, Hemami *et al.* 2005, Bongji 2008, Fattorini *et al.* 2011) αλλά δεν παύει να συνιστά μια αυθαίρετη παραδοχή και μια ενδεχόμενη πηγή σφάλματος, που μπορεί να επηρέασε την αξιοπιστία των εκτιμήσεών μας. Ουσιαστικά υποθέσαμε ότι ο πραγματικός ρυθμός αφοδευσης των ζαρκαδιών του εκτροφείου ήταν σταθερός και ίσος με τον δημοσιευμένο. Αν όμως η υπόθεση είναι εσφαλμένη θα υπάρχει σημαντική απόκλιση της εκτιμώμενης αφθονίας από την πραγματική. Για να γίνει αντιληπτή η σημασία της τιμής του ρυθμού αφοδευσης για την ευστοχία της εκτιμώμενης αφθονίας αρκεί να αναφέρουμε ενδεικτικά αποτελέσματα από τη χρήση μιας διαφορετικής τιμής. Αν για παράδειγμα επιλέγαμε την τιμή 14 κοπρανοσώροι/ημέρα (Prokešová *et al.* 2006) τότε με βάση τη δειγματοληψία FAR η μέση αφθονία θα ήταν $N_{14}=63$ άτομα, δηλαδή κατά 43% μεγαλύτερη από αυτή που υπολογίσαμε ($N_{20}=44$).

Γενικά η έλλειψη εκτιμήσεων του ρυθμού αφοδευσης σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών (εποχή, ενδιαιτήματα, αφθονία τροφής) έχει αναφερθεί ως ένας από τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά την ευστοχία των εκτιμώμενων αφθονιών με τις μεθόδους καταμέτρησης κοπρανοσώρων (Dzięciołowski 1976, Marques *et al.* 2001). Δυστυχώς μέχρι σήμερα καμία προσπάθεια προσδιορισμού του ρυθμού αφοδευσης του ζαρκαδιού δεν έχει γίνει σε περιοχές με ορεινά, μεσογειακά οικοσυστήματα (π.χ. Ελλάδα), γεγονός που μας ανάγκασε να χρησιμοποιήσουμε μια τιμή που προέκυψε από μελέτες σε ζαρκάδια στη Βρετανία (Mitchell *et al.* 1985). Για να καλυφθεί αυτή η έλλειψη αξιόπιστων τιμών του ρυθμού αφοδευσης για τα συγκεκριμένα οικοσυστήματα είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση μελετών συσσώρευσης κοπρανοσώρων σε πολύ μικρούς, αιχμάλωτους πληθυσμούς με γνωστό όμως μέγεθος (Mayle *et al.* 1999)

Ακρίβεια

Η αξιοπιστία και η διαχειριστική χρησιμότητα των πληθυσμιακών εκτιμήσεων που προκύπτουν από μια μεθοδολογική προσέγγιση καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ακρίβειά τους (Smart *et al.* 2004, Cambell *et al.* 2004). Εκτιμήσεις που παρουσιάζουν πολύ μεγάλη διακύμανση και επομένως ευρεία όρια εμπιστοσύνης δεν είναι στατιστικά ισχυρές και δεν μπορούν να αξιοποιηθούν για τη λήψη διαχειριστικών αποφάσεων (Marques 2009).

Η ακρίβεια των εκτιμήσεων της πυκνότητας και της αφθονίας που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη περιγράφεται από τους συντελεστές μεταβολής CV% και τα όρια εμπιστοσύνης. Σε έρευνες πεδίου, συντελεστές μεταβολής της τάξης του 20% θεωρούνται αποδεκτοί (Καρανδρινός 2007). Οι τιμές των συντελεστών μεταβολής κυμάνθηκαν (βλ.

Πίνακα 3.6.1) εντός του εύρους τιμών που έχουν αναφερθεί σε άλλες έρευνες καταμέτρησης κοπρανοσωρών τόσο στο ζαρκάδι (Mayle *et al.* 1999, Smart *et al.* 2004, Cambell *et al.* 2004, Fattorini *et al.* 2011) όσο και σε άλλα σπληφόρα (Marques *et al.* 2001, Ellis & Bernard 2005). Με βάση αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι και οι δύο έρευνες έδωσαν εκτιμήσεις με ικανοποιητικά επίπεδα ακρίβειας και επομένως οι μέθοδοι στις οποίες στηρίχθηκαν είναι δυνατόν να εφαρμοστούν με επιτυχία και στη μελέτη πληθυσμών του ζαρκαδιού σε ορεινά μεσογειακά οικοσυστήματα.

Θα πρέπει βέβαια στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι τόσο στην έρευνα FAR όσο και στην FSC υπήρξε μια μικρή υπερεκτίμηση της ακρίβειας επειδή αγνοήσαμε τη διακύμανση του ρυθμού αφόδευσης. Χρησιμοποιώντας τη δημοσιευμένη τιμή 20 κοπρανοσωροί/ημέρα, θεωρήσαμε ότι το τυπικό σφάλμα είναι μηδενικό ($SE=0$). Είναι προφανές ότι αν εκτιμούσαμε με ένα ανεξάρτητο πείραμα το ρυθμό αφόδευσης, η ύπαρξη τυπικού σφάλματος στην εκτίμηση θα συνέβαλε στην αύξηση της συνολικής διακύμανσης της πυκνότητας και της αφθονίας (βλ. Εξίσωση 3.4.11) και άρα στην αύξηση των συντελεστών μεταβολής.

Συγκριτικά η αφθονία των ζαρκαδιών υπολογίστηκε με μεγαλύτερη ακρίβεια στη FSC έρευνα ($\%CV_{FSC} < \%CV_{FAR}$). Το γεγονός, ωστόσο, ότι οι δύο έρευνες διέφεραν σημαντικά ως προς τον δειγματοληπτικό σχεδιασμό (στρωματοποίηση, αριθμός και έκταση δειγματοληπτικών μονάδων), καθιστά παρακινδυνευμένη κάθε προσπάθεια συγκριτικής αξιολόγησης της ακρίβειας των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές.

FAR

Μια σημαντική αδυναμία της συγκεκριμένης έρευνας, η οποία σχετίζεται με την ακρίβεια των εκτιμήσεων, ήταν η έλλειψη στρωματοποίησης στη δειγματοληψία. Η απουσία δεδομένων για την κατανομή και την έκταση που καταλάμβαναν τα τρία ενδιαίτηματα (η χαρτογράφηση πραγματοποιήθηκε την επόμενη χρονιά) δεν μας επέτρεψε να σχεδιάσουμε επιμέρους δειγματοληψίες ώστε να υπολογίσουμε την πυκνότητα των ζαρκαδιών σε κάθε ένα από αυτά. Η στρωματοποίηση έχει αναφερθεί ως μια σημαντική παράμετρος του δειγματοληπτικού σχεδιασμού που μπορεί υπό προϋποθέσεις να βελτιώσει τόσο την ευστοχία όσο και την ακρίβεια των εκτιμήσεων (Conroy & Nichols 1996, Mayle *et al.* 1999). Πιο συγκεκριμένα, ο υπολογισμός πυκνοτήτων σε κάθε ενδιαίτημα ελαττώνει τη συνολική διακύμανση των εκτιμήσεων της αφθονίας γιατί αφαιρεί την μεταξύ των ενδιαιτημάτων ενδεχόμενη διακύμανση (Fattorini *et al.* 2011).

Σύμφωνα με μελέτες, οι οποίες έχουν αξιολογήσει τις μεθόδους καταμέτρησης κοπρανοσωρών, η μέθοδος FAR παρουσιάζει τη βέλτιστη ακρίβεια σε πληθυσμούς με μεγάλες πυκνότητες (περισσότερα από 30 άτομα/km²) (Mayle *et al.* 1999, Smart *et al.* 2004, Campbell *et al.* 2004). Όταν η πυκνότητα των ζώων είναι χαμηλή τότε είναι μικρότερος και ο αριθμός των κοπρανοσωρών που συσσωρεύονται στο περιβάλλον σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα

και επομένως είναι αυξημένη η πιθανότητα πολλές από τις δειγματοληπτικές επιφάνειες να μην περιέχουν κοπρανοσωρούς. Η ύπαρξη όμως μηδενικών παρατηρήσεων (δειγματοληπτικών επιφανειών με μηδενική συσσώρευση) αυξάνει τη διακύμανση της μέσης πυκνότητας και οδηγεί σε εκτιμήσεις με ευρεία όρια εμπιστοσύνης (Mayle *et al.* 1999). Τόσο σύμφωνα με την εμπειρική εκτίμηση του Δασαρχείου Καλαβρύτων όσο και με βάση τις εκτιμήσεις της παρούσας μελέτης η πυκνότητα του πληθυσμού ζαρκαδιών στο εκτροφείο δεν υπερβαίνει ούτε στην καλύτερη περίπτωση τα 20 άτομα/km². Όπως αναμενόταν λόγω της χαμηλής πληθυσμιακής πυκνότητας, στην πλειοψηφία των δειγματοληπτικών επιφανειών (σε 24 από τις 44) δεν βρέθηκε κανένας κοπρανοσωρός (βλ. Γράφημα 3.3.1, σελ. 154), γεγονός που επηρέασε σημαντικά την ακρίβεια της εκτιμώμενης πυκνότητας των ζαρκαδιών. Επειδή η πιθανότητα μηδενικών παρατηρήσεων εξαρτάται από την έκταση των δειγματοληπτικών επιφανειών αλλά και του διαστήματος συσσώρευσης, διαπιστώνουμε εκ του αποτελέσματος ότι οι σχετικές επιλογές του δειγματοληπτικού σχεδιασμού δεν ήταν οι ιδανικές. Η βελτίωση της ακρίβειας των εκτιμήσεων σε τέτοιες πυκνότητες θα μπορούσε να προέλθει με την υιοθέτηση είτε μεγαλύτερων επιφανειών είτε ευρύτερου διαστήματος συσσώρευσης.

Η ακρίβεια των εκτιμήσεων μπορεί να επηρεαστεί από την ένταση της δειγματοληψίας, δηλαδή το ποσοστό που καταλαμβάνει η περιοχή δειγματοληψίας επί της περιοχής μελέτης (Mayle *et al.* 1999). Η αύξηση της έντασης αναμένεται να οδηγεί σε ελάττωση της διακύμανσης των εκτιμήσεων (Cochran 1977, Seber 2002). Όσο μεγαλύτερο τμήμα της περιοχής μελέτης διερευνάται τόσο αντιπροσωπευτικότερη γίνεται η περιγραφή της κατανομής των κοπρανοσωρών και ακριβέστερη η εκτίμηση της πυκνότητάς τους. Επειδή η ακρίβεια σχετίζεται με την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των δειγματοληπτικών επιφανειών, γενικά για να διπλασιαστούν τα επίπεδα ακρίβειας θα πρέπει να τετραπλασιαστεί το πλήθος των δειγματοληπτικών επιφανειών (Mayle *et al.* 1999). Οι εκτιμήσεις με την FAR μέθοδο στη μελέτη μας στηρίχθηκαν στη δειγματοληψία 44 επιφανειών με έκταση 60 m², δηλαδή το ποσοστό κάλυψης της περιοχής μελέτης ήταν μόλις 0,083%. Για να επιτύχουμε επίπεδα ακρίβειας CV=10% θα χρειαζόμασταν τουλάχιστον 176 δειγματοληπτικές επιφάνειες, οι οποίες αντιστοιχούν σε ποσοστό κάλυψης 0,33%.

Όπως αναλυτικότερα συζητείται στη συνέχεια, με εξαίρεση τη στρωματοποίηση της δειγματοληψίας, η δυνατότητα εφαρμογής των άλλων προτάσεων για τη βελτίωση της ακρίβειας που προαναφέρθηκαν, θα μπορούσε να προσκρούσει σε συγκεκριμένα μειονεκτήματα όπως το υπερβολικό κόστος σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό αλλά και το ενδεχόμενο αύξησης της μεροληψίας των εκτιμήσεων.

FSC

Η μέθοδος FSC μπορεί να εφαρμοστεί είτε με δειγματοληψία επιφανειών είτε με δειγματοληψία αποστάσεων. Η δειγματοληψία αποστάσεων θεωρείται ότι πλεονεκτεί έναντι

της δειγματοληψίας επιφανειών ως προς την ακρίβεια των εκτιμήσεων, κυρίως γιατί για δεδομένη προσπάθεια επιτρέπει την κάλυψη πολύ μεγαλύτερης έκτασης (Burnham *et al.* 1985, Marques *et al.* 2001). Στην έρευνά μας, επιλέγοντας τη δειγματοληψία αποστάσεων καταφέραμε να καλύψουμε ένα ικανοποιητικό ποσοστό της περιοχής μελέτης τόσο συνολικά (1,4%) όσο και σε κάθε ενδιαίτημα ξεχωριστά (βλ Πίνακα 3.4.1). Η ένταση της δειγματοληψίας αποδείχθηκε επαρκής για τον εντοπισμό μεγάλου αριθμού κοπρανοσωρών σε κάθε ενδιαίτημα (122-251). Ο αριθμός αυτός είναι αρκετά μεγαλύτερος από τον ελάχιστο απαιτούμενο σύμφωνα με τους Buckland *et al.* (2001, $n=60-80$) και φαίνεται ικανός για τον προσδιορισμό της συνάρτησης ανίχνευσιμότητας με υψηλή ακρίβεια (βλ. %CV στον Πίνακα 3.4.3).

Η σχέση με την οποία υπολογίζεται η ακρίβεια της εκτιμώμενης πυκνότητας των ζαρκαδιών D_R με τη μέθοδο FSC και δειγματοληψία αποστάσεων είναι σύμφωνα με τους Buckland *et al.* (2001): $[CV(\hat{D}_R)]^2 = [CV(\hat{D}_G)]^2 + [CV(\hat{t})]^2 + [CV(\hat{d})]^2$, όπου D_G η πυκνότητα των κοπρανοσωρών, t ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης και d ο ρυθμός αφόδευσης. Με δεδομένη τη χρήση της δημοσιευμένης τιμής του ρυθμού αφόδευσης ο όρος $CV(\hat{d})$ μηδενίζεται, οπότε η ακρίβεια της D_R εξαρτάται μόνο από την ακρίβεια υπολογισμού της πυκνότητας των κοπρανοσωρών και του μέσου χρόνου αποικοδόμησης. Η διακύμανση της εκτιμώμενης πυκνότητας των κοπρανοσωρών και επομένως και των ζαρκαδιών εξαρτάται εν μέρει από τη διακύμανση της πιθανότητας ανίχνευσης (βλ. Εξίσωση 3.4.7). Το γεγονός ότι προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πιθανοτήτων ανίχνευσης των κοπρανοσωρών ανάμεσα στις ανοιχτές εκτάσεις και τη μακία βλάστηση επιβεβαιώνει την ύπαρξη σημαντικής διακύμανσης της πιθανότητας ανίχνευσης σε σχέση με το ενδιαίτημα, η οποία θα ελάττωνε την ακρίβεια των εκτιμήσεων στην περίπτωση που αγνοούσαμε την επίδραση του ενδιαιτήματος και υπολογίζαμε την πυκνότητα από μη στρωματοποιημένα δεδομένα. Μπορούμε επομένως να ισχυριστούμε ότι η επιλογή στρωματοποίησης στη δειγματοληψία επηρέασε θετικά την ακρίβεια των εκτιμήσεων.

Οι διαφορετικές μέσες πυκνότητες που υπολογίστηκαν αποτελούν ένδειξη της διαφορετικής έντασης χρήσης των τριών ενδιαιτημάτων από τα ζαρκάδι. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι οι ανοιχτές εκτάσεις επιλέγονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το δάσος κωνοφόρων και ακόμη περισσότερο σε σχέση με τη μακία βλάστηση. Το εύρημα αυτό, παρά το γεγονός ότι δεν έχει ισχυρή στατιστική υποστήριξη, συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελετών του είδους, που υπογραμμίζουν την εντατική χρήση των ενδοδασικών διακένων (Papageorgiou 1978, Welch *et al.* 1990, Kuijper *et al.* 2009) και τη μειωμένη χρήση των σκληρόφυλλων θαμνώνων (Tellería & Virgós 1997).

Προσπάθεια

Με δεδομένους τους περιορισμούς που συνήθως υπάρχουν σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό στα προγράμματα συστηματικής παρακολούθησης των πληθυσμών, η επιλογή μιας μεθόδου που εξασφαλίζει ακριβείς εκτιμήσεις της αφθονίας με την ελάχιστη δυνατή προσπάθεια, αποκτά ιδιαίτερη διαχειριστική σημασία. Αντίθετα μέθοδοι οι οποίες αποδεικνύονται ιδιαίτερα χρονοβόρες και απαιτητικές σε εργασία δύσκολα μπορούν να επιλεγούν και έχουν χαμηλή διαχειριστική αξία (Hochachka *et al.* 2000, Walsh *et al.* 2001, Gaidet-Drapier *et al.* 2006). Η προσπάθεια στην παρούσα μελέτη ποσοτικοποιήθηκε με την παράμετρο ανθρωποημέρα εργασίας, που αντιστοιχεί στο γινόμενο του αριθμού των ερευνητών και του χρόνου που χρειάστηκαν για να διεξάγουν τις δειγματοληψίες (βλ. Κεφάλαιο 3.3.3).

FAR

Στην FAR έρευνα πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές επισκέψεις. Συνολικά για την εργασία στο πεδίο απαιτήθηκαν 30 ανθρωποημέρες, από τις οποίες οι περισσότερες (18) αναλώθηκαν στην πρώτη επίσκεψη (βλ. Πίνακα 3.3.2). Ο χρόνος που δαπανήθηκε για τη μετακίνηση μεταξύ των δειγματοληπτικών επιφανειών ήταν περίπου ίδιος και στις δύο επισκέψεις και επομένως η διαφορά στην προσπάθεια οφείλεται κυρίως στην εργασία για τον καθορισμό και τη διερεύνηση των ίδιων των επιφανειών. Η διαπίστωση ότι η προσπάθεια που απαιτείται στην πρώτη επίσκεψη είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τη δεύτερη βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών (Campbell *et al.* 2004) που χρησιμοποίησαν και αξιολόγησαν τη μέθοδο FAR.

Η πρώτη επίσκεψη περιελάμβανε την οριοθέτηση των δειγματοληπτικών επιφανειών και τον καθαρισμό τους από προϋπάρχοντες κοπρανosoωρούς. Επειδή η ορθή οριοθέτηση κάθε δειγματοληπτικής επιφάνειας αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την αποφυγή συστηματικών σφαλμάτων καταμέτρησης, ήταν τεχνικά απαραίτητο να τοποθετηθούν στο έδαφος πάσσαλοι και σχοινιά ώστε να σχηματιστεί ένα σαφές πλαίσιο (βλ. Κεφάλαιο 3.3.2). Η ανάπτυξη ενός τέτοιου πλαισίου σε περιοχές με πυκνή βλάστηση (π.χ. μακία) και έντονες κλίσεις του εδάφους αποδείχθηκε στην πράξη μια ιδιαίτερα δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία. Επιπρόσθετα, ο καθαρισμός απαιτήσε αρκετό χρόνο καθώς πολυάριθμοι κοπρανosoωροί (σε κάποιες περιπτώσεις περισσότεροι από 30), τόσο του ζαρκαδιού όσο και των άλλων οπληφόρων που ζουν στην περιοχή μελέτης, έπρεπε να συλλεχθούν και να απομακρυνθούν από την επιφάνεια εντός του πλαισίου. Η διαδικασία αυτή ήταν ιδιαίτερα κοπώδης σε όλα τα ενδιαιτήματα αλλά για διαφορετικούς λόγους. Στη μακία βλάστηση ο παράγοντας που δυσχέρανε τον καθαρισμό ήταν η δυσκολία κίνησης των ερευνητών λόγω

της πυκνής συγκόμωσης των θάμνων, στο δάσος ελάτης η δυσκολία συλλογής των κοπρανοσφρών λόγω εγκλωβισμού τους σε εκτεταμένες αναπτύξεις βρύων ενώ στις ανοικτές εκτάσεις η δυσκολία εντοπισμού και συλλογής των κοπρανοσφρών μέσα στην ποώδη βλάστηση. Στη δεύτερη επίσκεψη η οριοθέτηση των δειγματοληπτικών επιφανειών έγινε άμεσα καθώς προϋπήρχαν οι πάσσαλοι από την πρώτη επίσκεψη ενώ και η καταμέτρηση σε καμία περίπτωση δεν είχε τον ίδιο βαθμό δυσκολίας με τον καθαρισμό, αφού δεν απαιτούσε τη συλλογή των κοπρανοσφρών.

FSC

Η FSC έρευνα περιελάμβανε μία επίσκεψη κατά την οποία οριοθετήθηκαν και διατρέχθηκαν οι ευθείες διαδρομές και καταμετρήθηκαν οι κοπρανοσφροί και οι κάθετες αποστάσεις τους. Συνολικά για την εργασία στο πεδίο απαιτήθηκαν 34 ανθρωποημέρες για τη δειγματοληψία σε γραμμές συνολικού μήκους 8836,5 m αλλά και για τη μετακίνηση μεταξύ των γραμμών. Ως προς τα ενδιαιτήματα η δειγματοληψία αποδείχθηκε πιο χρονοβόρα στη μακία βλάστηση, κυρίως λόγω των δυσκολιών ανάπτυξης του σχοινού και καταμέτρησης των κάθετων αποστάσεων μέσα στους πυκνούς θάμνους.

Το πείραμα προσδιορισμού του μέσου χρόνου αποκοδόμησης αποτέλεσε μια πρόσθετη εργασία η οποία απαιτήσε σύντομες μεν αλλά πολλές επισκέψεις στην περιοχή μελέτης στο χρονικό διάστημα που προηγήθηκε της FSC έρευνας. Ο χρόνος που χρειάζεται σε κάθε επίσκεψη για την ανεύρεση φρέσκων κοπρανοσφρών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πυκνότητα των ζαρκαδιών και είναι προφανές ότι σε περιοχές με μικρές πυκνότητες η προσπάθεια που απαιτείται θα είναι σημαντικά μεγαλύτερη. Στο πείραμα μας και για τη δεδομένη πυκνότητα ζαρκαδιών μία ανθρωποημέρα εργασίας ήταν αρκετή για τον εντοπισμό έως και δεκαπέντε φρέσκων κοπρανοσφρών.

Σύγκριση προσπάθειας δειγματοληψίας

Μέχρι σήμερα, και τουλάχιστον με βάση όσα γνωρίζουμε από τη διερεύνηση της σχετικής βιβλιογραφίας, δεν υπήρξε μελέτη η οποία να συγκρίνει τις δύο μεθοδολογικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήσαμε σε σχέση με την παράμετρο της προσπάθειας. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (Smart *et al.* 2004, Campbell *et al.* 2004) αφορούσαν σύγκριση των κλασικών μεθόδων FAR και FSC, οι οποίες εφαρμόστηκαν με δειγματοληψίες επιφανειών. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο χρόνος που απαιτείται για την δειγματοληψία στην FAR είναι περίπου 1,6-3 φορές περισσότερος σε σχέση με την FSC. Η βασική αιτία αυτής της διαφοράς είναι ότι στην FAR χρειάζονται δύο επισκέψεις στις δειγματοληπτικές επιφάνειες, μία για τον καθαρισμό και μία για την καταμέτρηση. Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήσαμε την πιο σύγχρονη παραλλαγή της FSC, στην οποία

ενσωματώνεται η τεχνική της δειγματοληψίας αποστάσεων. Στις δειγματοληψίες αποστάσεων ο ερευνητής απαλλάσσεται από την υποχρέωση εντοπισμού και καταμέτρησης όλων των κοπρανοσωρών σε μια επιφάνεια αφού η υπόθεση πλήρους καταμέτρησης περιορίζεται πάνω στη γραμμή. Αυτή η σημαντική μεθοδολογική διαφοροποίηση καθιστά τη διαδικασία σαφώς πιο εύκολη και γρήγορη.

Οι έρευνες της μελέτης μας διέφεραν στην ένταση της δειγματοληψίας, γεγονός που δεν επιτρέπει τη χρήση των απόλυτων τιμών των ανθρωποημερών εργασίας για μια συγκριτική αξιολόγηση της απαιτούμενης προσπάθειας και επομένως της δυσκολίας εφαρμογής των μεθόδων. Για να γίνει σύγκριση προσδιορίσαμε τον δείκτη δειγματοληπτικής προσπάθειας (sampling effort index- Gaidet-Drapier *et al.* 2006). Ο δείκτης αυτός συνδέει την προσπάθεια με το εμβαδόν της δειγματοληψίας και στη περίπτωση μας υπολογίστηκε ως ο αριθμός ανθρωποημερών που χρειάζονται για την δειγματοληψία 1000 m² (1 στρέμματος) της περιοχής μελέτης. Η τιμή του δείκτη στην FAR ήταν περίπου 10 φορές υψηλότερη από ότι στην FSC (βλ. Πίνακα 3.6.1), γεγονός που αποδεικνύει ότι η διενέργεια δειγματοληψιών με την πρώτη μέθοδο είναι σημαντικά πιο απαιτητική σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό σε σχέση με τη δεύτερη.

Ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης

Η ορθότητα και η ακρίβεια υπολογισμού του μέσου χρόνου αποικοδόμησης επηρεάζει σημαντικά την ευστοχία και την ακρίβεια των εκτιμήσεων αφθονίας στη μέθοδο FSC (Mayle *et al.* 1999), όπως φαίνεται εξάλλου και από τις Εξιιώσεις 3.4.10 και 3.4.11. Μια περίπτωση συστηματικού σφάλματος σε μια στρωματοποιημένη δειγματοληψία θα μπορούσε να προκύψει από τη χρήση κοινού χρόνου αποικοδόμησης ενώ στην πραγματικότητα ο χρόνος αυτός διαφέρει μεταξύ των ενδιαιτημάτων (Hemami & Dolman 2005). Για το λόγο αυτό κάθε πείραμα υπολογισμού του μέσου χρόνου αποικοδόμησης θα πρέπει να ενσωματώνει στο σχεδιασμό και την ανάλυσή του τον έλεγχο της επίδρασης του ενδιαιτήματος.

Το γεγονός ότι η αποικοδόμηση των κοπρανοσωρών συντελείται με διαφορετικούς μηχανισμούς και εξαρτάται από παράγοντες, οι οποίοι ποικίλουν μεταξύ των τριών ενδιαιτημάτων της περιοχής μελέτης μας, καθιστά εξαιρετικά πιθανό το ενδεχόμενο ύπαρξης διαφορετικών μέσων χρόνων αποικοδόμησης:

α) Στη μακία βλάστηση ένας σημαντικός μηχανισμός εξαφάνισης των κοπρανοσωρών είναι η κάλυψή τους από πεσμένα φύλλα. Αντίθετα, η επίδραση του μηχανισμού αυτού φαίνεται να είναι ελάχιστη στο δάσος κωνοφόρων, όπου το μέγεθος των πεσμένων βελονοειδών φύλλων είναι σαφώς μικρότερο, και μηδενική στις ανοιχτές εκτάσεις.

β) Στο δάσος κωνοφόρων συντελείται μια μοναδική σε σχέση με τα υπόλοιπα ενδιαιτήματα διαδικασία αποικοδόμησης. Σε θέσεις με έντονη υγρασία, παρατηρήθηκαν στο έδαφος εκτεταμένες αναπτύξεις βρύων, οι οποίες μπορούν να καλύπτουν σαν χαλί ολόκληρους κοπρανοσωρούς.

γ) Στις ανοιχτές εκτάσεις και ειδικά σε θέσεις με ήπιες κλίσεις η ανάπτυξη πυκνής ποώδους βλάστησης (γρασιδιού) συντελεί στην κάλυψη αρκετών κοπράνων. Στα δύο άλλα ενδιαιτήματα η ανάπτυξη της ποώδους βλάστησης είναι σαφώς περιορισμένη.

δ) Η διαδικασία οργανικής αποικοδόμησης (αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς) εξαρτάται από αβιοτικούς παράγοντες όπως η υγρασία, η ένταση του φωτός, η σύσταση του εδάφους κτλ.. Οι παράγοντες αυτοί ποικίλουν μεταξύ των τριών ενδιαιτημάτων.

ε) Στα μεσογειακά οικοσυστήματα ο ρόλος των κοπροφάγων σκαθαριών και άλλων σαπροφάγων ασπόνδυλων (Legakis 1994) είναι σημαντικός για την αποικοδόμηση των κοπρανοσωρών, όπως αναφέρουν οι Massei *et al.* (1998) για το πλατόνι. Η σύσταση, η αφθονία και η εποχιακή δραστηριότητα των ειδών των κοπροφάγων σκαθαριών ποικίλει μεταξύ των ενδιαιτημάτων (Barbero *et al.* 1999, Romero-Alcaraz & Ávila 2000), γεγονός που υποδηλώνει και διαφορετική ένταση της αποικοδόμησης λόγω της δράσης τους.

στ) Η μηχανική επίδραση της βροχής είναι ένας ακόμη παράγοντας αποικοδόμησης που έχει διαφορετική επίδραση στους κοπρανοσωρούς των τριών ενδιαιτημάτων. Στο δάσος κωνοφόρων, όπου η ύπαρξη πυκνού και αειθαλούς φυλλώματος δρα προστατευτικά, η επίδραση της βροχής είναι αρκετά περιορισμένη σε σχέση με τις ανοιχτές εκτάσεις (Hemami & Dolman 2005).

Στο πείραμα που πραγματοποιήσαμε, το οποίο ξεκίνησε οκτώ μήνες πριν την κυρίως έρευνα FSC, σημάναμε κατά διαστήματα (περίπου ανά μήνα) φρέσκους κοπρανοσωρούς και στα τρία ενδιαιτήματα και ελέγξαμε αν είχαν επιβιώσει μέχρι τη στιγμή της κυρίως FSC έρευνας. Ακολουθώντας την προτεινόμενη μεθοδολογία από τους Laing *et al.* (2003), χρησιμοποιήσαμε τη λογιστική παλινδρόμηση ως τη συνάρτηση που περιγράφει την πιθανότητα επιβίωσης για να υπολογίσουμε το μέσο χρόνο αποικοδόμησης. Προτείναμε και ελέγξαμε τέσσερα υποψήφια μοντέλα παραμετροποίησης της λογιστικής παλινδρόμησης προκειμένου να επιλέξουμε αυτό που υποστηρίζεται από τις παρατηρήσεις του πειράματός μας και επομένως περιγράφει καλύτερα την μεταβολή της πιθανότητας επιβίωσης (βλ. Κεφάλαιο 3.5.3).

Όπως αναμενόταν, το μηδενικό μοντέλο (f_0) το οποίο προβλέπει σταθερή πιθανότητα επιβίωσης απορρίφθηκε αφού δεν είχε στατιστική υποστήριξη ($w_m=0$). Αντίθετα τα υπόλοιπα μοντέλα που θεωρούν ότι η πιθανότητας επιβίωσης μειώνεται σε συνάρτηση με την ηλικία των κοπρανοσωρών είχαν σημαντική υποστήριξη. Το f_1 , το οποίο προβλέπει κοινές πιθανότητες επιβίωσης σε όλα τα ενδιαιτήματα, είχε μεν τη μικρότερη υποστήριξη από τα τρία μοντέλα αλλά παρουσίασε υψηλή αληθοφάνεια ($w_m=24,3\%$), γεγονός που δεν μας

επέτρεψε να το απορρίψουμε. Τα μοντέλα f_2 και f_3 , σύμφωνα με τα οποία οι πιθανότητες επιβίωσης διαφέρουν μεταξύ των ενδιατημάτων, παρουσίασαν τα μεγαλύτερα ποσοστά αληθοφάνειας (42% και 33,7%). Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη ότι η αποικοδόμηση συντελείται με διαφορετικό ρυθμό στα ενδιατήματα. Παρόλα αυτά κανένα μοντέλο δεν αναδείχθηκε «καθαρός νικητής» ως προς το ποσοστό αληθοφάνειας ($w_m > 90\%$).

Όταν τα δεδομένα υποστηρίζουν περισσότερα από ένα μοντέλα υπάρχει μια σημαντική παράμετρος αβεβαιότητας στην επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου που δεν μπορεί να αγνοηθεί. Για το λόγο αυτό προκειμένου να εκτιμήσουμε το μέσο χρόνο αποικοδόμησης και τα όρια εμπιστοσύνης του σε κάθε ενδιαίτημα ακολουθήσαμε την προσέγγιση πολυμοντελικής συμπερασματολογίας, δηλαδή υπολογίσαμε τον σταθμισμένο μέσο όρο των μέσων χρόνων που προκύπτουν υπό τη συνθήκη των τριών μοντέλων. Η προσέγγιση αυτή -αν και μειώνει την ακρίβεια των εκτιμήσεων γιατί ενσωματώνει μια συνιστώσα διακύμανσης που οφείλεται στην αβεβαιότητα επιλογής μοντέλου- θεωρείται πιο αξιόπιστη από την υιοθέτηση απλά του καλύτερου μοντέλου (Burnham & Anderson 2002, Katsanevakis 2006). Οι εκτιμώμενοι μέσοι χρόνοι αποικοδόμησης που προέκυψαν είναι 155 ημέρες (95%CI: 131-186) στο δάσος κωνοφόρων, 144 ημέρες (95%CI: 111-189) στη μακία βλάστηση και 126 ημέρες (95%CI: 88-177) στις ανοιχτές εκτάσεις. Οι τιμές διαφέρουν αλλά οι διαφορές μεταξύ τους δεν είναι στατιστικά σημαντικές (έλεγχος t-test) με αποτέλεσμα να μην επιβεβαιώνεται στατιστικά η υπόθεση διαφορετικών χρόνων αποικοδόμησης μεταξύ των ενδιατημάτων.

Το μεγάλο εύρος των ορίων εμπιστοσύνης και η αποτυχία στατιστικής υποστήριξης θεωρούμε ότι οφείλονται στο περιορισμένο αριθμό πρωτογενών δεδομένων, δηλαδή στην έλλειψη επαρκούς αριθμού σημασμένων κοπρανσοσφρών. Στο δικό μας πείραμα σημαίναμε συνολικά 107 κοπρανσοσφρούς (περίπου 35 ανά ενδιαίτημα). Οι Buckland *et al.* (2001) θεώρησαν ότι συνολικά 50 κοπρανσοσφροί είναι αρκετοί για τέτοιου είδους πειράματα αλλά η έρευνά μας δείχνει ότι ο αριθμός αυτός είναι μάλλον πολύ μικρός και δύσκολα μπορεί να ανιχνεύσει στατιστικά σημαντικές διαφορές του χρόνου αποικοδόμησης μεταξύ των ενδιατημάτων. Προτείνουμε τη σήμανση τουλάχιστον 50 κοπρανσοσφρών και αν είναι εφικτό 100 κοπρανσοσφρών ανά ενδιαίτημα, προκειμένου οι εκτιμήσεις του χρόνου αποικοδόμησης να έχουν υψηλότερα επίπεδα ακρίβειας, ικανά να αποκαλύψουν ενδεχόμενες διαφορές μεταξύ των ενδιατημάτων. Η εκτίμηση χρόνων αποικοδόμησης με αυξημένη ακρίβεια θα μπορούσε να ελαττώσει τη διακύμανση της εκτιμώμενης πυκνότητας των ζαρκαδιών και επομένως να επιτρέψει την ακριβέστερη εκτίμηση της αφθονίας τους με τη μέθοδο FSC.

Η θεωρία της πληροφορίας ως μέθοδος ανάλυσης περιλαμβάνει την εκ των προτέρων διατύπωση των υποψήφιων μοντέλων με βάση θεωρητικά και εμπειρικά κριτήρια. Τα υποψήφια μοντέλα στην παρούσα μελέτη περιελάμβαναν ως μεταβλητές, την ηλικία των κοπρανσοσφρών και τον τύπο του ενδιαιτήματος. Ενδεχομένως η ενσωμάτωση και άλλων

παραμέτρων που εμφανίζουν σημαντική διακύμανση στην περιοχή μελέτης όπως η κλίση του εδάφους, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μοντέλα τα οποία περιγράφουν αποτελεσματικότερα τη μεταβολή της πιθανότητας επιβίωσης. Μια τέτοια προσέγγιση, ωστόσο, θα απαιτούσε την σήμανση πολλαπλάσιου αριθμού κοπρανοσωρών σε διάφορα επίπεδα κλίσης και επομένως πολλαπλάσια προσπάθεια για την εκτέλεση του πειράματος.

Οι μέσοι χρόνοι αποικοδόμησης που υπολογίσαμε (126-155 ημέρες) κυμάνθηκαν σε ανάλογα επίπεδα με αυτά που έχουν αναφερθεί για το ζαρκάδι σε εύκρατα κλίματα (νότια Αγγλία) από τους Mitchell *et al.* (1985) και Mayle *et al.* (1999). Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν χρόνους αποικοδόμησης μεγαλύτερους από έναν χρόνο (έως και 638 ημέρες) σε ψυχρά και υγρά κλίματα (π.χ. βόρεια Σκωτία). Οι καμπύλες της πιθανότητας επιβίωσης (Γράφημα 3.5.1) δείχνουν ότι ελάχιστοι κοπρανοσωροί αναμένεται να επιβιώνουν για πάνω από 250 ημέρες στα ενδιαίτηματα της περιοχής μελέτης και επομένως στα μεσογειακά οικοσυστήματα είναι μάλλον απίθανη η ύπαρξη τόσο μεγάλων χρόνων αποικοδόμησης.

Το διάστημα συσσώρευσης

Στη μέθοδο FAR ο χρόνος αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών δεν χρειάζεται ως εκτιμητής για τον υπολογισμό της αφθονίας στην περίπτωση που η αποικοδόμηση είναι μηδενική κατά το επιλεγόμενο διάστημα συσσώρευσης. Ωστόσο, μια πιθανή απόκλιση από την υπόθεση μηδενικής απώλειας κατά το διάστημα συσσώρευσης μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία των εκτιμήσεων αφθονίας. Αν δηλαδή οι κοπρανοσωροί αποικοδομούνται στην πραγματικότητα σε μικρότερο χρονικό διάστημα από το διάστημα συσσώρευσης, είναι προφανές ότι η αφθονία θα υποεκτιμηθεί. Ο Neff (1968) δίνει ένα παράδειγμα μελέτης στην οποία η χρήση διαστήματος συσσώρευσης μεγαλύτερου από το χρόνο αποικοδόμησης οδήγησε σε σημαντική υποεκτίμηση κατά 75% της αφθονίας ενός πληθυσμού ελαφιών.

Καμία έρευνα για τη μελέτη της εποχιακής διακύμανσης του ρυθμού αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών του ζαρκαδιού δεν έχει πραγματοποιηθεί σε μεσογειακά οικοσυστήματα και αναπόφευκτα η επιλογή της εποχής διενέργειας της FAR δειγματοληψίας και του διαστήματος συσσώρευσης (Απρίλιος-Μάιος, περίπου 60 ημέρες) στηρίχθηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα από έρευνες σε πολύ διαφορετικά οικοσυστήματα (Mitchell *et al.* 1985, Mayle *et al.* 1999) και σε εμπειρικές υποθέσεις. Τα αποτελέσματα του πειράματος ελέγχου που πραγματοποιήσαμε φάνηκε ότι επιβεβαίωσαν την επιλογή, αφού κανένας από τους κοπρανοσωρούς που είχαν σημειωθεί στα τρία ενδιαίτηματα στην πρώτη επίσκεψη (αρχές Απριλίου 2006) δεν βρέθηκε να έχει αποικοδομηθεί στη δεύτερη επίσκεψη (αρχές Ιουνίου 2006).

Θα αρκούσε, ωστόσο, το στοιχείο αυτό για να προτείνουμε την υιοθέτηση του συγκεκριμένου διαστήματος σε εφαρμογές της μεθόδου σε μεσογειακά οικοσυστήματα; Αν λάβουμε υπόψη τα αποτελέσματα από το πείραμα υπολογισμού του μέσου χρόνου αποικοδόμησης, που πραγματοποιήθηκε την επόμενη χρονιά, η απάντηση είναι αρνητική. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 3.5.3, διαπιστώνουμε ότι υπήρξαν κοπρανosoφοί που σημάνθηκαν στις ανοιχτές εκτάσεις και τη μακία βλάστηση στις αρχές Απριλίου 2007 και οι οποίοι αποικοδομήθηκαν σε λιγότερο από 40 ημέρες. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης παρουσιάζεται διαφοροποιημένος από χρονιά σε χρονιά και ότι το διάστημα των 60 ημερών μπορεί να είναι αρκετά ευρύ ώστε να εξασφαλίζει την αξιόπιστη καταμέτρηση των κοπρανosoφών του ζαρκαδιού σε όλα τα ενδιαιτήματα, τουλάχιστον όταν οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνται την άνοιξη.

Στην έρευνα των Aulak & Babińska-Werka (1990) στην Πολωνία παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου οι κοπρανosoφοί του ζαρκαδιού είχαν αποικοδομηθεί ταχύτατα (σε μία μόλις εβδομάδα) εξαιτίας της δραστηριότητας των κοπροφάγων σκαθαριών. Οι Massei *et al.* (1998), οι οποίοι μελέτησαν την αποικοδόμηση των κοπρανosoφών του πλατωνιού (*Dama dama*) σε ένα μεσογειακό οικοσύστημα κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι η καλύτερη εποχή πραγματοποίησης των ερευνών με τη μέθοδο FAR είναι ο χειμώνας ενώ ως πιο ασφαλές διάστημα συσσώρευσης θα πρέπει να θεωρείται ο ένας μήνας (30 ημέρες). Η πραγματοποίηση πειραμάτων παρακολούθησης της εποχιακής διακύμανσης της αποικοδόμησης των κοπρανosoφών του ζαρκαδιού σε μια ποικιλία ενδιαιτημάτων των μεσογειακών οικοσυστημάτων κρίνεται απαραίτητη για τον προσδιορισμό του καταλληλότερου διαστήματος συσσώρευσης.

Πρακτικές δυσκολίες εφαρμογής

α) Ο ορισμός των δειγματοληπτικών μονάδων.

Η σαφής οριοθέτηση των δειγματοληπτικών μονάδων (επιφάνειες στην FAR - ευθείες γραμμές στην FSC) είναι καθοριστική για την αποφυγή σφαλμάτων καταμέτρησης και επομένως την αμεροληψία των εκτιμήσεων (Buckland *et al.* 2001, Marques *et al.* 2001). Στην FAR είναι απαραίτητο η επιφάνεια που θα καθαριστεί κατά την πρώτη επίσκεψη να είναι ακριβώς η ίδια στην οποία θα καταμετρηθούν οι συσσωρευμένοι κοπρανosoφοί στη δεύτερη επίσκεψη. Για να εξασφαλιστεί η ταύτιση των επιφανειών θα πρέπει ο χώρος της δειγματοληψίας να οριοθετείται με ακρίβεια και στις δύο επισκέψεις και ο μόνος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι να διαμορφωθεί στο έδαφος ένα πλαίσιο από σχοινιά και πασσάλους (ορθογώνιο με διαστάσεις 4 x 15 m στην δική μας έρευνα). Ειδικά στην μακία βλάστηση και

σε επιφάνειες με μεγάλη κλίση, η ανάπτυξη των σχοινιών αποδείχθηκε αρκετά δύσκολη εργασία. Θεωρούμε ότι σε περιοχές με πολύ πυκνή θαμνώδη βλάστηση η μέθοδος καθίσταται πρακτικά ανεφάρμοστη ακριβώς εξαιτίας της αδυναμίας διαμόρφωσης του πλαισίου στο πεδίο. Αντίθετα η FSC με δειγματοληψία αποστάσεων φαίνεται να πλεονεκτεί ως προς την πρακτικότητα εφαρμογής, αφού η ανάπτυξη του σχοινιού που ορίζει τη δειγματοληπτική μονάδα γίνεται άπαξ και σε μία διάσταση, διαδικασία η οποία είναι σαφώς ευκολότερη ακόμη και σε κλειστά ενδιαιτήματα (π.χ. μακία). Η ευκολία οριοθέτησης των δειγματοληπτικών μονάδων μπορεί να εξηγήσει και τη σημαντικά μικρότερη προσπάθεια που απαιτείται για τη διενέργεια της FSC δειγματοληψία.

β) Ο εντοπισμός των κοπρανοσωρών

Στη μέθοδο FAR η βασική υπόθεση για να έχουμε αξιόπιστες εκτιμήσεις είναι ότι καταμετρούνται όλοι οι κοπρανοσωροί εντός των δειγματοληπτικών επιφανειών ενώ στην FSC με δειγματοληψία αποστάσεων η υπόθεση απόλυτου εντοπισμού περιορίζεται επάνω στη γραμμή. Από μόνη της η διαφορά αυτή στην κλίμακα διερεύνησης (επιφάνεια vs γραμμή) καθιστά πιο πιθανή μια αστοχία καταμέτρησης των κοπρανοσωρών και επομένως μια υποεκτίμηση της αφθονίας τους στη μέθοδο FAR. Όσο μεγαλύτερη μάλιστα είναι η έκταση της δειγματοληπτικής επιφάνειας τόσο πιθανότερο το ενδεχόμενο ελλιπών εντοπισμών.

Στις ανοιχτές εκτάσεις δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερα προβλήματα αλλά στις δειγματοληπτικές επιφάνειες με πυκνή μακία βλάστηση ο εντοπισμός των κοπρανοσωρών αποδείχθηκε μια σαφώς δυσχερέστερη και απαιτητική διαδικασία. Η δυσκολία μετακίνησης των ερευνητών και οι συνθήκες μειωμένης ορατότητας ενδεχομένως να αυξάνουν την πιθανότητα ελλιπών καταμετρήσεων με τη μέθοδο FAR μέσα στο συγκεκριμένο τύπο βλάστησης. Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας δείχνουν ότι σε κλειστά ενδιαιτήματα όπως η μακία βλάστηση η ικανότητα οπτικού εντοπισμού των κοπρανοσωρών μπορεί να είναι σημαντικά μειωμένη ακόμη και σε μικρή απόσταση (< 50 cm) από τον παρατηρητή (βλ. Κεφάλαιο 3.4.4 και Γράφημα 3.4.5). Με βάση αυτό το δεδομένο θεωρούμε ότι οι δειγματοληπτικές επιφάνειες που χρησιμοποιούνται στην FAR σε τέτοια ενδιαιτήματα θα πρέπει να έχουν περιορισμένο πλάτος (μικρότερο από τα τέσσερα μέτρα που επιλέξαμε) ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ελλιπών εντοπισμών. Είναι προφανές ότι ο εντοπισμός των κοπρανοσωρών που βρίσκονται σε μηδενική απόσταση από τον ερευνητή (πάνω στη γραμμή) επηρεάζεται ελάχιστα από τον τύπο της βλάστησης, γεγονός που δίνει στη μέθοδο FSC ένα επιπλέον πρακτικό πλεονέκτημα ως προς την δυνατότητα γενικής και αξιόπιστης χρήσης.

γ) Οι στατιστικές αναλύσεις

Ο όγκος και η ποιότητα των στατιστικών αναλύσεων στις δύο έρευνες διέφεραν σημαντικά και αξίζει να σχολιαστούν. Στη μέθοδο FAR οι αναλύσεις ήταν απλές, δεν απαιτήσαν τη χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων και πραγματοποιήθηκαν χωρίς ιδιαίτερο κόπο. Αντίθετα, στη μέθοδο FSC στην οποία μοντελοποιήθηκαν οι συναρτήσεις ανιχνευσιμότητας και επιβίωσης των κοπρανοσφρών, η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων θα μπορούσε να χαρακτηριστεί εξειδικευμένη. Το πλήθος των δεδομένων και η πολυπλοκότητα των αναλύσεων απαιτήσαν τη χρήση ειδικών προγραμμάτων (DISTANCE) και εντατικότερη εργασία.

Συνολική αποτίμηση - Χρήση των μεθόδων σε προγράμματα παρακολούθησης

Αρκετές μεθοδολογικές προσεγγίσεις εκτίμησης της πυκνότητας και της αφθονίας έχουν κατά καιρούς προταθεί και χρησιμοποιηθεί σε έρευνες πληθυσμών του ζαρκαδιού σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαχειριστικούς σκοπούς (για ανασκόπηση βλ. Cederlund *et al.* 1998, Mayle *et al.* 1999, Meriggi *et al.* 2008). Ανατρέχοντας στη σχετική βιβλιογραφία μπορεί εύκολα να διαπιστώσει κανείς ότι η καταλληλότητα εφαρμογής της κάθε μίας από αυτές εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της περιοχής μελέτης (είδη βιοτόπων, γεωμορφολογικό ανάγλυφο, κλιματικές συνθήκες).

Οι πληθυσμοί του ζαρκαδιού κατανέμονται στην χώρα μας κυρίως σε ορεινές και ημιορεινές δασικές περιοχές, στις οποίες το έντονο γεωμορφολογικό ανάγλυφο (μεγάλες κλίσεις, ρεματιές και απότομες πλαγιές) είναι μάλλον ο κανόνας και όχι η εξαίρεση. Η παρούσα μελέτη αποτέλεσε την πρώτη προσπάθεια εφαρμογής και αξιολόγησης των μεθόδων FAR και FSC με δειγματοληψία αποστάσεων σε ελληνικά ορεινά οικοσυστήματα αλλά και μία από τις ελάχιστες που χρησιμοποίησαν αντίστοιχη μεθοδολογία για την εκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας πληθυσμών του ζαρκαδιού σε μεσογειακά οικοσυστήματα (Fattorini *et al.* 2011, Acevedo *et al.* 2010). Η επιτυχημένη διεξαγωγή των δειγματοληψιών στο εκτροφείο Σουβάρδου έδειξε ότι οι συγκεκριμένες μέθοδοι καταμέτρησης κοπρανοσφρών είναι δυνατόν να εφαρμοστούν και σε αυτά τα οικοσυστήματα και με τον κατάλληλο δειγματοληπτικό σχεδιασμό να δώσουν εκτιμήσεις της πυκνότητας και της αφθονίας με ικανοποιητική ακρίβεια.

Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν στοιχεία για τη διαχρονική εξέλιξη του μεγέθους των πληθυσμών του ζαρκαδιού, γεγονός που συνιστά μια σημαντική διαχειριστική αδυναμία. Η

ανάγκη εκπόνησης στοχευμένων διαχειριστικών σχεδίων για τη διατήρηση του είδους προϋποθέτει τη συστηματική παρακολούθηση (monitoring) των ελληνικών πληθυσμών προκειμένου να περιγραφούν οι τάσεις μεταβολής της πυκνότητας και της αφθονίας τους στο χώρο και το χρόνο. Όπως προαναφέρθηκε σημαντικό κριτήριο επιλογής μιας μεθόδου για χρήση σε προγράμματα παρακολούθησης είναι το κόστος εφαρμογής της.

Η σπανιότητα του ζαρκαδιού και η φυσιογνωμία των ενδιαιτημάτων του στη Ελλάδα καθιστούν προβληματική την υιοθέτηση σε προγράμματα παρακολούθησης άμεσων μεθόδων εκτίμησης της πυκνότητας και της αφθονίας που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία αλλού, όπως η δειγματοληψία αποστάσεων σε ευθείες διαδρομές (line transect distance sampling, Gaillard *et al.* 1993, Focardi *et al.* 2002,2005) ή η καταμέτρηση από θέσεις πανοραμικής θέασης (vantage point counts, Mayle *et al.* 1999, Meriggi *et al.* 2008). Ο περιοριστικός παράγοντας για τη χρήση των συγκεκριμένων μεθόδων είναι η δυσκολία οπτικού εντοπισμού των ζαρκαδιών. Όταν η πυκνότητα των πληθυσμών είναι χαμηλή, τότε η πιθανότητα οπτικών εντοπισμών αναμένεται να είναι μικρή, με αποτέλεσμα να απαιτείται ιδιαίτερα αυξημένη προσπάθεια σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό για να συγκεντρωθεί ο ελάχιστος επαρκής αριθμός πρωτογενών δεδομένων (δειγμάτων) που χρειάζεται για ακριβείς εκτιμήσεις. Η ικανότητα οπτικού εντοπισμού των ζώων είναι σαφώς μειωμένη όταν η έρευνα πραγματοποιείται σε κλειστούς βιοτόπους (π.χ δασικές εκτάσεις) και σε εδάφη με έντονο ανάγλυφο, αφού το οπτικό πεδίο των παρατηρητών σε αυτές τις περιπτώσεις περιορίζεται σημαντικά. Αν στα παραπάνω προστεθεί η εγγενής κρυπτική συμπεριφορά του ζαρκαδιού, η μικρή δραστηριότητά του κατά τη διάρκεια της ημέρας και η τάση να απομακρύνεται γρήγορα όταν αντιλαμβάνεται την ανθρώπινη παρουσία (Andersen *et al.* 1998), γίνεται κατανοητό πόσο απαιτητική -αν όχι αδύνατη- γίνεται η διαδικασία εντοπισμού και καταμέτρησης των ίδιων των ζαρκαδιών στα ορεινά μεσογειακά οικοσυστήματα της χώρας μας. Προς ενίσχυση αυτής της διαπίστωσης αξίζει να μεταφέρουμε μια εντυπωσιακή εμπειρία. Κατά τη διάρκεια της FSC δειγματοληψίας, κινούμενοι με αργές ταχύτητες και χωρίς να προκαλούμε ιδιαίτερη όχληση (πεζοπορία) διανύσαμε περίπου εννέα χιλιόμετρα δειγματοληπτικών γραμμών και συνολικά -αν συμπεριληφθούν και οι διαδρομές μεταξύ των γραμμών- πολύ μεγαλύτερη απόσταση. Παρά την εντατική κίνηση εντός του εκτροφείου δεν καταφέραμε να εντοπίσουν ούτε ένα ζαρκάδι στη γύρω περιοχή.

Οι Σφουγγάρης & Γιαννακόπουλος (2005), στην ευρύτερης χωρικής κλίμακας έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί για το είδος στην Ελλάδα μέχρι σήμερα, εφάρμοσαν μια παραλλαγή της μεθόδου κλοιού (drive counts, Tellería & Sáez-Royuela 1984, Mayle *et al.* 1999, Cicognani *et al.* 2000), στην οποία χρησιμοποιήθηκαν κνηγετικοί σκόλοι και παρατηρητές για την άμεση καταμέτρηση των ζαρκαδιών σε δειγματοληπτικές επιφάνειες έκτασης 0,3-3,2 km². Η μέθοδος κλοιού έχει επηρεαστεί από κνηγετικές πρακτικές εκτίμησης της πυκνότητας και συγκεντρώνει σημαντικά μειονεκτήματα (βλ. Mayle *et al.* 1999). Παρά το γεγονός ότι

εξακολουθεί να εφαρμόζεται σε προγράμματα παρακολούθησης του είδους, αμφισβητείται έντονα από αρκετούς ερευνητές εξαιτίας της χαμηλής αξιοπιστίας και της αδύναμης στατιστικής της θεμελίωσης (Cederlund *et al.* 1988, Anderson 2001, Meriggi *et al.* 2008).

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των μεθόδων καταμέτρησης κοπρανοσφρών έναντι των άμεσων μεθόδων φαίνεται ότι είναι η δυνατότητα συγκέντρωσης πρωτογενών δεδομένων (δείγματος) μέσα σε λογικά πλαίσια προσπάθειας. Η πυκνότητα των κοπρανοσφρών στο πεδίο είναι υπερπολλαπλάσια της πυκνότητας των ζαρκαδιών που τα παράγουν, ενώ τα κόπρανα ως αδρανή στοιχεία δεν επηρεάζονται από την παρουσία και την κίνηση του ερευνητή. Αν και το ζαρκάδι δύσκολα μπορεί να θεαθεί, η αναζήτηση των κοπρανοσφρών του επιτρέπει τη συλλογή επαρκούς και αξιοποιήσιμης πληροφορίας για την εκτίμηση της κατανομής και της αφθονίας του. Στη δειγματοληψία FSC, και σε αντιδιαστολή με το μηδενικό εντοπισμό ζαρκαδιών, καταμετρήθηκαν συνολικά 570 κοπρανοσφροί πάνω και σε μικρή απόσταση από τις δειγματοληπτικές γραμμές. Με βάση την εμπειρία που αποκομίσαμε από την πρώτη εφαρμογή των μεθόδων καταμέτρησης κοπρανοσφρών και λαμβάνοντας υπόψη τη συγκριτική αξιολόγηση της απαιτούμενης προσπάθειας και των πρακτικών δυσκολιών εφαρμογής τους, θεωρούμε ότι η μέθοδος FSC με δειγματοληψία αποστάσεων είναι καταλληλότερη από την FAR για χρήση σε προγράμματα συστηματικής παρακολούθησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Κατακλείδα



Βασικός σκοπός της παρούσας διατριβής, όπως διατυπώθηκε στη Γενική Εισαγωγή, υπήρξε η συνεισφορά νέων, σημαντικών δεδομένων αλλά και μεθοδολογικών εργαλείων, τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο σχεδιασμό και την εφαρμογή μελλοντικών δράσεων διατήρησης και διαχείρισης του ζαρκαδιού στην Ελλάδα. Υπό αυτό το πρίσμα η μελέτη επικεντρώθηκε σε δύο κύριους άξονες: α) στην περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας του ελληνικού ζαρκαδιού και β) στην αξιολόγηση της δυνατότητας χρήσης έμμεσων μεθόδων εκτίμησης της αφθονίας και της πυκνότητας για την παρακολούθηση των πληθυσμιακών του διακυμάνσεων. Συνοψίζοντας, είναι χρήσιμο να αναφερθούν εν συντομία τα σημαντικότερα ευρήματα και συμπεράσματα που προέκυψαν ανά άξονα, καθώς και η προτεινόμενη αξιοποίησή τους στο πλαίσιο της διαχειριστικής πρακτικής.

Η γενετική ανάλυση έδειξε ότι:

- ✓ Τα ζαρκάδια που επιβιώνουν στην Ελλάδα ανήκουν στο σύνολό τους σε έναν και μόνο φυλογενετικό κλάδο (Ανατολικό κλάδο), ο οποίος πιθανώς διαφοροποιήθηκε εξαιτίας της απομόνωσης προγονικών πληθυσμών του είδους κατά τις παγετώδεις περιόδους στη Βαλκανική χερσόνησο. Η γενετική δεξαμενή του ελληνικού ζαρκαδιού περιλαμβάνει ένα σημαντικό τμήμα της ποικιλότητας του συγκεκριμένου κλάδου και δεν παρουσιάζει σημάδια γενετικής διείσδυσης από άλλους κλάδους.
- ✓ Η επανεποίκιση της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης μετά την τελευταία παγετώδη περίοδο δεν πραγματοποιήθηκε με τη διασπορά ζαρκαδιών από τον ελλαδικό χώρο αλλά μάλλον προήλθε από ένα ή περισσότερα καταφύγια της ανατολικής Ευρώπης (Καρπάθια).
- ✓ Οι ελληνικοί πληθυσμοί, ως μέρος ενός συνόλου ιστορικά απομονωμένων και έντονα διαφοροποιημένων πληθυσμών των Βαλκανίων, συνιστούν μια εξελκτικά σημαντική μονάδα διατήρησης εντός του είδους, η οποία χρήζει προστασίας από γενετική υποβάθμιση και ανάμειξη. Σε ενδεχόμενα μελλοντικά προγράμματα ενίσχυσης των ελληνικών πληθυσμών θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η προέλευση και η γενετική ταυτότητα των μεταφερόμενων ζαρκαδιών. Γενικά θα πρέπει να αποφευχθούν εισαγωγές ζαρκαδιών από πληθυσμούς εκτός της Ελλάδας.
- ✓ Όπως συμβαίνει και στην Ιταλική και Ιβηρική χερσόνησο, το ζαρκάδι στην Ελλάδα εμφανίζει ισχυρή γενετική δομή και υψηλή διαπληθυσμιακή διαφοροποίηση, σε αντίθεση με τους πιο ομοιογενείς πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης.
- ✓ Το πρότυπο της γενετικής δομής είναι σύνθετο και η σύγχρονη κατανομή της γενετικής ποικιλότητας προέκυψε μάλλον ως αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης τόσο ιστορικών όσο και πιο πρόσφατων γεγονότων, που συνδέονται με τοπικές γεωγραφικές απομονώσεις και σημαντικές δημογραφικές διακυμάνσεις.
- ✓ Η σταδιακή συρρίκνωση της αφθονίας του ζαρκαδιού στην Ελλάδα κατά το πρόσφατο παρελθόν ως αποτέλεσμα της εντατικής θήρευσης και ο κατακερματισμός των

ενδαιτημάτων του λόγω ανθρωπογενών παρεμβάσεων, φαίνεται να οδήγησαν σε μειωμένα επίπεδα γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών, ακόμη και σε περιοχές όπου το είδος εμφανίζει συνεχή κατανομή.

- ✓ Η δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης στους μικρούς και απομονωμένους ελληνικούς πληθυσμούς θα μπορούσε να θεωρηθεί καθοριστικός παράγοντας διαμόρφωσης των υψηλών τιμών διαπληθυσμιακής διαφοροποίησης σε τόσο μικρή γεωγραφική κλίμακα. Μελλοντικές γενετικές μελέτες περισσότερων ελληνικών πληθυσμών είναι δυνατόν να επιβεβαιώσουν τη συγκεκριμένη υπόθεση.
- ✓ Η συνολική ποικιλότητα της γενετικής δεξαμενής του ελληνικού ζαρκαδιού εμφανίζεται υψηλή εξαιτίας της διαπληθυσμιακής ποικιλότητας, αλλά οι τοπικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από μειωμένες τιμές γενετικής ποικιλότητας σε σχέση με τους ακμαίους πληθυσμούς άλλων χωρών, πιθανόν λόγω του μικρού τους μεγέθους. Το δεδομένο αυτό, σε συνδυασμό με την πιθανή γενετική απομόνωση σε τοπική κλίμακα, καθιστά τους ελληνικούς πληθυσμούς ιδιαίτερα ευάλωτους σε φαινόμενα περεταίρω γενετικής υποβάθμισης και υπογραμμίζει την ανάγκη εξειδικευμένης διαχείρισης και προστασίας.
- ✓ Οι τέσσερις φυσικοί πληθυσμοί, που μελετήθηκαν, συνιστούν ανεξάρτητες διαχειριστικές μονάδες οι οποίες θα πρέπει να διατηρηθούν ως σημαντικές συνιστώσες της ποικιλομορφίας και του εξελικτικού δυναμικού του ελληνικού ζαρκαδιού. Η συστηματική παρακολούθηση σε βάθος χρόνου τόσο της κατανομής της γενετικής ποικιλότητας των τοπικών πληθυσμών όσο και των δημογραφικών τους παραμέτρων είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την λήψη ορθών διαχειριστικών μέτρων ανά περίπτωση.
- ✓ Οι τιμές ποικιλότητας των πληθυσμών της Όσσας και της Παρνασσίδας βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες των πληθυσμών του Ζαγορίου και του Λαΐλιά. Η συνέχιση της θήρευσης στις συγκεκριμένες ελεγχόμενες κυνηγετικές περιοχές θα πρέπει να αναθεωρηθεί ως άμεσο διαχειριστικό μέτρο προστασίας της υπάρχουσας ποικιλότητας.
- ✓ Ο εκτρεφόμενος πληθυσμός των Καλαβρύτων δεν φαίνεται να αντιμετωπίζει σημαντικά γενετικά προβλήματα και θα μπορούσε, υπό προϋποθέσεις, να αξιοποιηθεί για την μελλοντική επανεισαγωγή του είδους στην Πελοπόννησο.
- ✓ Η επιτυχής απομόνωση ικανοποιητικής ποσότητας και ποιότητας DNA από νεκρό οργανικό υλικό όπως κέρατα, οστά, δόντια και τρίχες υποδεικνύει πως μια τέτοια προσέγγιση είναι δυνατόν να εφαρμοστεί εντατικά για τη μελέτη απειλούμενων πληθυσμών του είδους, στους οποίους η θήρευση ως μέσο συγκέντρωσης επαρκούς αριθμού δειγμάτων από μαλακούς ιστούς δεν αποτελεί εναλλακτική λύση.
- ✓ Ο ικανοποιητικός αριθμός (14) και ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού των μικροδορυφορικών τόπων που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις, αλλά και η ύπαρξη

υψηλού ποσοστού ιδιωτικών αλληλομόρφων ανά πληθυσμό, καθιστά το συγκεκριμένο σύνολο μοριακών δεικτών ένα σημαντικό και σχετικά χαμηλού κόστους διαχειριστικό εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί: α) στην ιχνηλασιμότητα της προέλευσης ζώων, β) στον εγκληματολογικό έλεγχο της παράνομης θήρευσης μέσω της γενετικής ταυτοποίησης κατασχεθέντων δειγμάτων και γ) στην εφαρμογή γενετικών μεθόδων εκτίμησης της αφθονίας, οι οποίες στηρίζονται σε μη παρεμβατική δειγματοληψία κοπράνων ή τριχών και στις αρχές της μεθοδολογίας σύλληψης-σήμανσης-επανασύλληψης.

Η προσπάθεια περιγραφής της γενετικής κατάστασης του ελληνικού ζαρκαδιού αλλά και η γενικότερη εμπειρία που αποκομίσθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (π.χ. επαφές με Δασαρχεία), κατέδειξαν ότι η απουσία συστηματικών εκτιμήσεων της αφθονίας και της πυκνότητας των πληθυσμών του ζαρκαδιού συνιστά μια σημαντική διαχειριστική ανεπάρκεια. Οι επιτυχείς πληθυσμιακές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο εκτροφείο των Καλαβρύτων αποδεικνύουν ότι οι έμμεσες μέθοδοι καταμέτρησης κοπρανosoφρών μπορούν να εφαρμοστούν και στα ορεινά μεσογειακά οικοσυστήματα της Ελλάδας δίνοντας μια εναλλακτική δυνατότητα αξιόπιστων εκτιμήσεων του πληθυσμιακού μεγέθους των ζαρκαδιών. Η αξιολόγηση της εφαρμογής των δύο μεθοδολογικών προσεγγίσεων που ακολουθήθηκαν στις διαδοχικές έρευνες πεδίου (FAR & FSC distance sampling) υποδεικνύει ότι:

- ✓ Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των έμμεσων μεθόδων είναι η εξασφάλιση θετικών καταμετρήσεων (δείγματος) σε λογικά πλαίσια χρόνου και προσπάθειας. Με δεδομένη τη χαμηλή πυκνότητα των ελληνικών πληθυσμών, η καταμέτρηση των ίδιων των ζώων (άμεσες μέθοδοι) προϋποθέτει μεγάλο αριθμό παρατηρητών και χρονοβόρες δειγματοληψίες, ενώ αναμένεται να δίνει αποτελέσματα χαμηλής στατιστικής ακρίβειας (ευρεία όρια εμπιστοσύνης). Αντίθετα η καταμέτρηση των κοπρανosoφρών μπορεί -με τον κατάλληλο δειγματοληπτικό σχεδιασμό- να επιτρέψει την εκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας των ζαρκαδιών με ικανοποιητική ακρίβεια και χαμηλότερο κόστος.
- ✓ Η διενέργεια ερευνών με τη μέθοδο FAR είναι πιο απλή στο σχεδιασμό και την ανάλυση, αφού δεν προϋποθέτει τη χρήση εξειδικευμένων στατιστικών προγραμμάτων, ενώ απαιτεί τη γνώση μόνο του ρυθμού αφόδευσης. Ωστόσο, η πρακτική της εφαρμογή σε ενδιαιτήματα πυκνής βλάστησης και μεγάλων κλίσεων καθίσταται προβληματική κυρίως εξαιτίας της αδυναμίας οριοθέτησης των δειγματοληπτικών επιφανειών και αναζήτησης των συσσωρευμένων κοπρανosoφρών. Η ευστοχία των εκτιμήσεων σε αυτές τις περιπτώσεις υπόκειται σε ενδεχόμενα συστηματικά σφάλματα.
- ✓ Η έρευνα με τη μέθοδο FSC και δειγματοληψία αποστάσεων είναι λιγότερο απαιτητική σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό και πρακτικά μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους ενδιαιτημάτων, δίνοντας ακριβείς εκτιμήσεις με δειγματοληψίες μιας μόνο

επίσκεψης. Απαραίτητη προϋπόθεση, βέβαια, για την ορθή εκτίμηση της πυκνότητας και της αφθονίας των ζαρκαδιών με βάση αυτή τη μεθοδολογική προσέγγιση είναι ο υπολογισμός του μέσου χρόνου αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών για το χρονικό διάστημα που προηγείται της κυρίως δειγματοληψίας. Επίσης, σημαντικός χρόνος θα πρέπει να επενδυθεί στην εξοικείωση χρήσης των εξειδικευμένων στατιστικών προγραμμάτων.

- ✓ Για την εύστοχη εκτίμηση της αφθονίας και στις δύο μεθόδους χρειάζονται ρεαλιστικές εκτιμήσεις του ρυθμού αφόδευσης. Μελλοντικά πειράματα υπολογισμού του συγκεκριμένου ρυθμού σε ελληνικούς πληθυσμούς κρίνονται απαραίτητα για να προσδιοριστεί αν και κατά πόσο υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με δημοσιευμένες τιμές.
- ✓ Ως καταλληλότερη μέθοδος για εφαρμογή σε προγράμματα συστηματικής παρακολούθησης (monitoring) των πληθυσμών του ζαρκαδιού προτείνεται η FSC με δειγματοληψία αποστάσεων, λόγω κυρίως της δυνατότητας που παρέχει για μεγαλύτερη ένταση δειγματοληψίας για δεδομένο κόστος σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό.

Το ζαρκάδι, ιστορικό και χαρακτηριστικό στοιχείο της βιοποικιλότητας των ορεινών δασικών οικοσυστημάτων της χώρας μας, αντιμετώπισε στο πρόσφατο παρελθόν το φάσμα της εξαφάνισης. Παρά το γεγονός ότι η απαγόρευση θήρας φαίνεται να συνέβαλε καθοριστικά στην αποτροπή αυτού του ενδεχομένου, σημαντικές απειλές που σχετίζονται με την ανθρώπινη δραστηριότητα όπως ο κατακερματισμός των ενδιαιτημάτων του και η λαθροθηρία, εξακολουθούν να θέτουν σε αμφισβήτηση τη δυνατότητα μακρόχρονης επιβίωσής του. Η επιστημονική έρευνα σε θέματα που άπτονται της πληθυσμιακής βιολογίας, της γενετικής και της οικολογίας του ζαρκαδιού στην Ελλάδα είναι απαραίτητη για την κατανόηση των μηχανισμών και της δριμύτητας με την οποία δρουν οι συγκεκριμένες απειλές και επηρεάζουν τις προοπτικές διατήρησης του είδους. Ταυτόχρονα, η έστω και στοιχειώδης περιγραφή της υφιστάμενης κατάστασης με την τεκμηρίωση των ιδιαίτερων προβλημάτων που αντιμετωπίζουν οι πληθυσμοί του ζαρκαδιού μπορεί να συμβάλει στην προσπάθεια ορθής διαχείρισης και προστασίας του.

Στα πλαίσια μιας περισσότερο «ολιστικής» θεώρησης, η συστηματική μελέτη του ζαρκαδιού ως οργανισμού μοντέλου ή ενός ιδιότυπου οικολογικού δείκτη «υγείας» των ορεινών δασικών οικοσυστημάτων της Ελλάδας, θα μπορούσε να βοηθήσει στον εντοπισμό ανθρωπογενών παρεμβάσεων οι οποίες οδηγούν σε γενικότερη υποβάθμιση των φυσικών αυτών ενδιαιτημάτων ή επιδρούν στα πρότυπα συμπεριφοράς και χωρικής κατανομής και άλλων ειδών της πανίδας, κυρίως των μεγάλων θηλαστικών. Επιπλέον, η εφαρμογή στρατηγικών διαχείρισης και διατήρησης κατά προτεραιότητα στο ζαρκάδι μπορεί να λειτουργήσει ως ομπρέλα προστασίας για είδη που συνδέονται τροφικά μαζί του (π.χ. λύκος) ή για είδη με χαμηλότερες οικολογικές απαιτήσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Aanes R, Linnell JDC, Perzanowski K, Karlsen J & Odden J, 1998.** Roe deer as prey. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 139-160.
- Acevedo P, Ferreres J, Jaroso R, Durán M, Escudero MA, Marco J & Gortázar C, 2010.** Estimating roe deer abundance from pellet group counts in Spain: An assessment of methods suitable for Mediterranean woodlands. *Ecological Indicators*, 10: 1226-1230.
- Adamakopoulos P, Adamakopoulos T, Bousbouras D, Giannatos G, Hatzirvassanis V, Ioannidis Y, Papaioannou H & Sfougaris A, 1991.** Les grands mammifères de Grèce (Carnivores et Artiodactyles): Situation actuelle, répartition, habitat - Les espèces menaces perspectives de protection. *Biologia Gallo-Hellenica*, 18: 107-126.
- Akaike H, 1973.** Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In Petrov BN & Csaki F (eds), *Second international symposium on information theory*. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 267-281.
- Akaike H, 1983.** Information measures and model selection. *Bulletin of the International Statistical Institute*, 44: 277-291.
- Alasaad S, Soriguer RC, Chelomina G, Sushitsky YP & Fickel J, 2011.** Siberian tiger's recent population bottleneck in the Russian Far East revealed by microsatellite markers. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 76: 722-726.
- Allendorf FW & Leary RF, 1986.** Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In. Soulé ME (ed), *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 57-76.
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA & Ryman N, 2008.** Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 327-337.
- Amberger K-P, 1979.** *Neue Tierknochenfunde aus der Magula Pevkakia in Thessalien. II: Die Wiederkäuer*. Dissertation. Institut für Palaeoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin. Universität München.
- Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), 1998.** *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo.
- Anderson RD, 2001.** In my opinion: The need to get the basics right in wildlife field studies. *Wildlife Society Bulletin*, 29: 1294-1297.

- Aragón S, Braza F & San Jose C, 1995.** Socioeconomic, physiognomic and climatic factors determining the distribution pattern of roe deer *Capreolus capreolus* in Spain. *Acta Theriologica*, 40: 37-43.
- Athanassiou A, 2002.** Neogene and Quaternary mammal faunas of Thessaly. *Annales geologiques des Pays helleniques*, 39: 279-283.
- Aulak W & Babińska-Werka J, 1990.** Preference of different habitats and age classes of forest by roe deer. *Acta Theriologica*, 35: 289-298.
- Avery RA & Perkins CM, 1989.** The use of faecal counts for estimating populations of wall lizards (*Podarcis muralis*). *Journal of Zoology*, 217: 73-84.
- Avise JC, 1994.** *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise JC, 2000.** *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC, 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- Bailey GN & Gamble C, 1990.** The Balkans at 18 000 BP: the view from Epirus. In Gamble C & Saffer O (eds), *The world at 18 000 BP. Volume 1: High Latitudes*. Unwin Hyman, London, pp. 148-167.
- Bailey GN, Carter PL, Gamble CS & Higgs HP, 1983.** Asprochaliko and Kastritsa: further investigations of Palaeolithic settlement and economy in Epirus (North-west Greece). *Proceedings of the Prehistoric Society*, 49:15-42.
- Bailey RE & Putman RJ, 1981.** Estimation of fallow deer (*Dama dama*) populations from faecal accumulation. *Journal of Applied Ecology*, 18: 697-702.
- Baker KH, 2011.** *Population genetic history of the British roe deer (Capreolus capreolus) and its implications for diversity and fitness*. Ph.D. thesis, Durham University, UK.
- Balloux F & Lugon-Moulin N, 2002.** The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165.
- Bandelt H-J, Forster P & Rohl A, 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Bang P & Dahlstrøm P, 2001.** *Animal Tracks and Signs*. Oxford University Press, New York.
- Barbero E, Palestrini C & Rolando A, 1999.** Dung beetle conservation: effects of habitat and resource selection (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Journal of Insect Conservation*, 3: 75-84.
- Barnes RFW, 2001.** How reliable are dung counts for estimating elephant numbers? *African Journal of Ecology*, 39: 1-9.

- Becker C, 1986.** *Kastanas. Ausgrabungen in einem Siedlungshügel der Bronze- und Eisenzeit Makedoniens, 1975-1979. Die Tierknochenfunde.* Wissenschaftsverlag Volker Spiess, Berlin.
- Becker C, 1991.** Die Tierknochenfunde von der Plateia Magoula Zarkou - neue Untersuchungen zu Haustierhaltung, Jagd und Rohstoffverwendung im neolithischbronzezeitlichen Thessalien. *Prähistorische Zeitschrift*, 66: 14-78.
- Becker C, 1996.** Nourriture, Cuilleres, Ornaments ... Les Temoignages d' une Exploitation Variée des Mollusques Marins à Ayios Mamas (Chalcidique, Grèce). *Anthropozoologica*, 24: 3-17.
- Beebee T & Rowe G, 2004.** *An introduction to Molecular Ecology.* Oxford University Press, New York.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L & Bonhomme F, 1999.** *GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions.* Montpellier: CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II.
- Benhaïem S, Delon M, Lourtet B, Cargnelutti B, Aulagnier S, Hewison AJM, Morellet N & Verheyden H, 2008.** Hunting increases vigilance levels in roe deer and modifies feeding site selection. *Animal Behaviour*, 76: 611-618.
- Benzécri JP, 1973.** *L'Analyse des Données: Tome 2, l'Analyse Des Correspondances.* Paris: Dunod Press.
- Bergl RA & Vigilant L, 2007.** Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of the Cross River gorilla (*Gorilla gorilla diehli*). *Molecular Ecology*, 16: 501-516.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J & Searle JB, 1998.** Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonisation. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 265: 1219-1226.
- Birky CW, Fuerst P & Maruyama T, 1989.** Organelle gene diversity under migration, mutation and drift equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121: 613-627.
- Blondel J, 1995.** *Biogéographie: Approche Écologique et Évolutive.* Masson Ed., Paris.
- Boessneck J, 1962.** Die Tierreste aus der Argissa-Magoula vom präkeramischen Neolithikum bis zu mittleren Bronzezeit. In Milošević V, Boessneck J & Hopf M, *Die deutschen Ausgrabungen auf der Argissa-Magoula in Thessalien I.* Bonn, Habelt, pp. 27-99.
- Boessneck J, 1973.** *Die Tierknochenfunde aus dem Kabirenheiligtum bei Theben (Böotien).* Institut für Paläoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin der Universität München. München
- Bökönyi S & Janossy D, 1986.** Faunal remains. In Renfrew C, Gimbutas M & Elster ES (eds), *Excavations at Sitagroi, a Prehistoric Village in Northeast Greece. Vol. 1.* Los Angeles Institute of Archaeology, University of California, pp. 63-132.

- Bökönyi S, 1989.** Animal remains. In Gimbutas M, Winn S & Shimabuku D (eds), *Achilleion A Neolithic Settlement in Thessaly, Greece, 6400-6500 BC*. Los Angeles Institute of Archaeology, University of California, pp. 315-332.
- Bongi P, 2008.** *Environmental and human factors affecting spatial behavior and detectability of roe deer (Capreolus capreolus): Influence on population estimate*. Ph.D. thesis, University of Sassari, Italy.
- Bonnot N, Gaillard J-M, Coulon A, Galan M, Cosson J-F, Delorme D, Klein F & Hewison AJM, 2010.** No difference between the sexes in fine-scale spatial genetic structure of roe deer. *PLoS ONE*, 5: e14436. doi:10.1371/journal.pone.0014436
- Borchers DL, Buckland ST & Zucchini W, 2002.** *Estimating Animal Abundance*. Springer, London.
- Brown JR, Beckenbach AT & Smith MJ, 1993.** Intra-specific DNA sequence variation of the mitochondrial control-region of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution*, 10: 326-341
- Brown JS, Laundre JW & Gurung M, 1999.** The ecology of fear: optimal foraging, game theory, and trophic interactions. *Journal of Mammalogy*, 80: 385-399.
- Brown WM, 1985.** The mitochondrial genome of animals. In MacIntyre RJ (ed), *Evolution of genes and proteins*. Plenum Press, New York, USA.
- Buckland ST, Anderson DR, Burnham KP, Laake JL, Borchers DL & Thomas L, 2001.** *Introduction to distance sampling: estimating abundance of biological populations*. Oxford University Press, London.
- Buckland ST, Burnham KP & Augustin NH, 1997.** Model selection: an integral part of inference. *Biometrics*, 53: 603-618.
- Burbaitė L & Csányi S, 2009.** Roe deer population and harvest changes in Europe. *Estonian Journal of Ecology*, 58: 169-180.
- Burnham KP & Anderson DR, 2002.** *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. 2nd edn. Springer, New York.
- Burnham KP, Anderson DR & Laake JL, 1985.** Efficiency and bias in strip and line transect sampling. *Journal of Wildlife Management*, 49: 1012-1018.
- Calambokidis J, Steiger GH, Ellifrit DK, Troutman BL & Bowlby CE, 2004.** Distribution and abundance of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) and other marine mammals of the northern Washington coast. *Fisheries Bulletin*, 102: 563-580.
- Campbell D, Swanson GM & Sales J, 2004.** Comparing the precision and cost-effectiveness of faecal pellet group count methods. *Journal of Applied Ecology*, 41: 1185-1196.
- Cavalli-Sforza LL & Edwards AWF, 1967.** Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19: 233-257.

- Cederlund G, Bergqvist J, Kjellander P, Gill R, Gaillard JM, Duncan P, Ballon P & Boisaubert B, 1998.** Managing roe deer and their impact on the environment: maximizing benefits and minimizing costs. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 337-372.
- Cederlund G, Ljungqvist H, Markgren G & Stalfelt F, 1980.** Foods of moose and roe deer at Grimso in central Sweden. Results of rumen content analysis. *Swedish Wildlife Research*, 11: 169-247.
- Chapman NG, 2004.** Faecal pellets of Reeves' muntjac, *Muntiacus reevesi*: defecation rate, decomposition period, size and weight. *European Journal of Wildlife Research*, 50: 141-145.
- Cicognani L, Monti F, Gellini S & Pascucci M, 2000.** Censusing roe deer (*Capreolus capreolus*) populations for hunting management: a local experiment in order to increase the benefit cost/ratio. *Hystrix*, 11: 121-125.
- Cochran WG, 1977.** *Sampling techniques*. Willey, New York.
- Cockerham CC, 1969.** Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23: 72-84.
- Collins P & Halstead P, 1999.** Faunal remains and animal exploitation at Late Neolithic Makryialos: preliminary results. In Halstead P (ed), *Neolithic Society in Greece*. Sheffield Academic Press, Sheffield England, pp. 139-141.
- Coltman DW, Bancroft DR, Robertson A, Smith JA, Clutton-Brock TH & Pemberton JM, 1999a.** Male reproductive success in a promiscuous mammal: behavioural estimates compared with genetic paternity. *Molecular Ecology*, 8: 1199-1209.
- Coltman DW, Bowen WD & Wright JM, 1998.** Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 265: 803-809.
- Coltman DW, Pilkington JG, Smith JA & Pemberton JM 1999b.** Parasite-mediated selection against inbred soay sheep in a free-living, island population. *Evolution*, 53: 1259-1267.
- Conroy MJ & Nichols JD, 1996.** Designing a study to assess mammalian diversity. In Wilson DE, Russell Cole F, Nichols JD, Rudran R & Foster MS (eds), *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 41-50.
- Cornelis J, Casaer J & Hermy M, 1999.** Impact of season, habitat and research techniques on diet composition of roe deer (*Capreolus capreolus*): a review. *Journal of Zoology*, 248: 195-207.
- Cornuet JM & Luikart G, 1996.** Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.

- Coulon A, Cosson JF, Angibault JM, Cargnelutti B, Galan M, Morellet N, Petit E, Aulagnier S & Hewison AJ, 2004.** Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13: 2841-2850.
- Coulon A, Guillot G, Cosson J-F, Angibault JM, Aulagnier S, Cargnelutti B, Galan M & Hewison AJM, 2006.** Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology*, 15: 1669-1679.
- Crandall KA & Templeton AR, 1993.** Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134: 959-969.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM & Wayne RK, 2000.** Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 290-295.
- Crandall KA, Posada D & Vasco D, 1999.** Effective population sizes: missing measures and missing concepts. *Animal Conservation*, 2: 317-319.
- Crnokrak P & Roff DA, 1999.** Inbreeding depression in the wild. *Heredity*, 83: 260-270.
- Cronin MA, 1993.** Mitochondrial DNA in wildlife taxonomy and conservation biology: cautionary notes. *Wildlife Society Bulletin*, 21: 339-348.
- Danilkin A, 1996.** *Behavioural Ecology of Siberian and European Roe Deer*. Chapman and Hall, London.
- DeYoung RW & Honeycutt RL, 2005.** The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management*, 69: 1362-1384.
- Dixon JD, Oli MK, Wooten MC, Eason TH, McCown JW & Cunningham MW, 2007.** Genetic consequences of habitat fragmentation and loss: the case of the Florida black bear (*Ursus americanus floridanus*). *Conservation Genetics*, 8: 455-464.
- Douzery E & Randi E, 1997.** The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1154-1166.
- Driesch A v.d & Boessneck J, 1990.** Die Tierreste von der mykenischen Burg Tiryns bei Nauplion (Peloponnes). In Kilian K (ed), *Sonderdruck aus Tiryns Forschungen und Bericht XI*. Verlag Philipp von Zabern, Mainz, pp. 85-167.
- Duncan P, Tixier H, Hoffman RR & Lechner-Doll M, 1998.** Feeding strategies and the physiology of digestion in roe deer. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 91-116.
- Dzięciołowski R, 1976.** Roe deer census by pellet-group counts. *Acta Theriologica*, 21: 351-358.
- Earl D, 2010.** *Structure Harvester ver 0.56.4*, from website: http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/

- Eberhardt L & Van Etten RC, 1956.** Evaluation of the pellet group count as a deer census method. *Journal of Wildlife Management*, 20: 70-74.
- Edmands S, 2002.** Does parental divergence predict reproductive compatibility? *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 520-527.
- Efron B & Tibshirani RJ, 1993.** *An introduction to the bootstrap*. Chapman and Hall, New York.
- Eisen JA, 1999.** Mechanistic basis for microsatellite instability. In Goldstein DB & Schlötterer C (eds), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34-48.
- Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG, O'Brien SJ & Johnson WE, 2001.** Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10: 65-79.
- Ellis A & Bernard RTF, 2005.** Estimating the density of kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) in subtropical thicket using line transect surveys of dung and DISTANCE software. *African Journal of Ecology*, 43: 362-368.
- Evanno G, Regnaut S & Goudet J, 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier L & Heckel G, 2006.** Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*, 7: 745-758.
- Excoffier L, Laval G & Schneider S, 2005.** *Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM, 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Falconer DS & Mackay TFC, 1996.** *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, Harlow.
- Falush D, Stephens M & Pritchard JK, 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Fattorini L, Ferretti F, Pisani C & Sforzi A, 2011.** Two-stage estimation of ungulate abundance in Mediterranean areas using pellet group count. *Environmental and Ecological Statistics*, 18: 291-314.
- Feulner PGD, Bielfeldt W, Zachos FE, Bradvarovic J, Eckert I & Hartl GB, 2004.** Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). *Heredity*, 93: 299-306.
- Fickel J & Reinsch A, 2000.** Microsatellite markers for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Molecular Ecology*, 9: 994-995.

- Filippucci MG, Macholàn M & Michaux JR, 2002.** Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae, Rodentia). *Biological Journal of the Linnean Society*, 75: 395-419.
- Focardi S, Isotti R & Tinelli A, 2002.** Line transect estimates of ungulate populations in a Mediterranean forest. *Journal of Wildlife Management*, 66: 48-58.
- Focardi S, Montanaro P, Issoti R, Ronchi F, Scacco M & Calmanti R, 2005.** Distance sampling effectively monitored a declining population of Italian roe deer *Capreolus capreolus italicus*. *Oryx*, 39: 1-8.
- Frankel OH & Soulé ME (eds), 1981.** *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Frankham R & Ralls K, 1998.** Inbreeding leads to extinction. *Nature*, 392: 441-442.
- Frankham R, 1995a.** Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29: 305-327.
- Frankham R, 1995b.** Effective population/adult population size ratio in wildlife: a review. *Genetical Research Cambridge*, 66: 95-107.
- Frankham R, 2005.** Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126: 131-140
- Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA, 2002.** *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Fraser DJ & Bernatchez L, 2001.** Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 2741-2752.
- Funk DJ & Omland KE, 2003.** Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 34: 397-423.
- Gaidet-Drapier N, Fritz H, Bougarel M, Renaud PC, Poilecot P, Chardonnet P, Coid C, Poulet & Le Bel S, 2006.** Cost and efficiency of large mammal census techniques: comparison of methods for a participatory approach in a communal area, Zimbabwe. *Biodiversity and Conservation*, 15: 735-754.
- Gaillard JM, Hewison AJM, Kjellander P, Pettorelli N, Bonenfant C, Van Moorter B, Liberg O, Andren H, Van Laere G, Klein F, Angibault JM, Coulon A & Vanpe C, 2008.** Population density and sex do not influence fine-scale natal dispersal in roe deer. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 275: 2025-2030.
- Gaillard JM, Liberg O, Andersen R, Hewison AJM & Cederlund G, 1998.** Population dynamics of roe deer. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 309-336.

- Galan M, Cosson JF, Aulagnier S, Maillard JC, Thévenon S & Hewison AJM, 2003.** Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3: 142-146.
- Garner A, Rachlow JL & Hicks JF, 2005.** Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology*, 19: 1215-1221.
- Gasner MR, Jankowski JE, Ciecka AL, Kyle KO & Rabenold KN, 2010.** Projecting the local impacts of climate change on a Central American montane avian community. *Biological Conservation*, 143: 1250-1258.
- Geist V, 1999.** *Deer of the World- Their Evolution, Behaviour, and Ecology*. Swan Hill Press, England, pp. 302-314.
- Gejvall N-G, 1969.** *Lerna, a preclassical site in the Argolid. I. The fauna*. American School of Classical Studies, Princeton.
- Gentile G, Vernesi C, Vicario S, Pecchioli E, Caccone A, Bertorelle G & Sbordoni V, 2009.** Mitochondrial DNA variation in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Italy: Evidence of admixture in one of the last *C. c. italicus* pure populations from central-southern Italy. *Italian Journal of Zoology*, 76: 16-27.
- Giannakopoulos A, Tsaparis D, Birtsas P, Poirazidis K, Iliopoulos Y & Manios N, 2009a.** Current distribution and population status of roe deer in Greece. *Book of Abstracts (oral presentation) - 9th European Roe Deer Congress*. Edinburgh, 6-10 July.
- Giannakopoulos A, Poirazidis K & Tsachalidis E, 2009b.** Roe deer potential distribution and habitat suitability in Grevena-Western Macedonia, Greece. *Book of Abstracts (poster presentation) - 9th European Roe Deer Congress*. Edinburgh, 6-10 July.
- Giannakopoulos A, Akriotis T, Dimitrakopoulos P, Theodorou K, Mertzanis Y, Iliopoulos Y, Poirazidis K & Pilides X, 2009c.** Monitoring the permeability of the Egnatia highway for roe deer in Northern Greece. *Book of Abstracts (poster presentation) - 9th European Roe Deer Congress*. Edinburgh, 6-10 July.
- Gilbert C, Ropiquet A & Hassanin A, 2006.** Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 101-117.
- Gill RMA, Johnson AL, Francis A, Hiscochs K & Peace AJ, 1996.** Changes in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) population density in response to forest habitat succession. *Forest Ecology and Management*, 88: 31-41.
- Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza LL & Feldman MW, 1995.** An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463-471.

- Goodman SJ, Tamate HB, Wilson R, Nagata J, Tatsuzawa S, Swanson GM, Pemberton JM. & McCullough DR, 2001.** Bottlenecks, drift and differentiation: the population structure and demographic history of sika deer (*Cervus nippon*) in the Japanese archipelago. *Molecular Ecology*, 10: 1357-1370.
- Goudet J, 1995.** FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- Goudet J, 2002.** *Fstat v2.9.3.2*. UNIL, Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland.
- Groth DM & Weatherall JD 1994.** Dinucleotide repeat polymorphism within the ovine major histocompatibility complex class I region. *Animal Genetics*, 25: 61.
- Groves CP & Grubb P, 1987.** Relationships of the living deer. In Wemmer CM (ed), *Biology and Management of the Cervidae*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp. 21-59.
- Grubb P, 1993.** Order Artiodactyla. In Wilson DE & Reeder DM (eds), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 377-414
- Guo S & Thompson E, 1992.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Haig SM, 1998.** Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79: 413-425.
- Hamilakis Y, 1996.** Cretan Pleistocene fauna and archaeological remains: the evidence from Sentoni cave (Zoniana, Rethymnon). In Reese DS, *The Pleistocene and Holocene fauna of Crete and its first settlers*. Prehistory Press, Madison, pp. 231-239.
- Hamilakis Y, 2000.** Zooarchaeology of Neolithic Theopetra - preliminary report. In Kyparissi-Apostolika N, *Theopetra Cave. Twelve Years of Excavation and Research 1987-1998*. Athens, pp. 263-267.
- Hamilakis Y, 2003.** Animal sacrifice and Mycenaean societies: preliminary thoughts on the zooarchaeological evidence from the sanctuary at Ag. Konstantinos, Methana. In Konsolaki E (ed) *Argosaronikos: Proceedings of the 1st International Conference on the History and Archaeology of the Argosaronic Gulf*. Athens, pp. 249-256.
- Hanski IA & Gilpin M (eds), 1996.** *Metapopulation Dynamics, Ecology, Genetics, and Evolution*. Academic Press, New York.
- Hansson B & Westerberg L, 2002.** On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, 11: 2467-2474.
- Harding RM, Boyce AJ & Clegg JB, 1992.** The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, 132: 847-859.

- Hare MP, 2001.** Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 700-706.
- Harris RB, Wall WA & Allendorf FW, 2002.** Genetic consequences of hunting: what do we know and what should we do? *Wildlife Society Bulletin*, 30: 634-643.
- Harrison DL & Bates PJJ, 1991.** *The mammals of Arabia*. Harrison Zoological Museum, Sevenoaks.
- Harrison RG, 1989.** Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 6-11.
- Hartl GB, Markov G, Rubin A, Findo S, Lang G & Willing R. 1993.** Allozyme diversity within and among populations of three ungulate species (*Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Sus scrofa*) of Southeastern and Central Europe. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 58: 352-361.
- Hartl GB, Reimoser F, Willing R & Köller J, 1991.** Genetic variability and differentiation in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) of Central Europe. *Genetics, Selection, Evolution*, 23: 281-299.
- Hearney AW & Jennings TJ, 1983.** Annual foods of the red deer (*Cervus elaphus*) and the roe deer (*Capreolus capreolus*) in the east of England. *Journal of Zoology*, 201: 565-570.
- Hedrick PW & Kalinowski ST, 2000.** Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31: 139-162.
- Hedrick PW, 1996.** Bottleneck(s) or metapopulation in cheetahs. *Conservation Biology*, 10: 897-899.
- Hedrick PW, 1999.** Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53: 313-318.
- Hedrick PW, 2001.** Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 629-636.
- Hedrick PW, Brussard PF, Allendorf FW, Beardmore JA & Orzack S, 1986.** Protein variation, fitness, and captive propagation. *Zoo Biology*, 5: 91-99.
- Hemami MR & Dolman PM, 2005.** The disappearance of muntjac (*Muntiacus reevesi*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) pellet groups in a pine forest of lowland England. *European Journal of Wildlife Research*, 51: 19-24
- Hemami MR, Watkinson AR & Dolman PM, 2005.** Population densities and habitat associations of introduced muntjac *Muntiacus reevesi* and native roe deer *Capreolus capreolus* in a lowland pine forest. *Forest Ecology and Management*, 215: 224-238.
- Henry BAM, 1978.** A comparison of the winter diet of roe deer and sheep. *Journal of Zoology*, 185: 270-273.
- Hewison AJM, 1995.** Isozyme variation in roe deer in relation to their population history in Britain. *Journal of Zoology*, 235: 279-288.

- Hewison AJM, Vincent JP & Reby D, 1998.** Social organization of European roe deer. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 189-220.
- Hewitt GM, 1999.** Post-glacial recolonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87-112.
- Hewitt GM, 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-913.
- Hewitt GM, 2001.** Speciation, hybrid zones and phylogeography: or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10: 537-549.
- Hillis DM, Moritz M & Mable BK, 1996.** *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hmwe SS, Zachos FE, Sale JB, Rose HR & Hartl GB, 2006.** Genetic variability and differentiation in red deer (*Cervus elaphus*) from Scotland and England. *Journal of Zoology*, 270: 479-487.
- Hochachka WM, Martin K, Doyle F & Krebs CJ, 2000.** Monitoring vertebrate populations using observational data. *Canadian Journal of Zoology*, 78: 521-529.
- Hoelzel AR, Halley J, O'Brien SJ, Campagna C, Arnbom T, Le Boeuf B, Ralls K & Dover GA, 1993.** Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical bottlenecks. *Journal of Heredity*, 84: 443-449.
- Hoffmann AA & Parsons PA, 1997.** *Extreme environmental change and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Hubbard R, 1995.** Fallow deer in prehistoric Greece, and the analogy between faunal spectra. *Antiquity*, 69: 527-538.
- Hufthammer AK & Aaris-Sørensen K, 1998.** Late- and postglacial European roe deer. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 47-69.
- Hurvich CM & Tsai CL, 1989.** Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*, 76: 297-307.
- Jackson R, 2002.** *The Earth Remains Forever: Generations at a Crossroad*. University of Texas Press, Austin, Texas.
- Janis CM & Scott KM, 1987.** The interrelationships of higher ruminant families with special emphasis on the members of the Cervioidea. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2893: 1-85.
- Jarne P & Lagoda PJJ, 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 424-429.

- Jenkins DG, Carey M, Czerniewska J, Fletcher J, Hether T, Jones A, Knight S, Knox J, Long T, Mannino M, McGuire M, Riffle A, Segelsky S, Shappell L, Sterner A, Strickler T & Tursi R, 2010.** A meta-analysis of isolation by distance: relic or reference standard for landscape genetics? *Ecography*, 33: 315-320.
- Julien R, 1992.** Les Faunes Domestique et Sauvage. In Treuil R (ed.), Dikili Tash. Village Préhistorique de Macedoine Orientale. *Bulletin de Correspondance Hellénique*, Suppl. 24: 147-152.
- Kalinowski ST, 2004.** Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, 5: 539-543
- Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A & Kotoulas G, 2005.** The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 55-66.
- Katsanevakis S, 2006.** Modelling fish growth: model selection, multi-model inference and model selection uncertainty. *Fisheries Research*, 81: 229-235.
- Katsanevakis S, 2007.** Density surface modelling with line transect sampling as a tool for abundance estimation of marine benthic species: the *Pinna nobilis* example in a marine lake. *Marine Biology*, 152: 77-85.
- Katsanevakis S, Thessalou-Legaki M, Karlou-Riga C, Lefkaditou E, Dimitriou E & Verriopoulos G, 2007.** Information-theory approach to allometric growth of marine organisms. *Marine Biology*, 151: 949-959.
- Kilpatrick W, 2002.** Noncryogenic preservation of mammalian tissues for DNA extraction: an assessment of storage methods. *Biochemical Genetics*, 40: 53-62.
- Kimura M & Crow JF, 1964.** The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 143: 549-555.
- Kimura M & Weiss GH, 1964.** The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49: 561-576.
- King DI, Chandler RB, Schlossberg S & Chandler CC, 2009.** Habitat use and nest success of scrub-shrub birds in wildlife and silvicultural openings in western Massachusetts, USA. *Forest Ecology and Management*, 257: 421-426.
- Kohn MH & Wayne RK, 1997.** Facts from feces revisited. *Trends in Evolution and Ecology*, 12: 223-227.
- Kraaijeveld-Smit FJL, Beebee TJC, Griffiths RA, Moore RD & Schley L, 2005.** Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Molecular Ecology*, 14: 3307-3315.
- Krebs CJ, 1999.** *Ecological Methodology*. 2nd edn. Addison-Wesley Longman, New York.

- Kuehn R, Hindenlang KE, Holzgang O, Senn J, Stoeckle B & Sperisen C, 2007.** Genetic effect of transportation infrastructure on roe deer populations (*Capreolus capreolus*). *Journal of Heredity*, 98: 13-22.
- Kuehn R, Schroeder W, Pirchner F & Rottmann O, 2003.** Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*). *Conservation Genetics*, 4: 157-166.
- Kuijper DPJ, Cromsigt JPGM, Churski M, Adam B, Jędrzejewska B & Jędrzejewski W, 2009.** Do ungulates preferentially feed in forest gaps in European temperate forest? *Forest Ecology and Management*, 258: 1528-1535.
- Lacy RC, 1997.** Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 78: 320-335.
- Laing SE, Buckland ST, Burns RW, Lambie D & Amphlett A, 2003.** Dung and nest surveys: estimating decay rates. *Journal of Applied Ecology*, 40: 1102-1111.
- Lande R & Barrowclough G, 1987.** Effective population size, genetic variation and their use in population management. In Soulé ME (ed), *Viable Populations for Conservation*. Cambridge University Press, New York, pp. 87-123.
- Lande R, 1988.** Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241: 1455-1460.
- Larje R, 1987.** Animal bones. In Hellström P, *Paradeisos. A Late Neolithic Settlement in Aegean Thrace*. Stockholm, pp. 89-118.
- Larson S, Jameson R, Bodkin J, Staedler M & Bentzen P, 2002.** Microsatellite DNA and mitochondrial DNA variation in remnant and translocated sea otter (*Enhydra lutris*) populations. *Journal of Mammalogy*, 83: 893-906.
- Latham J, Staines BW & Gorman ML, 1996.** The relative densities of red (*Cervus elaphus*) and roe (*Capreolus capreolus*) deer and their relationship in Scottish forests. *Journal of Zoology*, 240: 285-299.
- Latham J, Staines BW & Gorman ML, 1997.** Correlations of red (*Cervus elaphus*) and roe (*Capreolus capreolus*) deer densities in Scottish forests with environmental variables. *Journal of Zoology*, 242: 681-704.
- Lawton JH & May RM (eds), 1995.** *Extinction rates*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Leaky R & Lewin R, 1995.** *The sixth extinction: Biodiversity and its survival*. Phoenix, London.
- Leberg P, 2005.** Genetic approaches for estimating the effective size of populations. *Journal of Wildlife Management*, 69: 1385-1399.
- Legakis A, 1994.** Community structure and species richness in the Mediterranean-type soil fauna. In Arianoutsou M, Groves RH (eds), *Plant-animal interactions in Mediterranean-type ecosystems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 37-46.

- Leopold BD, Krausman PR & Hervert JJ, 1984.** Comment: the pellet-group census technique as an indicator of relative habitat use. *Wildlife Society Bulletin*, 12: 325-326.
- Levin SA (ed), 2001.** *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, San Diego, California.
- Lewontin RC & Cockerham CC, 1959.** The goodness of fit test for detecting natural selection in random mating populations. *Evolution*, 13: 561-564.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A & Nevo E, 2002.** Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Liberg O, Andrén H, Pedersen H-C, Sand H, Sejberg D, Wabakken P, Åkesson M & Bensch S, 2005.** Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biology Letters*, 1: 17-20.
- Liberg O, Johansson A, Andersen R & Linnell JDC, 1998.** Mating system, mating tactics and the function of male territoriality in roe deer. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 221-256.
- Liedloff A, 1999.** *Mantel: Nonparametric Test Calculator, Version 2.0*. Distributed by the author. School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.
- Linnell JDC & Andersen R, 1995.** Site tenacity in roe deer: Short-term effects of logging. *Wildlife Society Bulletin*, 23: 31-36.
- Linnell JDC, 1994.** *Reproductive tactics and parental care in Norwegian roe deer*. Ph.D. thesis, National University of Ireland.
- Linnell JDC, Wahlström K & Gaillard JM, 1998.** From birth to independence: Birth, growth, neonatal mortality, hiding behaviour and dispersal. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 257-284.
- Lister AM, Grubb P & Sumner SRM, 1998.** Taxonomy, morphology and evolution of European roe deer. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 23-46.
- Litt M & Luty JA, 1989.** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.
- Loft ER & Kie JG, 1988.** Comparison of pellet-group and radio triangulation methods for assessing deer habitat use. *Journal of Wildlife Management*, 52: 524-527.
- Lorenzini R & Lovari S, 2006.** Genetic diversity and phylogeography of the European roe deer: the refuge area theory revisited. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88: 85-100.
- Lorenzini R, Burrini L & Mazzoni della Stella R, 1997.** Biochemical genetic differentiation in some roe deer populations of Tuscany, central Italy. *Italian Journal of Zoology*, 64: 239-244.

- Lorenzini R, Lovari S & Masseti M, 2002.** The rediscovery of the Italian roe deer: genetic differentiation and management implications. *Italian Journal of Zoology*, 69: 367-379.
- Lorenzini R, Patalano M, Apollonio M & Mazzarone V, 1993.** Genetic variability of roe deer *Capreolus capreolus* in Italy: electrophoretic survey on populations of different origin. *Acta Theriologica*, 38: 141-151.
- Lorenzini R, San José C, Braza F & Aragón S, 2003.** Genetic differentiation and phylogeography of roe deer in Spain, as suggested by mitochondrial DNA and microsatellite analysis. *Italian Journal of Zoology*, 70: 89-99.
- Lovari S & San Jose C, 1997.** Wood dispersion affects home range size of female roe deer. *Behavioural Processes*, 40: 239-241.
- Lovari S, Herrero J, Conroy J, Maran T, Giannatos G, Stübbe M, Aulagnier S, Jdeidi T, Masseti M, Nader I, de Smet K & Cuzin F, 2008.** *Capreolus capreolus*. In: IUCN 2010, IUCN Red List of Threatened Species, Version 2010.3. <www.iucnredlist.org>.
- Lowe A, Harris S & Ashton P, 2004.** *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Lucchini V & Randi E, 1998.** Mitochondrial sequence variation and phylogeographical structure of rock partridge (*Alectoris graeca*) populations. *Heredity*, 81: 528-536.
- Luikart G & Cornuet J-M, 1998.** Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12: 228-237.
- Luikart G & England PR, 1999.** Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 253-256.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM & Sherwin WB, 1998.** Distortion of Allele Frequency Distributions Provides a Test for Recent Population Bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89: 238-247.
- Lynch M & Crease TJ, 1990.** The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*, 7: 377-394.
- Mandujano S & Gallina S, 1995.** Comparison of deer censusing methods in tropical dry forest. *Wildlife Society Bulletin*, 23: 180-186.
- Mantel N, 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Marques FFC & Buckland ST, 2004.** Covariate models for the detection function. In Buckland ST, Anderson DR, Burnham KP, Laake JL, Borchers DL & Thomas L (eds), *Advanced Distance Sampling*. Oxford University Press, United Kingdom, pp. 31-47.

- Marques FFC, Buckland ST, Goffin D, Dixon CE, Borchers DL, Mayle BA & Peace AJ, 2001.** Estimating deer abundance from line transect surveys of dung: sika deer in southern Scotland. *Journal of Applied Ecology*, 38: 349-363.
- Marques T, 2009.** Distance sampling: estimating animal density. *Significance*, 6: 136-137.
- Marshall TC, Sunnucks P, Spalton JA, Greth A & Pemberton JM, 1999.** Use of genetic data for conservation management: the case of the Arabian oryx. *Animal Conservation*, 2: 269-278.
- Martínez JG, Carranza J, Fernández-García JL & Sánchez-Prieto CB, 2002.** Genetic variation of red deer populations under hunting exploitation in Southwestern Spain. *Journal of Wildlife Management*, 66: 1273-1282.
- Maruyama T & Fuerst PA, 1985.** Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, 111: 675-689.
- Massei G, Bacon P & Genov PV, 1998.** Fallow deer and wild boar pellet group disappearance in a Mediterranean area. *Journal of Wildlife Management*, 62: 1086-1094.
- Masseti M, 2000.** Note on a Near Eastern relict population of the roe deer *Capreolus capreolus*. *Biogeographia*, 21: 619-623.
- Mayle BA, 1996.** Progress in predictive management of deer populations in British woodlands. *Forest Ecology and Management*, 88: 187-198.
- Mayle BA, Peace AJ & Gill RMA, 1999.** *How many deer? A field guide to estimating deer population size*. Forestry Commission, Edinburg.
- McClelland EK & Naish KA, 2007.** What is the fitness outcome of crossing unrelated fish populations? A meta-analysis and an evaluation of future research directions. *Conservation Genetics*, 8: 397-416.
- McCullagh P & Nelder JA, 1989.** *Generalized Linear Models*. 2nd edn, Chapman and Hall, London.
- McCullough DR, Fisher JK & Ballou JD, 1996.** From bottleneck to metapopulation: recovery of the tule elk in California. In McCullough DR (ed), *Metapopulations and wildlife conservation*. Island Press, Washington DC, pp. 375-403.
- McIntosh R, Burlton FWE & McReddie G, 1995.** Monitoring the density of a roe deer *Capreolus capreolus* population subjected to heavy hunting pressure. *Forest Ecology and Management*, 79: 99-106.
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV Mittermeier RA & Werner TB, 1990.** *Conserving the World's Biological Diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington, DC.

- Melentis JK, 1965.** Die pleistozänen Cerviden des Beckens von Megalopolis im Peloponnes (Griechenland). *Annales geologiques des Pays helleniques*, 16: 1-92.
- Meriggi A, Sotti F, Lamberti P & Gilio N, 2008.** A review of the methods for monitoring roe deer european populations with particular reference to Italy. *Hystrix- Italian Journal of Mammalogy*, 19: 23-40.
- Michaux JR, Magnanou E, Paradis E, Nieberding C & Libois R, 2003.** Mitochondrial phylogeography of the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Molecular Ecology*, 12: 685-697.
- Miller SA & Harley JP, 2001.** *Zoology*. McGraw-Hill Companies, USA.
- Miller SA, Dykes DD & Polesky HF, 1988.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
- Mills LS & Smouse PE, 1994.** Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *The American Naturalist*, 144: 412-431.
- Milosevic-Zlatanovic S, Crnobrnja-Isailovic J, Savic IR & Stamenkovic S, 1997.** Genetic variability of roe deer populations (*Capreolus capreolus* L.) from northeast Yugoslavia. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 62: 339-349.
- Mitchell B & McCowan D, 1979.** *Estimating and Comparing Population Densities of Red Deer Cervus elaphus L. in Concealing Habitats*. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, UK.
- Mitchell B, Rowe JJ, Ratcliffe P & Hinge M, 1985.** Defecation frequency in roe deer (*Capreolus capreolus*) in relation to the accumulation rates of faecal deposits. *Journal of Zoology*, 207: 1-7.
- Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W, Krystufek B, Reijnders PJH, Spitzenberger F, Stubbe M, Thissen JBM, Vohralík V & Zima J, 1999.** *The Atlas of European Mammals*. T&AD Poyser, London.
- Moritz C, 1994.** Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
- Moritz C, Dowling TE & Brown WM, 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.
- Mysterud A, Larsen, PK, Ims RA & Østbye E, 1999.** Habitat selection by roe deer and sheep: does habitat ranking reflect resource availability? *Canadian Journal of Zoology*, 77: 776-783.
- Mysterud A, Bjørnson BH & Østbye E, 1997.** Effects of snow depth on food and habitat selection by roe deer (*Capreolus capreolus*) along an altitudinal gradient in south-central Norway. *Wildlife-Biology*, 3: 27-33.

- Nabata D, Masuda R, Takahashi O & Nagata J, 2004.** Bottleneck effects on the sika deer *Cervus nippon* population in Hokkaido, revealed by ancient DNA analysis. *Zoological Science*, 21: 473-481.
- Nchanji AC & Plumptre AJ, 2001.** Seasonality in elephant dung decay and implications for censusing and population monitoring in south-western Cameroon. *African Journal of Ecology*, 39: 24-32.
- Neff BD & Gross MR, 2001.** Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, 55: 1717-1733.
- Neff DJ, 1968.** The pellet-group count technique for big game trend, census, and distribution: a review. *Journal of Wildlife Management*, 32: 597-614.
- Nei M, 1972.** Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292
- Nei M, 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei M, 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nevo E, Bielek A & Ben Schlomo R, 1984.** The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history consequences. In Mani GS (ed), *Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity*. Springer, Berlin, pp. 13-213.
- Newey S, Bell M, Enthoven S & Thirgood S, 2003.** Can distance sampling and dung plots be used to assess the density of mountain hares *Lepus timidus*? *Wildlife Biology*, 9:185-192.
- Nielsen EK, Olesen CR, Pertoldi C, Gravlund P, Barker JSF, Mucci N, Randi E & Loeschcke V, 2008.** Genetic structure of the Danish red deer (*Cervus elaphus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 95: 688-701.
- Nies G, Zachos FE & Hartl GB, 2005.** The impact of female philopatry on population differentiation in the European roe deer (*Capreolus capreolus*) as revealed by mitochondrial DNA and allozymes. *Mammalian Biology*, 2: 130-134.
- Niethammer G, 1963.** *Die Einbürgerung von Säugetieren und Vögeln in Europa*. Paul Parey Publisher, Hamburg, Berlin.
- Nobis G, 1993.** Archäozoologische Untersuchungen von Tierresten aus dem "Palast des Nestor" bei Pylos in Messenien/SW Peloponnes. *Zeitschrift für Archäologie*, 27: 151-173.
- Nobis G, 1994.** Die Tierreste aus dem antiken Messene - Grabung 1990/91. In Kokabi M & Wahl J, *Beiträge zur Archäozoologie und Prähistorischen Anthropologie*. Stuttgart, pp. 297-313.
- Nobis G, 1997.** Tieropfer aus einem Heroen- und Demeterheiligtum des antiken Messene (SW Peloponnes, Griechenland) - Grabungen 1992 bis 1996. *Tier und Museum*, 5: 97-111.
- Nobis G, 1999.** Archäozoologische Studien an Tierresten aus Eleutherna auf Kreta - Grabungen 1994-1997. *Tier und Museum*, 6: 49-67.

- Norton-Griffiths M, 1978.** *Counting animals*. 2nd edn, African Wildlife Leadership Foundation, Nairobi.
- Nyakaana S, Arctander P & Siegismund HR, 2002.** Population structure of the African savannah elephant inferred from mitochondrial control region sequences and nuclear microsatellite loci. *Heredity*, 89: 90-98.
- Nyström V, Angerbjörn A & Dalén L, 2006.** Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. *Oikos*, 114: 84-94.
- O'Brien PE, Wildt DE, Goldman D, Merrill CR & Bush M, 1983.** The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science*, 221: 459-462.
- Ogutu J, Bhola N, Piepho HP & Reid R, 2006.** Efficiency of strip- and line-transect surveys of African savanna mammals. *Journal of Zoology*, 269: 149-160.
- PadaigaVI & Marma BB, 1979.** Census of roe deer by a pellet-group count. *Soviet Journal of Ecology*, 10: 335-357.
- Paetkau D, Waits LP, Clarkson PL, Craighead L & Strobeck C, 1997.** An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics*, 147: 1943-1957.
- Page RDM & Holmes EC, 1998.** *Molecular Evolution, a phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Palsbøll PJ, Berube M & Allendorf FW, 2007.** Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 11-16.
- Panagopoulou E, Karkanias P, Tsartsidou G, Kotjabopoulou E, Harvati K & Ntinou M, 2002-2004.** Late Pleistocene Archaeological and Fossil Human Evidence from Lakonis Cave, Southern Greece. *Journal of Field Archaeology*, 29: 323-349.
- Papageorgiou NK, 1978.** Use of forest openings by roe deer as shown by pellet group counts. *Journal of Wildlife Management*, 42: 650-654.
- Peakall R & Smouse P, 2006.** *Genalex 6: genetic analysis in Excel*. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pérez-Espona S, Pérez-Barberí FJ, Goodall-Copestake WP, Jiggins CD, Gordon IJ & JM Pemberton, 2009.** Genetic diversity and population structure of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*) populations: a mitochondrial survey. *Heredity*, 102: 199-210.
- Petit RJ, El Mousadik A & Pons O, 1998.** Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12: 844-855.

- Phoca-Cosmetatou N, 2008.** The terrestrial economy of a lake settlement site: the faunal assemblage from the first phase of occupation of Middle Neolithic Dispilio (Kastoria, Greece). *Ανάσκαμμα*, 2: 47-68.
- Piry S, Luikart G & Cornuet JM, 1999.** *Bottleneck*: a computer program for detecting recent reduction in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502-503.
- Plumptre AJ, 2000.** Monitoring mammal populations with line transect techniques in African forests. *Journal of Applied Ecology*, 37: 356-368.
- Poetsch M, Seefeldt S, Maschke M & Lignitz E, 2001.** Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer – possible employment in forensic applications. *Forensic Science International*, 116: 1-8.
- Posada D & Crandall KA, 2001.** Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 37-45.
- Postma E, Van Hooft WF, Van Wieren SE & Van Breukelen L, 2001.** Microsatellite variation in Dutch roe deer (*Capreolus capreolus*) populations. *Netherlands Journal of Zoology*, 51: 85-95.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly PJ, 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Pritchard JK, Wen X & Falush D, 2007.** *Documentation for structure software: version 2.2*. University of Chicago, Chicago, pp. 1-36.
- Prokešová J, Barančeková M & Homolka M, 2006.** Density of red and roe deer and their distribution in relation to different habitat characteristics in a floodplain forest. *Folia Zoologica*, 55: 1-14.
- Pullin AS, 2002.** *Conservation Biology*. Cambridge University Press, UK.
- Putman R, 1996.** *Competition and resource partitioning in temperate ungulate assemblages*. Chapman and Hall, London.
- Putman RJ, 1984.** Facts from feces. *Mammal Review*, 14: 79-97.
- Putman RJ, 1996.** Ungulates in temperate forest ecosystems: Perspectives and recommendations for future research. *Forest Ecology and Management*, 88: 205-214.
- R Development Core Team, 2006.** *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. (<http://www.R-project.org>)
- Rabeder G, 1995.** Jungpleistozäne und frühholozäne Säugetierreste aus der Höhle von Vraona auf Attika, Griechenland. In Symeonidis N & Rabeder G (eds), *Das Jungpleistozän in der Höhle von Vraona auf Attika in Griechenland*, Athens, pp. 47-58.

- Randi E, 2007.** Phylogeography of South European mammals. In Weiss S & Ferrand N (eds), *Phylogeography of Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity*. Springer, Dordrecht, pp. 101-126.
- Randi E, Alves PC, Carranza J, Milosevic-Zlatanovic S, Sfougaris A & Mucci N, 2004.** Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, 13: 3071-3083.
- Randi E, Mucci N, Claro-Hergeta F, Bonnet A & Douzery EJP, 2001.** A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animal Conservation*, 4: 1-11.
- Randi E, Mucci N, Pierpaoli M & Douzery EJP, 1998a.** New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Proceedings of the Royal Society of London*, 265: 793-801.
- Randi E, Pierpaoli M & Danilkin A, 1998b.** Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity*, 80: 429-437.
- Reed DH & Frankham R, 2001.** How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic diversity: a meta-analysis. *Evolution*, 55: 1095-1103.
- Reed DH & Frankham R, 2003.** Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17: 230-237.
- Reyment RA, 1983.** Paleontological aspects of island biogeography: colonization and evolution of mammals on Mediterranean islands. *Oikos*, 41: 299-306.
- Reynolds J, Weir BS & Cockerham CC, 1983.** Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.
- Rice WR, 1989.** Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Røed KH & Midthjell L, 1998.** Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. *Molecular Ecology*, 7: 1773-1776.
- Rollins D, Bryant FC & Montandon R, 1984.** Fecal pH and defecation rates of eight ruminants fed known diets. *Journal of Wildlife Management*, 48: 807-813.
- Romero-Alcaraz E & Ávila JM, 2000.** Effect of elevation and type of habitat on the abundance and diversity of scarabaeoid dung beetle (Scarabaeoidea) assemblages in a Mediterranean area from southern Iberian peninsula. *Zoological Studies*, 39: 351-359.
- Rossiter SJ, Jones G, Ransome RD & Barratt EM, 2000.** Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, 9: 1131-1135.

- Rousset F, 2007.** *Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Rowley-Conwy P & Newton S, 2000.** Late paleolithic and mesolithic animal bones from Theopetra cave - preliminary report. In Kyparissi-Apostolika N, *Theopetra Cave. Twelve Years of Excavation and Research 1987-1998*. Athens, pp. 129-134.
- Royo LJ, Pajares G, Alvarez I, Fernández I & Goyache F, 2007.** Genetic variability and differentiation in Spanish roe deer (*Capreolus capreolus*): a phylogeographic reassessment within the European framework. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 47-61.
- Rueneess EK, Stenseth NC, O'Donoghue M, Boutin S, Ellegren H & Jakobsen KS, 2003.** Ecological and genetic spatial structuring in the Canadian lynx. *Nature*, 425: 69-72.
- Ryder OA, 1986.** Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1: 9-10.
- Saunders DA, Hobbs RJ & Margules CR, 1991.** Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology*, 5: 18-32.
- Schlötterer C, 2000.** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371.
- Schwartz CA, 1982.** The fauna from the early neolithic I phase at Sesklo. In Wijnen M (ed), *The early neolithic I settlement at Sesklo. Analecta Praehistorica Leidensia*, 14: 112, 135-136.
- Schwartz MK, Luikart G & Waples RS, 2007.** Genetic monitoring: a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 25-33.
- Seber GAF, 2002.** *The estimation of animal abundance and related parameters*. Blackburn Press, New Jersey.
- Selkoe K & Toonen R, 2006.** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629.
- Sempéré AJ & Boissin J, 1983.** Neuroendocrine and endocrine control of testicular activity and the antler cycle from birth to adulthood in the male roe deer (*Capreolus capreolus*). In Brown RD (ed), *Antler Development in Cervidae*. Caesar Kleberg Wildlife Research Institute, Kingsville, Texas, pp. 396-415.
- Sempéré AJ, Mauget R & Mauget C, 1998.** Reproductive physiology of roe deer. In Andersen R, Duncan P & Linnell J (eds), *The European Roe Deer: The Biology of Success*. Scandinavian University Press, Oslo, pp. 161-188.
- Sempéré AJ, Sokolov VE & Danilkin A, 1996.** *Capreolus capreolus*. *Mammalian Species*, 538: 1-9.
- Sieber J, 1994.** Field roe deer in winter: Is there an optimal group size? *Proceedings of the International Union of Game Biologists Congress*, 21: 283-286.

- Simberloff D, 1988.** The contribution of population and community biology to conservation science. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19: 473-511.
- Skog A, Zachos FE, Rueness EK, Feulner PGD, Mysterud A, Langvatn R, Lorenzini R, Hmwe SS, Lehoczky I, Hartl GB, Stenseth NC & Jakobsen KS, 2009.** Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Journal of Biogeography*, 36: 66-77.
- Slate J, Kruuk LE, Marshall TC, Pemberton JM & Clutton-Brock TH, 2000.** Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proceedings of the Royal Society of London B*, 267: 1657-1662.
- Slatkin M, 1985.** Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 393-430.
- Slatkin M, 1993.** Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, 47: 264-279.
- Slatkin M, 1994.** Gene flow and population structure. In Real L (ed), *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, USA, pp. 3-17.
- Sloan RE & Duncan MA, 1978.** Zooarchaeology of Nichoria. In Rapp G & Aschenbrenner SE, *Excavations at Nichoria in southwest Greece. I. Site, environs and techniques*. Minneapolis, pp. 60-77.
- Smart JCR, Ward AI & White PCL, 2004.** Monitoring woodland deer populations in the UK: an imprecise science. *Mammal Review*, 34: 99-114.
- Sokal R & Rohlf F, 1995.** *Biometry: the principles and practices of statistics in biological research*, 3rd edn. WH Freeman and Co., New York.
- Sokal RR & Jacquez GM, 1991.** Testing inferences about microevolutionary processes by means of spatial autocorrelation. *Evolution*, 45: 152-168.
- Sokolov VE & Gromov VS, 1990.** The contemporary ideas on roe deer (*Capreolus* Gray, 1821) systematization: Morphological, ethological and hybridological analysis. *Mammalia*, 54: 431-444.
- Sommer RS & Nadachowski A, 2006.** Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review*, 36: 251-265.
- Sommer RS, Fahlke JM, Schmölcke U, Benecke N & Zachos FE, 2009.** Quaternary history of the European roe deer *Capreolus capreolus*. *Mammal Review*, 39: 1-16.
- Soulé ME, 1985.** What is conservation biology? A new synthetic discipline addresses the dynamics and problems of perturbed species, communities, and ecosystems. *BioScience*, 35: 727-734.
- Spielman D, Brook BW & Frankham R, 2004.** Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101: 15261-15264.

- Staines BW & Ratcliffe PR, 1987.** Estimating the abundance of red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) and their current status in Great Britain. *Symposia of the Zoological Society of London*, 58: 131-152.
- Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou KA, Giacometti M, Haerer G, Djan M, Vapa L, Vukovic M, Tvrtkovic N, Sert H, Alves PC, Mamuris Z, 2009.** Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography*, 36: 515-528.
- Stankowich T, 2008.** Ungulate flight responses to human disturbance: a review and meta-analysis. *Biological Conservation*, 141: 2159-2173.
- Stanzel M, 1991.** *Die Tierreste aus dem Artemis-/Apollon-Heiligtum bei Kalapodi in Böotien/Griechenland.* Ph.D. thesis. Universität München.
- Storfer A, 1999.** Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation*, 87: 173-180.
- Sunnucks P, 2000.** Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG & Cosson JF, 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.
- Tachida H & Iizuka M, 1992.** Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics*, 131: 471-478.
- Tajima F, 1983.** Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437-460.
- Takahata N & Palumbi SR, 1985.** Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics*, 109: 441-457.
- Takezaki N & Nei M, 1996.** Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.
- Tamura K & Nei M, 1993.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S, 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Tautz D, 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Taylor RH & Williams RM, 1956.** The use of pellet counts for estimating the density of populations of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L). *New Zealand Journal of Science and Technology*, 38: 236-256.

- Tellería JL & Sáez-Royuela C, 1984.** The large mammals of central Spain - An introductory view. *Mammal Review*, 14: 51-56.
- Tellería JL & Virgós E, 1997.** Distribution of an increasing roe deer population in a fragmented Mediterranean landscape. *Ecography*, 20: 247-252.
- Theuerkauf J, Rouys S & Jędrzejewski W, 2008.** Detectability and disappearance of ungulate and hare faeces in a European temperate forest. *Annales Zoologici Fennici*, 45: 73-80.
- Thomas L, Buckland ST, Burnham KP, Anderson DR, Laake JL, Borchers DL & Strindberg S, 2002.** Distance sampling. In El-Shaarawi AH & Piegorsch WW (eds), *Encyclopedia of environmetrics*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 544-552.
- Thomas L, Laake JL, Rexstad E, Strindberg S, Marques FFC, Buckland ST, Borchers DL, Anderson DR, Burnham KP, Burt ML, Hedley SL, Pollard, JH, Bishop JRB & Marques TA, 2006.** *Distance 5.0. Release 2*. Research Unit for Wildlife Population Assessment, University of St. Andrews, St. Andrews, UK. (<http://www.ruwpa.st-and.ac.uk/distance/>)
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ, 1994.** *CLUSTAL W*: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Thulin C-G, 2006.** Microsatellite investigation of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Scandinavia reveals genetic differentiation of a Baltic Sea Island population. *European Journal of Wildlife Research*, 52: 228-235.
- Tiedemann R, von Kistowski KG & Noer H, 1999.** On sex-specific dispersal and mating tactics in the common eider *Somateria mollissima* as inferred from the genetic structure of breeding colonies. *Behaviour*, 136: 1145-1155.
- Tixier H & Duncan P, 1996.** Are European roe deer browsers? A review of variations in the composition of their diets. *Revue d'Ecologie (Terre Vie)*, 51: 3-17.
- Trakolis D, Platis P & Meliadis I, 2000.** Biodiversity and conservation actions on mount Voras, Greece. *Environmental Management*, 26: 145-151.
- Tufto J, Andersen R & Linnell JDC, 1996.** Habitat use and ecological correlates of home range size in a small cervid: The roe deer. *Journal of Animal Ecology*, 65: 715-724.
- Tzedakis PC, 2004.** The Balkan as prime glacial refugial territory of European temperate trees. In Griffiths HI, Kryštufek B & Reed JM (eds), *Balkan Biodiversity – Pattern and Process in the European Hotspot*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 49-68.
- van Andel TH & Tzedakis PC, 1996.** Palaeolithic landscapes of Europe and environs, 150 000–25 000 years ago: an overview. *Quaternary Science Reviews*, 15: 481-500.

- van Schaik CP, Wich SA, Utami SS & Odom K, 2005.** A simple alternative to line transects of nests for estimating orangutan densities. *Primates*, 46: 249-254.
- Vernesi C, Pecchioli E, Caramelli D, Tiedemann R, Randi E & Bertorelle G, 2002.** The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology*, 11: 1285-1297.
- Vial L, Maudet C & Luikart G, 2003.** Thirty-four polymorphic microsatellites for European roe deer. *Molecular Ecology Notes*, 3: 523-527.
- Voultsiadou E & Tatolas A, 2005.** The fauna of Greece and adjacent areas in the Age of Homer: evidence from the first written documents of Greek literature. *Journal of Biogeography*, 32: 1875-1882.
- Wahlström LK & Liberg O, 1995.** Patterns of dispersal and seasonal migration in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Zoology*, 235: 455-467.
- Walsh PD, White LJT, Mbina C, Idiata D, Mihindou Y, Maisels F & Thibault M, 2001.** Estimates of forest elephant abundance: projecting the relationship between precision and effort. *Journal of Applied Ecology*, 38: 217-228.
- Wang M & Schreiber A, 2001.** The impact of habitat fragmentation and social structure on the population genetics of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in Central Europe. *Heredity*, 86: 703-715.
- Wang M, Lang G & Schreiber A, 2002.** Temporal shifts of DNA-microsatellite allele profiles in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) within three decades. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 40: 232-236.
- Waples RS & Gaggiotti OE, 2006.** What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15: 1419-1439.
- Waples RS, 1991.** Pacific salmon, *Oncorhynchus spp.*, and the definition of 'species' under the endangered species act. *Marine Fisheries Review*, 53: 11-22.
- Waples RS, 1995.** Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. In Nielsen JL Powers GA (eds), *Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique Units in Population Conservation*. Symposium 17, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 8-27.
- Watson J, 1979.** Faunal remains, Appendix 3. In Ridley C & Wardle KA (eds), *Rescue excavations at Servia, 1971-1973, a preliminary report*. *Annual of the British School at Athens*, 74: 228-229.
- Watterson G, 1975.** On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7: 256-276.

- Watterson GA, 1984.** Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology*, 26: 387-407.
- Webb T & Bartlein PJ, 1992.** Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23: 141-173.
- Webbon CC, Baker PJ & Harris S, 2004.** Faecal density counts for monitoring changes in red fox numbers in rural Britain. *Journal of Applied Ecology*, 41: 768-779.
- Weber JL & May PE, 1989.** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396
- Weir BS & Cockerham CC, 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Weir BS, 1996.** *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Welch D, Staines BW, Catt DC & Scott D, 1990.** Habitat usage by red (*Cervus elaphus*) and roe (*Capreolus capreolus*) deer in a Scottish Sitka spruce plantation. *Journal of Zoology*, 221: 453-476.
- Whitehouse AM & Harley EH, 2001.** Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 10: 2139-2149.
- Wiehler J & Tiedemann R, 1998.** Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control region. In: Hartl GB, Markowski J, eds. Ecological genetics in mammals. *Acta Theriologica*, (Suppl. 5): 187-197.
- Wilkens B, 1996.** The Fauna from Italian Excavations on Crete. In Reese DS, *The Pleistocene and Holocene Fauna of Crete and Its First Settlers*. Prehistory Press, Madison, pp. 241-262.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD & Stoneking M, 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375-400.
- Wilson PJ, Grewal S, Rodgers A, Rempel R, Saquet J, Hristienko H, Burrows F, Peterson R, White BN, 2003.** Genetic variation and population structure of moose (*Alces alces*) at neutral and functional loci. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 670-683.
- Wren JD, Forgacs E, Fondon JW, Pertsevlidis A, Cheng YS, Gallardo T, Williams RS, Shohet RV, Minna JD & Garner HR, 2000.** Repeat polymorphisms within gene regions: Phenotypic and evolutionary implications. *American Journal of Human Genetics*, 67: 345-356.
- Wright S, 1931.** Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright S, 1943.** Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.
- Wright S, 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 1: 323-334.

- Wright S, 1965.** The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Xia X & Xie Z, 2001.** DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373.
- Xiao C-T, Zhang M-H, Fu Y & Koh H-S, 2007.** Mitochondrial DNA distinction of northeastern China roe deer, Siberian roe deer, and European roe deer, to clarify the taxonomic status of northeastern China roe deer. *Biochemical Genetics*, 45: 93-102.
- Yannouli E, 1997.** Dimitra. A Neolithic and Late Bronze Age Village in Northern Greece: the Fauna Remains. Στο Γραμμένος ΔΒ, *Νεολιθική Μακεδονία*. Αθήνα, σελ. 101-127.
- Zachos FE, Althoff CV, Steynitz Y, Eckert I & Hartl GB, 2007.** Genetic analysis of an isolated red deer (*Cervus elaphus*) population showing signs of inbreeding depression. *European Journal of Wildlife Research*, 53: 61-67.
- Zachos FE, Hmwe SS & Hartl GB, 2006.** Biochemical and DNA markers yield strikingly different results regarding variability and differentiation of roe deer (*Capreolus capreolus*, Artiodactyla: Cervidae) populations from northern Germany. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44: 167-174.
- Zagwijn WH, 1992.** Migration of vegetation during the quaternary in Europe. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, 153: 9-20.
- Zhang DX & Hewitt M, 2003.** Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563-584.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Primack R, Διαμαντόπουλος Γ, Αριανούτσου Μ, Δανηλίδης Δ, Βαλάκος Σ, Παφίλης Π & Παντής ΙΔ, 2007.** Διατήρηση και προστασία της βιοποικιλότητας. Εκδόσεις «αεί», Αθήνα.
- Αντωνίου Α, 2008.** Διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας του ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus Pallas, 1778*) στη Βαλκανική. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- Βαβαλέκας Κ, 1998.** Θησαυροί του Άγιου Όρους - Η πανίδα του Αγίου Όρους. Ιερά Κοινότης Άγιου Όρους Άθω και Οργανισμός Πολιτιστικής Πρωτεύουσας της Ευρώπης «Θεσσαλονίκη 97», Θεσσαλονίκη, σελ. 77-96.
- Βοσνιάκου Α, Λαλιώτης Β, Παπαγεωργίου Ν, Παραλυκίδης Ν & Τριγυράκης Ι, 1997.** Οικολογία και αναπαραγωγή του ζαρκαδιού (*Capreolus capreolus*). *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα*, 8 (1): 79-86.
- Γιαννακόπουλος Α & Τσαπάρης Δ, 2008.** Υποέργο Ζαρκάδι (*Capreolus capreolus*). Στο Μερτζιάνης Γ (επιμ.), *Τελική έκθεση -Πρόγραμμα παρακολούθησης (monitoring) της πανίδας του Εθνικού Πάρκου Βόρειας Πίνδου*, ΜΚΟ «Καλλιστώ» (φορέας υλοποίησης), Φορέας Διαχείρισης Εθνικού Πάρκου Βόρειας Πίνδου (χρηματοδότηση), Θεσσαλονίκη.
- Γιαννούλη Ε, 2002.** Ημερη και άγρια πανίδα από το νεολιθικό οικισμό στη Σταυρούπολη Θεσσαλονίκης. Στο Γραμμένος ΔΒ & Κώτσος Σ, *Σωστικές ανασκαφές στο νεολιθικό οικισμό Σταυρούπολης Θεσσαλονίκης*. Αρχαιολογικό Ινστιτούτο Βορείου Ελλάδος, Θεσσαλονίκη.
- Γιαννούλη Ε, 2004.** Σταυρούπολη Θεσσαλονίκης: νεότερα δεδομένα από την αρχαιοπανίδα του νεολιθικού οικισμού. Στο Γραμμένος ΔΒ & Κώτσος Σ, *Σωστικές ανασκαφές στο νεολιθικό οικισμό Σταυρούπολης Θεσσαλονίκης. Μέρος ΙΙ (1998-2003)*. Αρχαιολογικό Ινστιτούτο Βορείου Ελλάδος, Θεσσαλονίκη, σελ. 489-526.
- Ιωαννίδης Γ & Μπούσμπουρας, 1992.** *Dama dama* (πλατόνι). Στο Καρανδεινός Μ & Λεγάκις Α (επιμ.), *Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Σπονδυλοζώων της Ελλάδας*. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ. 289-290.
- Καρανδεινός ΜΓ, 2007.** Ποσοτικές οικολογικές μέθοδοι - Από τη θεωρία στην πράξη. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Μαυροματάης Γ, 1978.** Το βιοκλίμα της Ελλάδος. Σχέσεις κλίματος και φυσικής βλαστήσεως, βιοκλιματικοί χάρτες. Ίδρυμα Δασικών Ερευνών Αθηνών.
- Μερτζανίδου Δ, 2009.** *Dama dama* (πλατόνι). Στο Λεγάκις Α & Μαραγκού Π (επιμ.), *Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας*. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ. 378-379.

- Μερτζανίδου Δ, 2010.** Οικολογία και γενετική ποικιλότητα του πλατωνιού (*Dama dama*) στη Ρόδο. Διδακτορική διατριβή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας.
- Παράσχη Λ, 1992.** *Capreolus capreolus* (ζαρκάδι). Στο Καρανδεινός Μ & Λεγάκις Α (επιμ.), *Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Σπονδυλοζώων της Ελλάδας*. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ. 290-291.
- Ποϊραζίδης Κ & Παράσχη Λ, 1992.** *Cervus elaphus* (ελάφι). Στο Καρανδεινός Μ & Λεγάκις Α (επιμ.), *Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Σπονδυλοζώων της Ελλάδας*. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ. 270-271.
- Σορδινάς Α, 1997.** Παλαιολιθική έρευνα στον Ιόνιο χώρο κατά τη δεκαετία του 1960. *Αρχαιολογία & Τέχνες*, 62.
- Σταμούλη Χ, 2008.** Εκτίμηση του μεγέθους ενός πληθυσμού ζαρκαδιού (*Capreolus capreolus*). Διπλωματική εργασία, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Ζωολογίας & Θαλάσσιας Βιολογίας.
- Σφουγγάρης Α & Γιαννακόπουλος Α, 2005.** Σχέσεις πληθυσμιακής πυκνότητας και παραμέτρων του ενδιαίτηματος για τρία οπληφόρα (ζαρκάδι, αγριόχοιρο, αγριόγιδο) στην Ήπειρο. *Πρακτικά 2^ο Πανελληνίου Συνεδρίου Οικολογίας, (Ενωσης Ελλήνων Οικολόγων - Ελληνικής Ζωολογικής Εταιρείας), Μυτιλήνη 2004*, ΕΕΟ-Πανεπιστήμιο Αιγαίου, σελ. 226-232.
- Σφουγγάρης Α & Τσαπάρης Δ, 2009.** *Capreolus capreolus* (ζαρκάδι). Στο Λεγάκις Α & Μαραγκού Π (επιμ.), *Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας*. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ. 390-392.
- Σφουγγάρης Α, 2009.** *Cervus elaphus* (ελάφι). Στο Λεγάκις Α & Μαραγκού Π (επιμ.), *Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας*. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ. 363-364.
- Σωτηρόπουλος Κ, 2004.** Γενετική και μορφολογική ποικιλότητα των ειδών του γένους *Triturus* (*Αμφίβια, Ουρόδηλα*) στον ελλαδικό χώρο: ιστορικές και οικολογικές ερμηνείες. Διδακτορική διατριβή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας.
- Τρανταλίδου Κ, 1993.** Παρατηρήσεις σε μικρά ανασκαφικά σύνολα: το οστεολογικό υλικό της Καλογερόβρυσης. Στο Σάμψων Α, *Καλογερόβρυση. Ένας οικισμός της Πρώιμης και της Μέσης Χαλκοκρατίας στα Φύλλα της Εύβοιας*. Αθήνα, σελ. 163-168.
- Τσαπάρης Δ & Λεγάκις Α, 2004.** Εκτίμηση του πληθυσμού του ζαρκαδιού στην περιοχή Κεντρικού Ζαγορίου, προσδιορισμός των βιοτόπων του και σύνταξη διαχειριστικών προτάσεων για τη διατήρησή του. *Τελική έκθεση -Πρόγραμμα «Προστασία Περιβάλλοντος και Βιώσιμη Ανάπτυξη»*, Ζωολογικό Μουσείο Πανεπιστημίου Αθηνών (φορέας υλοποίησης), ΥΠΕΧΩΔΕ & Δήμος Κεντρικού Ζαγορίου (χρηματοδότηση), Αθήνα, σελ 1-21.

Χαμηλάκης Γ, 1998. Στοιχεία για την πρωτομινωική κτηνοτροφία: Ζωοαρχαιολογικές μαρτυρίες από το σπήλαιο Σεντόνη Ζωνιανών Κρήτης. *Πρακτικά Α' Πανελλήνιου Σπηλαιολογικού Συνεδρίου «Άνθρωπος και Σπηλαιοπεριβάλλον»*, Αθήνα, σελ. 85-96.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακες

Πίνακας 1 : Ζωοαρχαιολογικά ευρήματα ζαρκαδιού στην Ελλάδα.

	Τοποθεσία	Περιοχή	Περίοδος	Χρονολόγηση	Αναφορές
1	Σπήλαιο Λακωνίς	Γύθειο	ανώτερο πλειστόκαινο	≈ 42 kyears BP	Panagopoulou <i>et al.</i> 2004
2	Καστρίτσα	Ιωάννινα	ανώτερο πλειστόκαινο	21-20 kyears BP	Bailey <i>et al.</i> 1983, Bailey & Gamble 1990
3	Κοιλάδα Πηγειού	Λάρισα	ανώτερο πλειστόκαινο		Athanasίου 2002
4	Μεγαλόπολη	Αρκαδία	πλειστόκαινο	>11 kyears BP	Melentis 1965
5	Γράβα Αγ. Ματθαίου	Κέρκυρα	ανώτερη παλαιολιθική	≈ 35-11 kyears BP	Σορδίνας 1997
6	Βραυρώνα	Αττική	μεσολιθική, νεολιθική	≈ 11-7 kyears BP	Rabeder 1995
7	Σπήλαιο Θεόπετρας	Τρίκαλα	ανώτ. παλαιολιθική, μεσολιθική, νεολιθική	σε πολλά στρώματα	Hamilakis 2000, Rowley-Conwy & Newton 2000
8	Σέρβια	Κοζάνη	αρχική -νεώτερη νεολιθική	≈ 8,5-6,5 kyears BP	Watson 1979
9	Σταυρούπολη	Θεσσαλονίκη	μέση-νεώτερη νεολιθική		Γιαννούλη 2002,2004
10	Δήμητρα	Σέρρες	μέση-νεώτερη νεολιθική		Yannouli 1997
11	Ντικίλι Τας Φίλιπποι	Καβάλα	μέση-νεώτερη νεολιθική		Julien 1992
12	Μαγούλα Ζάρκου	Τρίκαλα	μέση νεολιθική- πρώιμη εποχή χαλκού		Becker 1991
13	Σιταγροί	Δράμα	μέση νεολιθική - πρωτοελλαδική II	≈ 7-5 kyears BP	Hubbard 1995, Bökönyi, & Janossy 1986
14	Αχχίλειο	Φάρσαλα	πρώιμη νεολιθική		Bökönyi 1989
15	Μακρόγυαλος	Περία	ύστερη νεολιθική		Collins & Healstead 1999
16	Σέσκλο	Μαγνησία	πρώιμη νεολιθική		Schwartz 1981
17	Δισπηλιό	Καστοριά	νεώτερη νεολιθική	5500-4300 π.Χ.	Phoca-Cosmetatou 2008
18	Παράδεισος	Καβάλα	νεώτερη νεολιθική-εποχή χαλκού		Larje 1987
19	Πευκάκια	Μαγνησία	νεολιθική		Amberger 1979
20	Μαγούλα Άργισσας	Λάρισα	νεολιθική-μέση εποχή χαλκού		Boessneck 1962
21	Αγ. Μάμας	Χαλκιδική	μέση εποχή χαλκού		Becker 1996
22	Σπήλαιο Σεντόνης	Ζωνιανά	πρωτομινωϊκή	3500-2200 π.Χ.	Hamilakis 1996, Χαμηλάκης 1998
23	Πρινιάς	Ηράκλειο	υστερομινωϊκή III		Wilkens 1996
24	Καλογερόβρυση	Φύλλα Ευβοίας	πρωτοελλαδική-μεσοελλαδική	≈ 3200-1600 π.Χ	Τρανταλίδου 1993
25	Λέρνα	Αργολίδα	πρωτοελλαδική III-μεσοελλαδική	≈ 2200-1600 π.Χ	Gejvall 1969
26	Νιχώρια	Μεσσηνία	μεσοελλαδική-υστεροελλαδική III	2000-1100 π.Χ.	Sloan & Duncan 1978
27	Καλαπόδι	Βοιωτία	υστεροελλαδική III	1400-1100 π.Χ.	Stanzel 1991
28	Τίρυνθα	Αργολίδα	υστεροελλαδική II		Driesch & Boessneck 1990
29	Αγ. Κωνσταντίνος	Μέθανα	μυκηναϊκή		Hamilakis 2003

Πίνακας 1 : Ζωοαρχαιολογικά ευρήματα ζαρκαδιού στην Ελλάδα. [συνέχεια]

	Τοποθεσία	Περιοχή	Περίοδος	Χρονολόγηση	Αναφορές
30	Παλάτι Νέστορα	Πύλος		1500-1200 π.Χ.	Nobis 1993
31	Καστανάς	Θεσσαλονίκη		2000-200 π.Χ. μέγ. 1200-1000π.Χ	Becker 1986
32	Μαυρομάτι	Μεσσηνία		800-100 π.Χ.	Nobis 1997
33	Ελεύθερνα	Ρέθυμνο	αρχαϊκή-ρωμαϊκή	800 π.Χ.- 400 μ.Χ.	Nobis 1999
34	Μεσοήγη	Μεσσηνία	κλασσική-ρωμαϊκή	300 π.Χ.- 200 μ.Χ.	Nobis 1994
35	Καβείριο ιερό	Θήβα	κλασσική - ρωμαϊκή	300 π.Χ.- 400 μ.Χ.	Boessneck 1973
36	Γόρτυς	Ηράκλειο		500-700 μ.Χ.	Wilkens 1996

Πίνακας 2 : Προέλευση των ζαρκαδιών του εκτροφείου Καλαβρύτων

Πηγή: Δασαρχείο Καλαβρύτων

ΕΚΠΑΖ: Ελληνικό Κέντρο Περιθαλψής Αγριων Ζώων

Εισαγωγές	Ημερομηνία	Προέλευση	♂	♀	Σύνολο ατόμων
1	12/1984	Δασαρχείο Κοζάνης	1	2	3
2	2/1985	Δασαρχείο Κοζάνης	1	2	3
3	3/1988	Δασαρχείο Αλεξανδρούπολης	5	5	10
4	11/1994	Δασαρχείο Αμφιλοχίας		1	1
5	5/1997	ΕΚΠΑΖ	1		1
Συνολικά			8	10	18

Πίνακας 3 : Συγκεντρωτικός πίνακας των δειγμάτων που συλλέχθηκαν για τις γενετικές αναλύσεις

ΕΚΠ= Ελεγχόμενη Κνηγετική περιοχή,

?= δεν υπάρχουν πληροφορίες, ♀= θηλυκό, ♂= αρσενικό

A/A	Κωδικός Δειγματος	Ημερομηνία Συλλογής	Περιοχή	Τοποθεσία	N	E	Φύλο	Είδος ιστού	Απομόνωση DNA	Απλότυπος mtDNA
1	P1	8/11/2003	ΕΚΠ Παρνασσίδας	Καστριώτισσα	38°40' έως 38°44'	22°11' έως 22°22'	♀	Μυς	+	GR13
2	P2	12/10/2003		Γ στρώμα Λάκος Θοδωρή			♂	Μυς	+	GR12
3	P3	31/10/2003		B12 στρώμα			♂	Μυς	+	GR13
4	P4	19/10/2005		B12 στρώμα			♀	Μυς	+	GR12
5	P5	5/11/2005		Γ2 στρώμα			♀	Μυς	+	GR13
6	P6	4/11/2006		Γ2 στρώμα Σπηλιά Πανουργιά			♂	Μυς	+	GR13
7	P7	4/11/2006		Πολλά Λειβάδια Πανουργιάς			♂	Μυς	+	GR13
8	P8	5/11/2006		Γ2 στρώμα Κρύα Βρύση			♀	Μυς	+	GR13
9	P9	27/10/2006		Πανουργιάς (πίσω από Ράχες)			♀	Μυς	+	GR13
10	P10	6/10/2006		Γ2 στρώμα Πανουργιάς			♂	Μυς	+	GR13
11	P11	26/11/2006		Γ2 στρώμα Καβαλάρια Πανουργιά			♀	Μυς	+	GR13
12	P12	9/11/2006		Καλοσκοπή			♀	Ήπαρ	+	GR13
13	P13	7/10/'2006		Καστριώτισσα			♂	Μυς	+	GR13
14	P14	30/11/2006		Α6 στρώμα Λιθαρόσυρμα			♀	Μυς	+	GR13
15	P15	27/10/2006		Στρώμη- Στέρνα			♀	Μυς	+	GR13
16	P16	7/10/2006		Α6 στρώμα Κοτρώνια			♀	Μυς	+	GR13
17	P17	19/11/2006		Πυργάκι			♂	Μυς	+	GR13
18	P18	27/10/2006		Άγιος Δημήτριος			?	Μυς	+	GR13
19	K1	23/10/2006	ΕΚΠ Κόζιακα	Μονή Βυτουμά	39°38'	21°34'	?	Μυς	+	GR14
20	K2	24/10/2006		Μονή Βυτουμά			♂	Μυς	+	GR15
21	K3	23/10/2006		Μονή Βυτουμά			?	Μυς	+	GR7

Πίνακας 3 : Συνέχεια

A/A	Κωδικός Δειγματος	Ημερομηνία Συλλογής	Περιοχή	Τοποθεσία	N	E	Φύλο	Είδος ιστού	Απομόνωση DNA	Απλότυπος mtDNA
22	O1	26/10/2003	ΕΚΠ Οσσας	Παλαιόμυλος Ανατολής	39°44' έως 39°52'	22°38' έως 22°50'	♂	Ήπαρ	+	GR9
23	O2	25/10/2003		Παλαιόμυλος Ανατολής			♂	Μυς	+	GR10
24	O3	25/10/2003		Σουποτό Στόμιο			♀	Ήπαρ	+	GR9
25	O4	27/11/2004		Σταυρός Καρίτσα			♀	Μυς	+	-
26	O5	10/11/2004		Γομαρόλακα Καρίτσα			♀	Μυς	+	GR9
27	O6	10/11/2004		Μελιβοία Πύργος			♂	Ήπαρ	+	GR9
28	O7	6/11/2005		Γομαρόλακα Καρίτσα			♀	Μυς	+	GR9
29	O8	13/11/2005		Ανατολή			?	Μυς	+	GR10
30	O9	9/11/2006		Βραχώματα Ανατολής			♀	Μυς	+	GR10
31	O10	?/2006		Στόμιο			?	Ήπαρ	+	GR9
32	O11	?/2006		Στόμιο			?	Ήπαρ	+	GR9
33	O12	7/10/2006		Ανατολή			♂	Ήπαρ	+	GR10
34	O13	19/10/2006		Ανατολή			♀	Μυς	+	GR10
35	O14	7/10/2006		Ανατολή			♀	Μυς	+	GR9
36	O15	7/10/2006		Ανατολή			♂	Ήπαρ	+	GR10
37	O16	29/10/2006		Μπελμάς Ανατολή			♂	Ήπαρ	+	GR9
38	O17	19/11/2006		Τρία Πηγάδια			♀	Ήπαρ	+	GR10
39	O18	11/11/2006		Τρία Πηγάδια			♀	Μυς	+	GR11
40	O19	19/10/2006		Βραχώματα Ανατολής			♂	Ήπαρ	+	GR10
41	O20	19/10/2006		Βραχώματα Ανατολής			?	Μυς	+	GR9

Πίνακας 3 : Συνέχεια

A/A	Κωδικός Δείγματος	Ημερομηνία Συλλογής	Περιοχή	Τοποθεσία	N	E	Φύλο	Είδος ιοτού	Απομόνωση DNA	Απλότυπος mtDNA
42	L1	2/12/2005	ΕΚΠ Λαϊλιά Σερρών	Αχλαδοχώρι	41°10' έως 41°17'	23°25' έως 23°40'	♀	Μυς	+	GR1
43	L2	2/12/2005		Καρυδοχώρι			♀	Μυς	+	GR1
44	L3	18/11/2005		Βροντού			♂	Μυς + Ήπαρ	+	GR1
45	L4	11/11/2005		Πολύβρυσο Σιδηροκάστρου			♂	Μυς + Ήπαρ	+	GR2
46	L5	11/11/2005		Βροντού			♂	Μυς + Ήπαρ	+	GR1
47	L6	19/11/2005		Πολύβρυσο Σιδηροκάστρου			♀	Μυς + Ήπαρ	+	GR3
48	L7	11/11/2005		Ξηρότοπος			♀	Μυς	+	GR1
49	L8	2/12/2005		Βροντού			♂	Μυς	+	GR2
50	L9	4/11/2005		Βροντού			♂	Μυς	+	GR2
51	L10	18/11/2005		Βροντού			♂	Μυς + Ήπαρ	+	GR1
52	L11	25/11/2005		Ξηρότοπος			♂	Μυς	+	GR1
53	L12	19/11/2005		Καπνόφυτο			♂	Μυς + Ήπαρ	+	GR4
54	L13	11/11/2005		Αχλαδοχώρι			♀	Μυς + Ήπαρ	-	-
55	L14	16/12/2005		Βροντού			♂	Μυς + Ήπαρ	-	-
56	L15	16/12/2005		Βροντού			♂	Ήπαρ	+	GR5
57	L16	9/12/2005		Ξηρότοπος (ή Ξηροπόταμος)			♂	Ήπαρ	-	-
58	L17	9/12/2005		Ξηρότοπος (ή Ξηροπόταμος)			♀	Ήπαρ	+	GR1
59	L18	16/11/2006		Καρυδοχώρι			♂	Ήπαρ	+	GR1
60	L19	27/10/2006		Ορεινή			♂	Μυς	+	GR1
61	L20	27/10/2006		Ορεινή			♂	Μυς	+	GR6
62	L21	27/10/2006		Ορεινή			♀	Μυς	+	GR7
63	L22	21/10/2006		Σαργιάρ Ορεινή			♀	Μυς + Ήπαρ	+	GR1
64	L23	27/10/2006		Ορεινή			♀	Μυς	-	-
65	L24	27/10/2006		Ορεινή			♀	Μυς	+	-

Πίνακας 3 : Συνέχεια

A/A	Κωδικός Δειγματος	Ημερομηνία Συλλογής	Περιοχή	Τοποθεσία	N	E	Φύλο	Είδος ιοτού	Απομόνωση DNA	Απλότυπος mtDNA
66	Z1	29/11/2003	Ζαγόρι	Φραγκάδες	39°47' έως 39°55'	20°41' έως 20°54'	?	Τρίχες	+	GR16
67	Z2	20/10/2003		Δίλοφο			♂	Κέρατο	+	GR17
68	Z3	20/11/2003		Δίλοφο Πετρίτσια			?	Κόπρανα	-	-
69	Z4	10/4/2004		Δικορφο			?	Κόπρανα	-	-
70	Z5	5/1/2005		Ριζιανά			♂	Κέρατο	+	GR15
71	Z6	2/9/2005		Μανασσή			?	Οστό κρανίου	-	-
72	Z7	2/9/2005		Μανασσή			?	Τρίχες	+	GR15
73	Z8	9/9/2005		Μανασσή			?	Δέρμα	+	GR15
74	Z9	28/12/2005		Φραγκάδες			♂	Κέρατο	+	GR17
75	Z10	31/12/2005		Δίλοφο			♂	Κέρατο	+	GR15
76	Z11	27/12/2006		Φραγκάδες			?	Τρίχες	+	GR15
77	Z12	28/12/2006		?			?	Τρίχες	+	GR15
78	Z13	16/1/2007		Ελάτη			♂	Κέρατο	+	GR15
79	Z14	16/1/2007		Ελάτη			?	Δέρμα	+	GR15
80	Z15	?/2006		Μανασσή			?	Τρίχες	+	GR17
81	Z16	29/12/2007		Δίλοφο			♂	Κέρατο	+	GR18
82	Z17	31/12/2007		Ελαφότοπος			?	Τρίχες	+	GR19
83	AP1	23/12/2006	Άνω Πωγώνι (Κόνιτσα)	Κεφαλόβρυσο	40°00'	20°31'	♂	Κέρατο	+	GR16
84	E1	2/9/2006	Έβρος (Ανατολική Ροδόπη)	Αισίμη	41°02'	25°55'	♂	Κέρατο	+	GR8
85	T1	18/9/2007	Τζουμέρκα (Άρτα)	Ροδαυγή	39°19'	21°01'	♂	Κέρατο	+	GR15

Πίνακας 3 : Συνέχεια

A/A	Κωδικός Δείγματος	Ημερομηνία Συλλογής	Περιοχή	Υποπεριοχή	N	E	Φύλο	Είδος ιστού	Απομόνωση DNA	Απλότυπος mtDNA
86	V1	4/4/2006	Καλάβρυτα	Εκτροφείο Σουβάρδου	38°03' έως 38°04'	22°09' έως 22°10'	♂	Κέρατο	+	GR20
87	V2	6/4/2006					♂	Κέρατο	+	GR21
88	V3	2/6/2006					♂	Κέρατο	+	GR20
89	V4	3/5/2007					♂	Κέρατο	+	-
90	V5	4/5/2007					♂	Κέρατο	+	GR20
91	V6	6/5/2007					?	Δόντια	+	-
92	V7	10/5/2007					?	Δόντια	-	-
93	V8	10/5/2007					?	Δόντια	+	-
94	V9	15/5/2007					♂	Κέρατο	+	-
95	V10	19/5/2007					♂	Οστό κρανίου	+	-
96	V11	19/5/2007					?	Τρίχες	-	-

Πίνακας 4 : Οι 81 δημοσιευμένοι απλότοποι της περιοχής ελέγχου του mtDNA που συμπεριελήφθησαν στη φυλογεωγραφική ανάλυση και οι περιοχές στις οποίες βρέθηκαν.

Πηγή: Randi et al. 2004

Απλότοπος	Περιοχή & αριθμός δειγμάτων	Κωδ. Gene Bank	Απλότοπος	Περιοχή & αριθμός δειγμάτων	Κωδ. Gene Bank
H1	SP/3+P/1	AY625732	H63	DN/5	AY625794
H2	SP/16	AY625733	H67	Ialp/2	AY625798
H3	SP/5+P/4	AY625734	H69	P/6	AY625800
H4	SP/2	AY625735	H70	P/7	AY625801
H5	SP/2	AY625736	H71	SP/1+P/1	AY625802
H6	SP/9+P/4	AY625737	H74	SP/2	AY625805
H7	SP/1+D/1+DN/1	AY625738	H80	S/9	AY625811
H10	GR/12	AY625741	H82	S/6	AY625813
H11	GR/2	AY625742	H83	S/8	AY625814
H12	Ialp/2	AY625743	H84	S/19	AY625815
H13	Ialp/12+ Iapp/42	AY625744	H85	S/6	AY625816
H14	Ialp/52+ Iapp/11	AY625745	H86	S/10	AY625817
H15	Iapp/65	AY625746	H87	S/2	AY625818
H16	Iapp/13+ Ialp/3+D/2	AY625747	H89	S/3	AY625820
H17	Iapp/10	AY625748	H90	S/3	AY625821
H18	Ialp/1+ Iapp/1	AY625749	H92	SP/6	AY625823
H19	F/4	AY625750	H95	F/2	AY625826
H21	F/2+D/1+SW/5	AY625752	H97	F/2	AY625828
H22	F/2	AY625753	H102	S/6	AY625833
H23	S/2+ Ialp/3	AY625754	H103	S/13	AY625834
H24	D+ Ialp/8	AY625755	H104	S/3	AY625835
H25	Ialp/13	AY625756	H107	S/4	AY625838
H27	S/8+ Iapp/25	AY625758	H109	S/2	AY625840
H28	S/7+ Iapp/2	AY625759	H111	S/8	AY625842
H29	S/1+ Iapp/5	AY625760	H115	S/5	AY625846
H30	S/1+ Ialp/6	AY625761	H116	S/9	AY625847
H31	Ialp/2	AY625762	H117	S/9	AY625848
H35	Iapp/15	AY625766	H118	S/2	AY625849
H37	S/1+ Ialp/1	AY625768	H119	S/4	AY625850
H38	SW/3	AY625769	H120	S/4	AY625851
H40	Iapp/9	AY625771	H121	S/4	AY625852
H41	D/6+ Iapp/13	AY625772	H122	S/2	AY625853
H42	Iapp/2	AY625773	H131	S/2	AY625862
H43	Iapp/4	AY625774	H132	S/2	AY625863
H45	C.ital/2	AY625776	H137	S/2	AY625868
H47	D/1+S/1	AY625778	H138	S/3	AY625869
H48	D/1+S/2+ Ialp/1	AY625779	H141	S/2	AY625872
H54	D/1+S/1+ Ialp/1	AY625785	H145	S/2	AY625876
H57	Ialp/2	AY625788	H158	SP/2	AY625889
H60	C.ital/6	AY625791	H159	SP/4	AY625890
H62	DN/3	AY625793			

SP: Ισπανία

S: Σερβία –Μαυροβούνιο-Κόσοβο

P: Πορτογαλία

D: Γερμανία

Ialp: Ιταλικές Άλπεις

C.ital: περιοχές του πληθυσμού του *C. capreolus italicus* (νότια Ιταλία)

DN: Δανία

GR: Ελλάδα

SW: Σουηδία

F: Γαλλία

Iapp: Απέννινα όρη (Ιταλία)

Πίνακας 5 : Ανά ζεύγος γενετικές αποστάσεις (% *p* distances) μεταξύ των απλοτύπων.

Στην τελευταία γραμμή οι μέσες τιμές των αποστάσεων κάθε απλότυπου από όλους τους υπόλοιπους.

% <i>p</i>	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5	GR6	GR7	GR8	GR9	GR10	GR11	GR12	GR13	GR14	GR15	GR16	GR17	GR18	GR19	GR20	GR21	
GR1																						
GR2	0,36																					
GR3	0,12	0,48																				
GR4	1,07	0,72	1,19																			
GR5	0,84	0,48	0,95	0,95																		
GR6	0,72	0,36	0,84	0,84	0,84																	
GR7	0,84	0,48	0,95	0,95	0,72	0,84																
GR8	0,84	0,48	0,95	1,19	0,72	0,84	0,95															
GR9	0,72	0,36	0,84	1,07	0,60	0,72	0,60	0,60														
GR10	1,19	0,84	1,31	1,31	1,31	0,95	0,84	1,31	0,95													
GR11	0,84	0,48	0,95	1,19	0,72	0,84	0,72	0,72	0,12	1,07												
GR12	0,84	0,48	0,95	0,95	0,95	0,36	0,95	0,95	0,84	1,07	0,95											
GR13	0,72	0,60	0,84	1,07	1,07	0,95	0,84	1,07	0,72	0,95	0,84	1,07										
GR14	1,07	0,72	1,19	1,19	0,95	1,07	0,24	1,19	0,84	1,07	0,72	1,19	1,07									
GR15	0,95	0,60	1,07	1,07	0,84	0,95	0,12	1,07	0,72	0,95	0,84	1,07	0,95	0,12								
GR16	0,36	0,24	0,48	0,95	0,72	0,60	0,72	0,72	0,36	1,07	0,48	0,72	0,84	0,95	0,84							
GR17	0,72	0,36	0,84	1,07	0,84	0,72	0,84	0,84	0,48	1,19	0,60	0,84	0,95	1,07	0,95	0,36						
GR18	0,72	0,36	0,84	1,07	0,84	0,48	0,84	0,84	0,72	0,95	0,84	0,36	0,95	1,07	0,95	0,60	0,72					
GR19	0,84	0,48	0,95	1,19	0,95	0,84	0,95	0,95	0,60	1,31	0,72	0,95	1,07	1,19	1,07	0,48	0,12	0,84				
GR20	0,84	0,48	0,95	0,95	0,95	0,60	0,95	0,95	0,84	0,84	0,95	0,72	1,07	1,19	1,07	0,72	0,84	0,60	0,95			
GR21	0,84	0,48	0,95	0,95	0,48	0,84	0,48	0,72	0,36	1,07	0,48	0,95	0,84	0,72	0,60	0,72	0,84	0,84	0,95	0,95		
M.T	0,77	0,49	0,88	1,05	0,84	0,76	0,74	0,90	0,65	1,08	0,75	0,86	0,92	0,94	0,84	0,65	0,76	0,77	0,87	0,87	0,75	

Πίνακας 6 : Ανά ζεύγος γενετικές αποστάσεις (% *d* TrN93) μεταξύ των απλοτύπων.

Στην τελευταία γραμμή οι μέσες τιμές των αποστάσεων κάθε απλότυπου από όλους τους υπόλοιπους

% <i>d</i> (TrN93)	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5	GR6	GR7	GR8	GR9	GR10	GR11	GR12	GR13	GR14	GR15	GR16	GR17	GR18	GR19	GR20	GR21	
GR1																						
GR2	0,37																					
GR3	0,12	0,49																				
GR4	1,12	0,74	1,25																			
GR5	0,87	0,49	0,99	1,00																		
GR6	0,74	0,36	0,86	0,87	0,86																	
GR7	0,90	0,50	1,02	0,99	0,74	0,87																
GR8	0,86	0,48	0,99	1,24	0,74	0,86	1,01															
GR9	0,75	0,37	0,87	1,12	0,62	0,73	0,63	0,62														
GR10	1,27	0,87	1,40	1,39	1,39	1,00	0,87	1,39	1,00													
GR11	0,87	0,49	1,00	1,24	0,74	0,86	0,75	0,74	0,12	1,12												
GR12	0,87	0,49	1,00	1,01	1,00	0,36	1,00	0,99	0,86	1,12	0,99											
GR13	0,74	0,62	0,87	1,12	1,13	0,99	0,88	1,12	0,74	1,00	0,86	1,13										
GR14	1,17	0,76	1,29	1,25	1,00	1,14	0,24	1,28	0,89	1,13	0,76	1,26	1,15									
GR15	1,04	0,64	1,16	1,12	0,87	1,01	0,12	1,15	0,76	1,01	0,89	1,13	1,02	0,12								
GR16	0,37	0,25	0,49	0,99	0,74	0,61	0,78	0,74	0,37	1,15	0,49	0,74	0,88	1,05	0,92							
GR17	0,75	0,37	0,87	1,12	0,87	0,73	0,90	0,86	0,49	1,27	0,61	0,87	1,01	1,17	1,04	0,37						
GR18	0,74	0,36	0,87	1,12	0,87	0,48	0,88	0,86	0,74	1,01	0,86	0,36	1,00	1,15	1,02	0,62	0,74					
GR19	0,87	0,49	1,00	1,25	0,99	0,86	1,02	0,99	0,61	1,40	0,73	0,99	1,13	1,29	1,17	0,49	0,12	0,87				
GR20	0,87	0,49	0,99	1,00	0,99	0,61	1,01	0,99	0,86	0,88	0,99	0,74	1,13	1,27	1,15	0,74	0,87	0,61	0,99			
GR21	0,87	0,49	1,00	0,99	0,49	0,86	0,49	0,74	0,37	1,12	0,49	0,99	0,87	0,74	0,62	0,75	0,87	0,87	1,00	0,99		
M.T	0,81	0,51	0,93	1,10	0,87	0,78	0,78	0,93	0,68	1,14	0,78	0,90	0,97	1,01	0,90	0,68	0,80	0,80	0,80	0,91	0,91	0,78

Πίνακας 7 : συνέχεια

A	1	1	1	4	5	6	7	8	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
GRCn1	-	T	G	T	A	A	C	A	G	T	G	T	C	A	C	A	A	T	A	C	C	G	A	A	A	A	T	A
H28	-	G	T	G
H30	-	T	G
H1	-	.	A	.	.	.	T	T	G	.	.	.	T
H2	-	T	T	G	.	.	.	T
H3	-	T	G	.	.	.	C	.	T	G	.	C
H4	-	T	G	.	.	.	C	.	T	G	.	C
H5	-	T	T	G	.	.	.	T
H6	-	C	T	T	G	G	.	G
H7	-	T	G	T	G	G
H12	-	T	G	.	G	A
H13	-	T	G	T	G	A
H14	-	T	G	T	G	A
H15	-	T	T	G	A
H18	-	T	G	T	G
H19	-	T	C	.	G	T	G
H21	-	T	G	T	G
H22	-	T	G	T	G
H24	-	T	G	T	G	.	.	G	G	.	.
H25	-	T	T	G	A	G
H31	-	T	G	T	G	A
H35	-	T	T	G	A
H37	-	T	G	T	G	A
H38	-	T	G	T	G
H40	-	T	T	G	A
H41	-	T	G	T	G
H42	-	T	T	G	A
H43	-	T	T	G	A
H45	-	T	T	G	A
H47	-	T	G	T	G
H48	-	T	G	T	G
H54	-	T	G	T	G
H57	-	T	T	G	A	G

Πίνακας 7 : συνέχεια

A	1	1	1	4	5	6	7	8	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	5	8	4	5	9	5	0	4	5	2	4	9	3	2	5	1	7	8	1	2	5	6	7	4	5	6	4
GRCn1	-	T	G	T	A	A	C	A	G	T	G	T	C	A	C	A	A	T	A	C	C	G	A	A	A	A	T	A
H60	-	T	-	.	.	T	G	A
H62	-	T	G	T	G	T
H63	-	T	G	T	G	.	.	G	T
H67	-	T	G	T	G
H69	-	T	T	G	G	.	.
H70	-	T	T	G	G	.	.
H71	-	T	T	G	G	.	G	.	.	.
H74	-	T	T	G
H80	-	T	G	T	G
H83	-	T	G	T	G	.	.	.	T
H84	-	T	G	T	G	.	.	.	T
H85	-	T	G	T	G	A
H86	-	T	G	T	G	.	.	G
H87	-	T	G	T	G	A
H89	-	T	G	T	G	.	.	.	T
H92	-	T	T	G	G	.	.	.
H95	-	T	G	.	G
H97	-	T	G	.	G	A
H103	-	T	G	T	G	.	.	.	T
H104	-	T	G	T	G	T
H107	-	T	G	T	G
H117	-	T	G	T	G
H118	-	T	G	T	G	.	.	.	T	T
H122	-	T	G	T	G	A
H137	-	T	G	T	G
H138	-	T	G	T	G
H141	-	T	G	T	G	A	C	.
H145	-	T	G	T	G	A	C	.
H158	-	T	G	T	G
H159	-	T	G	T	G	G

Πίνακας 7 : συνέχεια

B	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	6	6	6	6	6	6	7
	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	4	7	7	8	8	0	1	4	6	6	3	4	5	6	6	6	8	0
	6	6	0	8	8	4	4	3	2	3	5	8	9	1	2	5	6	4	3	6	4	1	9	1	2	7	0	2
GRCn1	T	T	A	A	T	T	C	C	A	A	T	A	A	T	C	T	A	C	T	T	A	T	T	G	A	G	G	C
H28	C	G
H30
H1	C	.	T	A	A	.
H2	C	.	T	G	A	A	.
H3	.	.	G	T	C	.	T	G	.	A	.
H4	.	.	G	T	C	.	T	G	.	.	.
H5	C	.	T	A	A	.
H6	.	C	G	.	C	.	.	T	C	G	.	A	.
H7	.	.	G	.	C	C	G	A	A	.
H12	T	C	.	T	A	G	.	.	.
H13	T	C	.	T	A	G	A	.	.
H14	.	.	G	C	.	T	.	C	G	A	A	.
H15	.	.	G	C	.	T	G	A	A	.
H18	.	.	G	T	C	.	T	G	.	A	.
H19	.	.	G	C	.	T	G	A	A	.
H21	.	.	G	C	.	T	G	A	A	.
H22	.	.	G	.	.	C	.	T	C	.	T	G	A	A	.
H24	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	G	A	.	.
H25	.	C	G	.	C	.	.	T	C	G	.	.	.
H31	T	T	A	G	A	.	.
H35	.	.	G	C	.	T	A	G	A	.	.
H37	.	.	G	C	.	T	.	C	A	A	.
H38	.	.	G	.	C	.	.	T	C	G	.	A	.
H40	.	.	G	G	C	.	T	A	G	A	.	.
H41	.	.	G	T	C	.	T	G	A	A	.
H42	.	.	G	C	.	T	G	A	.	.
H43	C	.	G	C	.	T	G	A	.	.
H45	.	.	G	G	C	G	T	G	A	A	.
H47	.	.	G	C	.	T	A	A	.
H48	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	G	.	A	.
H54	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	G	A	A	.
H57	.	C	G	.	C	.	A	T	C	G	.	.	.

Πίνακας 7 : συνέχεια

B	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	6	6	6	6	6	6	7	
	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	4	7	7	8	8	0	1	4	6	6	3	4	5	6	6	6	8	0	
	6	6	0	8	8	4	4	3	2	3	5	8	9	1	2	5	6	4	3	6	4	1	9	1	2	7	0	2	
GRCn1	T	T	A	A	T	T	C	C	A	A	T	A	A	T	C	T	A	C	T	T	A	T	T	G	A	G	G	C	
H60	.	.	G	G	.	.	.	C	.	T	G	A	A	.	
H62	C	.	G	C	.	T	A	A	T	
H63	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	A	A	.	
H67	.	.	G	G	.	.	.	C	.	T	A	.	.	
H69	.	C	G	.	C	.	.	T	G	G	.	.	.	
H70	.	C	G	.	C	.	.	T	G	C	.	G	
H71	.	C	G	T	C	G	.	A	.	
H74	C	.	T	G	A	A	.	
H80	.	.	G	.	C	.	.	T	C	
H83	.	.	G	C	.	T	G	A	A	.	
H84	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	A	A	.	
H85	.	.	G	C	A	A	.	
H86	.	.	G	C	.	.	C	G	A	A	.	
H87	.	.	G	C	.	T	A	G	A	A	.
H89	.	.	G	C	.	T	G	A	A	.	
H92	.	C	G	.	C	.	.	T	G	.	.	.	
H95	.	.	G	T	C	.	T	A	.	.	
H97	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	A	.	
H103	.	.	G	C	.	T	A	A	.	
H104	.	.	G	C	G	A	A	.	
H107	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	G	A	.	.	
H117	.	.	G	.	C	.	.	T	C	A	.	
H118	.	.	G	C	G	A	A	.	
H122	.	.	G	C	.	T	A	A	.	
H137	.	.	G	C	.	T	A	G	A	.	
H138	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	T	A	G	A	.	
H141	.	.	G	.	C	C	.	T	A	G	A	.	
H145	.	.	G	.	C	C	.	T	A	G	A	A	.
H158	.	.	G	C	.	T	G	.	A	.	
H159	.	.	G	.	C	C	.	T	G	.	A	.	

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

σε διεθνή περιοδικά με κριτές



Acta Theriologica 53 (1): 87–94, 2008.
 PL ISSN 0001-7051

Estimation of roe deer *Capreolus capreolus* and mouflon *Ovis aries* densities, abundance and habitat use in a mountainous Mediterranean area

Dimitris TSAPARIS, Stelios KATSANEVAKIS, Christina STAMOULI
 and Anastasios LEGAKIS

Tsaparis D., Katsanevakis S., Stamouli C. and Legakis A. 2008. Estimation of roe deer *Capreolus capreolus* and mouflon *Ovis aries* densities, abundance and habitat use in a mountainous Mediterranean area. *Acta Theriologica* 53: 87–94.

The abundance, density, and habitat use of roe deer *Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758) and mouflon *Ovis aries* Linnaeus, 1758 were studied in a confined Mediterranean area in Greece with a dung survey based on the faecal accumulation rate (FAR) technique. Estimated density was modelled with generalized additive models using altitude, habitat type, and slope as potential covariates. Model selection among the set of candidate models was conducted based on their generalized cross-validation score. Roe deer had an estimated mean density of 13.9 ind./km² and the best model included slope and habitat type as covariates. The mean density of mouflon in the study area was 22.1 ind./km² and the best model used altitude and habitat type as covariates. For both species, the highest densities were encountered in abandoned cultivations and glades, followed by conifer forests, while the lowest densities were observed in maquis. However, use of open habitats by mouflon was much greater than it was for roe deer. The strong preference of mouflon (a grazer species) for open habitats that were abundant with grasses probably reflected food availability and contrasted with the more diverse habitat use by roe deer (a selective browser).

Section of Zoology and Marine Biology, Department of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis, 15784 Athens, Greece, e-mail: tsaparis@biol.uoa.gr

Key words: dung survey, management, Mediterranean ecosystem, ruminants, ungulates

Introduction

Conservation and efficient management of wild animal populations necessitates the knowledge of their size and structure. A wide range of

methods, both direct (counts of animals) and indirect (counts of their signs), have been reported so far in the literature (eg Seber 2002, Putman 1984, Staines and Ratcliffe 1987, Buckland *et al.* 2001, Borchers *et al.* 2002). The choice of a specific method depends on the ecology and behav-

Estimating dung decay rates of roe deer (*Capreolus capreolus*) in different habitat types of a Mediterranean ecosystem: an information theory approach

Dimitris Tsaparis · Stelios Katsanevalis ·
 Eirini Ntolka · Anastasios Legakis

Received: 10 June 2007 / Revised: 26 August 2008 / Accepted: 2 October 2008 / Published online: 21 October 2008
 © Springer-Verlag 2008

Abstract For elusive species living in concealing habitats (e.g. deer in a forest habitat), indirect methods such as faecal pellet counts are considered more practical means of estimating population density and abundance. Accurate estimation of deer density using the faecal standing crop (FSC) method necessitates the reliable estimation of the mean time to decay of pellet groups present during the survey. Mean time to decay is generally habitat specific, and separate estimations should be made for each habitat type in the study area. In a confined mountainous area of Greece, the habitat-specific mean time to decay of roe deer pellet groups was estimated by locating and marking fresh pellet groups on several dates in the lead up to an FSC survey and returning to the marked signs at the time of the survey to record whether or not each pellet group had survived. Several logistic models were fitted to the data, and estimations were based on a multi-model inference (MMI) approach according to information theory. The highest mean time to decay was estimated in coniferous forests, while mid-ranged values were found in maquis shrubs, and the lowest mean time to decay was observed in open areas. MMI by model averaging, based on Akaike weights, is recommended for making robust parameter estimations and for dealing with uncertainty in model selection.

Keywords Abundance · Faecal standing crop · Multi-model inference · Ungulates

Introduction

The roe deer (*Capreolus capreolus*) is the only wide-ranging representative of the family Cervidae that is still found in the wild in mountainous regions of Greece. Once abundant all over continental Greece, it became extinct from the southernmost areas (Peloponnisos) early in the twentieth century. In the late 1970s, in an effort to re-introduce the species in Peloponnisos, a founding group of roe deer was translocated from northern Greece to a confined area (henceforth: the study area) in a mountainous Mediterranean-type ecosystem.

During spring 2007, an attempt to estimate the abundance of roe deer was made (unpublished data) by conducting a major dung survey in the study area using a faecal standing crop (FSC) technique with line transect sampling (Marques et al. 2001). To convert FSC data into estimates of population density, two rates should have been estimated: the defecation rate and the mean time to decay of the dung. The mean time to decay should be estimated for pellet groups present at the time of the survey. A simple method to achieve this estimation is to locate and mark fresh pellet groups on several dates in the lead up to the survey and to return to marked pellet groups just once, at the time of the survey, recording whether or not the pellet groups survived (Buckland et al. 2001; Laing et al. 2003). The duration of the decay experiment is chosen so that the proportion of signs surviving from the earliest date to the survey is expected to be small. The

Communicated by E. Hadjisterkotis

D. Tsaparis (✉) · S. Katsanevalis · E. Ntolka · A. Legakis
 Section of Zoology and Marine Biology, Department of Biology,
 University of Athens,
 Panepistimioupolis,
 15784 Athens, Greece
 e-mail: tsaparis@biol.uoa.gr



ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Περίληψη

Το ευρωπαϊκό ζαρκάδι (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) είναι ένα μικρόσωμο είδος της οικογένειας των Ελαφοειδών (Cervidae), που εξαπλώνεται σε ολόκληρη σχεδόν την ευρωπαϊκή ήπειρο εκτός της Ισλανδίας, της Ιρλανδίας και των νησιών της Μεσογείου. Θεωρείται το πλέον άφθονο άγριο οπιληφόρο που ζει στην συγκεκριμένη περιοχή, με συνολικό πληθυσμό που εκτιμάται σε πάνω από 15 εκατομμύρια. Αν και κατά βάση πρόκειται για δασόβιο είδος, η αξιοσημείωτη ικανότητα προσαρμογής του σε ποικιλία ενδιαιτημάτων και η ανοχή που δείχνει σε μεγάλο εύρος κλιματολογικών συνθηκών εξηγούν την ευρύτατη και επιτυχημένη εξάπλωσή του.

Οι πληθυσμοί του είδους στην Ελλάδα, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στις περισσότερες περιοχές εξάπλωσής του, εμφανίζουν πολύ χαμηλές πυκνότητες και κατανέμονται κυρίως σε ορεινές δασικές περιοχές με περιορισμένη όχληση. Ως μέτρο προστασίας του ελληνικού ζαρκαδιού έχει επιβληθεί, ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του '60, η απαγόρευση του κυνηγιού του. Ωστόσο, η λαθροθηρία και η υποβάθμιση των δασικών ενδιαιτημάτων εξαιτίας ανθρωπογενών παρεμβάσεων εξακολουθούν να αποτελούν σημαντικές απειλές, οι οποίες θέτουν σε αμφισβήτηση τη δυνατότητα μακρόχρονης διατήρησής του. Σύμφωνα με το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας το είδος χαρακτηρίζεται ως Τρωτό. Η επιστημονική διερεύνηση του ελληνικού ζαρκαδιού υπήρξε έως σήμερα εξαιρετικά αποσπασματική και περιορισμένη. Η έλλειψη βασικής γνώσης και επιστημονικής τεκμηρίωσης πάνω σε θέματα που άπτονται της οικολογίας και της διατήρησής του δεν επιτρέπει την εκπόνηση στοχευμένων διαχειριστικών σχεδίων.

Βασικός σκοπός της παρούσας διατριβής υπήρξε η συνεισφορά νέων, σημαντικών δεδομένων αλλά και μεθοδολογικών εργαλείων, τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο σχεδιασμό και την εφαρμογή μελλοντικών δράσεων διατήρησης και διαχείρισης του ζαρκαδιού στην Ελλάδα. Η μελέτη επικεντρώθηκε σε δύο κύριους άξονες: α) στην περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας του ελληνικού ζαρκαδιού και β) στην αξιολόγηση της δυνατότητας χρήσης έμμεσων μεθόδων εκτίμησης της αφθονίας και της πυκνότητας για την παρακολούθηση των πληθυσμιακών του διακυμάνσεων.

Η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας είναι μία από τις βασικές απειλές για την επιβίωση των φυσικών πληθυσμών ενός είδους και η διατήρησή της αποτελεί σημαντική προτεραιότητα στην προστασία της βιοποικιλότητας. Προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας και να διερευνηθεί η ύπαρξη γεωγραφικών προτύπων διαφοροποίησης του είδους στην Ελλάδα, διενεργήθηκαν δειγματοληψίες σε 8 φυσικούς και έναν εκτρεφόμενο πληθυσμό. Συνολικά συγκεντρώθηκαν 96 δείγματα μαλακών ιστών ή/και νεκρού οργανικού υλικού, από τα οποία εξήχθη ολικό DNA. Οι μοριακοί δείκτες που

χρησιμοποιήθηκαν στη γενετική ανάλυση ήταν η περιοχή ελέγχου του μιτοχondριακού DNA και 14 μικροδορυφορικοί τόποι. Ως προς τη ευρύτερη φυλογεωγραφία του είδους επιχειρήσαμε να ελέγξουμε την ορθότητα προηγούμενων υποθέσεων, στηριζόμενοι στην κοινή ανάλυση των απλοτύπων της περιοχής ελέγχου του μιτοχondριακού DNA που βρέθηκαν στην Ελλάδα και δημοσιευμένων απλοτύπων από πληθυσμούς στην υπόλοιπη Ευρώπη.

Τα ζαρκάδια που επιβιώνουν στην Ελλάδα ανήκουν στο σύνολό τους σε έναν και μόνο φυλογενετικό κλάδο (Ανατολικό κλάδο), ο οποίος πιθανώς διαφοροποιήθηκε εξαιτίας της απομόνωσης προγονικών πληθυσμών του είδους κατά τις παγετώδεις περιόδους στη Βαλκανική χερσόνησο. Οι ελληνικοί πληθυσμοί, ως μέρος ενός συνόλου ιστορικά απομονωμένων και έντονα διαφοροποιημένων πληθυσμών των Βαλκανίων, συνιστούν μια εξελικτικά σημαντική μονάδα διατήρησης εντός του είδους, η οποία χρήζει προστασίας από γενετική υποβάθμιση και ανάμειξη. Όπως συμβαίνει και στην Ιταλική και Ιβηρική χερσόνησο, το ελληνικό ζαρκάδι εμφανίζει ισχυρή γενετική δομή και υψηλή διαπληθυσμιακή διαφοροποίηση, σε αντίθεση με τους περισσότερο ομοιογενείς πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης. Η δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης στους μικρούς και απομονωμένους ελληνικούς πληθυσμούς θα μπορούσε να θεωρηθεί καθοριστικός παράγοντας διαμόρφωσης των υψηλών τιμών διαπληθυσμιακής διαφοροποίησης σε τόσο μικρή γεωγραφική κλίμακα. Με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να αναφερθούν τουλάχιστον τέσσερις διαφοροποιημένες γενετικές δεξαμενές εντός της Ελλάδας, οι οποίες αντιστοιχούν σε διακριτές διαχειριστικές μονάδες και οι οποίες θα πρέπει να διατηρηθούν ως σημαντικές συνιστώσες της ποικιλομορφίας και του εξελικτικού δυναμικού του ελληνικού ζαρκαδιού. Οι τοπικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από μειωμένες τιμές γενετικής ποικιλότητας σε σχέση με τους ακμαίους πληθυσμούς άλλων χωρών, πιθανόν λόγω του μικρού τους μεγέθους. Το δεδομένο αυτό σε συνδυασμό με την πιθανή γενετική απομόνωση σε τοπική κλίμακα, καθιστά τους ελληνικούς πληθυσμούς ιδιαίτερα ευάλωτους σε φαινόμενα περαιτέρω γενετικής υποβάθμισης και υπογραμμίζει την ανάγκη εξειδικευμένης διαχείρισης και προστασίας.

Η απουσία συστηματικών εκτιμήσεων της αφθονίας και της πυκνότητας των πληθυσμών του ζαρκαδιού στην Ελλάδα συνιστά μια σημαντική διαχειριστική ανεπάρκεια. Οι έμμεσες μέθοδοι εκτίμησης, που στηρίζονται στην καταμέτρηση των περιττωματικών αποθέσεων των ζώων, έχουν προταθεί ως εναλλακτική λύση έναντι κλασικών άμεσων μεθόδων για την εκτίμηση της αφθονίας των ελαφοειδών. Η πρακτική εφαρμογή και η αποδοτικότητα των μεθόδων καταμέτρησης κοπρανοσωρών έχει αξιολογηθεί κυρίως σε ενδιαιτήματα εύκρατων δασών και λιβαδιών της ευρωπαϊκής ενδοχώρας και της Μεγάλης Βρετανίας, που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ήπιου γεωμορφολογικού αναγλύφου και συγκεκριμένων κλιματολογικών συνθηκών. Αντίθετα ελάχιστες είναι οι σχετικές μελέτες και

οι δημοσιευμένες εργασίες σε πληθυσμούς ζαρκαδιών που ζουν σε μεσογειακά οικοσυστήματα.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα χρήσης των μεθόδων σε προγράμματα συστηματικής παρακολούθησης των ελληνικών πληθυσμών, πραγματοποιήθηκαν δύο χρονικά ανεξάρτητες πιλοτικές έρευνες εκτίμησης της αφθονίας ενός εκτρεφόμενου πληθυσμού στα Καλάβρυτα. Στην πρώτη έρευνα εφαρμόστηκε η μέθοδος εκτίμησης του ρυθμού συσσώρευσης κοπρανοσωρών (Faecal Accumulation Rate) ενώ στη δεύτερη η μέθοδος καταμέτρησης κοπρανοσωρών (Faecal Standing Crop). Στην περίπτωση της μεθόδου FSC, αντί της παραδοσιακής τεχνικής δειγματοληψίας σε επιφάνειες (plot sampling) χρησιμοποιήθηκε η πιο σύγχρονη τεχνική της δειγματοληψίας αποστάσεων (distance sampling). Επιπλέον, με ανεξάρτητο πείραμα υπολογίστηκε ο μέσος χρόνος αποικοδόμησης των κοπρανοσωρών, που ήταν απαραίτητος στη μέθοδο FSC. Πέραν της περιγραφής των πρακτικών δυσκολιών, αξιολογήθηκε η ακρίβεια των εκτιμώμενων πληθυσμιακών παραμέτρων καθώς και το κόστος εφαρμογής των μεθόδων σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό.

Η επιτυχία των πληθυσμιακών ερευνών στο εκτροφείο των Καλαβρύτων αποδεικνύει ότι οι έμμεσες μέθοδοι καταμέτρησης κοπρανοσωρών μπορούν να εφαρμοστούν και στα ορεινά μεσογειακά οικοσυστήματα της Ελλάδας δίνοντας μια εναλλακτική δυνατότητα αξιόπιστων εκτιμήσεων του πληθυσμιακού μεγέθους των ζαρκαδιών. Ως καταλληλότερη μέθοδος για εφαρμογή σε προγράμματα συστηματικής παρακολούθησης (monitoring) προτείνεται η FSC με δειγματοληψία αποστάσεων, λόγω κυρίως της δυνατότητας που παρέχει για μεγαλύτερη ένταση δειγματοληψίας με μικρότερο κόστος σε χρόνο και ανθρώπινο δυναμικό.

Summary

The European roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758), a small-sized species of the Cervidae family, is distributed throughout the whole of Europe with the exception of Iceland, Ireland and the Mediterranean islands. It is reported to be the most abundant species among the wild ungulates in this region, with an estimated overall population size of over 15 millions. Although roe deer are supposed to be mainly forest inhabitants, they can colonize a great variety of other habitats as well. This adaptive plasticity and their tolerance of climatic extremes explain their extensive and successful distribution.

Greek populations, unlike many others, display very low densities and are present mainly in mountainous woodland areas with low levels of human disturbance. Roe deer hunting has been banned in Greece since the late '60s, as an emergency measure of protection. However, poaching and degradation of forest habitats due to anthropogenic interventions continue to constitute important threats, which put in question the long term survival of roe deer. According to the Red Book of Threatened Animals of Greece the species is characterized as Vulnerable. The scientific investigation of Greek roe deer was until now exceptionally fragmentary and limited. The lack of basic knowledge and scientific documentation on subjects that are related to the ecology and conservation of roe deer in Greece does not allow the development of targeted management projects.

The basic goal of this thesis was the contribution of new, important data and methodological tools, to the future development and implementation of conservation and management projects for roe deer in Greece. The study focused on two major axes: a) the investigation of Greek roe deer genetic diversity and b) the evaluation of the potential use of indirect methods for estimating density and abundance in order to monitor fluctuations of roe deer populations.

Genetic diversity loss is one of the major threats for the survival of natural populations. The conservation of genetic diversity is considered to be of high priority regarding biological conservation of species. In order to estimate the levels of genetic diversity and to investigate the potential existence of genetic differentiation geographical patterns in Greek roe deer, samples were collected from 9 populations (8 natural and one enclosed captive population). A number of 96 samples (soft tissues and/or dead organic material) were collected, from which total DNA was extracted. The mitochondrial control region and 14 microsatellites were used as molecular markers in the genetic analysis. As far as the phylogeography of roe deer is concerned, the validity of formerly established assumptions was tested, co-analyzing the haplotypes of mtDNA control region that were

found in Greek populations during the present study as well as the published haplotypes from other European roe deer populations.

Roe deer that survive in Greece seem to belong to only one phylogenetic clade (East Clade), which possibly differentiated as a result of geographic isolation of ancestral populations in the Balkan Peninsula during the Ice Ages. The Greek populations, as part of a set of historically isolated and highly differentiated Balkan populations constitute an evolutionarily significant unit for the species requiring protection from genetic degradation and from admixing. Like roe deer in the Italian and Iberian Peninsula, the Greek roe deer show strong genetic structure and significant inter-population differentiation, in contrast to the genetically more homogeneous populations of central Europe. The effect of random genetic drift on the small and isolated Greek populations could be considered a determining factor that shaped high differentiation levels in such a small geographical scale. Based on the data of this study, at least four diverse gene pools could be located in Greece, which correspond to discrete management units. These units should be conserved as important components of genetic diversity and evolutionary potential of the Greek roe deer. The genetic diversity of local populations in Greece is lower in relation to that of thriving populations of other countries, possibly because of their small size. This fact, combined with the possible genetic isolation, makes the Greek populations particularly vulnerable to further genetic degradation and underlines the need for specialized management and protection.

The lack of systematic estimates of abundance and density of roe deer populations in Greece is a serious management inadequacy. Indirect estimation methods based on faecal pellet group counts have been proposed as an alternative to conventional direct methods for estimating the abundance of deer populations. However, the practical implementation and efficiency of pellet group counting methods have been evaluated primarily in temperate forests and grasslands of European inland and Great Britain, which are characterized by a mild geomorphological relief and specific climatic conditions. On the contrary, there are few relevant studies and published papers concerning roe deer populations in Mediterranean ecosystems.

In order to evaluate the potential use of such methods in monitoring programs of the Greek roe deer, I performed two time-independent pilot studies trying to assess the abundance of an enclosed population in the Kalavryta region. The Faecal Accumulation Rate (FAR) method was applied in the first study while the Faecal Standing Crop (FSC) method in the second. In the case of FSC, instead of the traditional technique of plot sampling, the more modern technique of distance sampling was used. Furthermore, an independent experiment was carried out in order to estimate the mean time of pellet groups to decay, which is absolutely necessary for the implementation of the FSC method. Besides the description of the

practical difficulties, the precision of estimated population parameters and the cost in time and manpower for the implementation of the two different methods were evaluated.

The success of population surveys at Kalavryta shows that indirect methods of pellet group counts can be applied in mountainous Mediterranean ecosystems of Greece as well, giving an alternative for reliable estimates of roe deer population size. The FSC with distance sampling is proposed as the most suitable method for application in monitoring programs, mainly because it allows more intensive sampling at a lower cost in time and manpower.

