

## Előzetes eredmények a mezei nyulak (*Lepus europaeus*) filogenetikai vizsgálatáról

Mező Blanka – Kusza Szilvia

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,  
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen  
kusza@agr.unideb.hu

### ÖSSZEFOGLALÁS

A mezei nyúl (*Lepus europaeus*) az egyik legelterjedtebb emlős Európában. Genetikai szerkezetének változását nemcsak az utolsó jégkorszak befolyásolta, hanem például az emberi tevékenységek (vadászat, mezőgazdasági tevékenység), bizonyos területek izolációja vagy a táplálékért való versengés is. Különböző tanulmányok számolnak be arról, hogy a mezei nyúl populációk különböző genetikai variációkkal rendelkeznek Európa-szerte, azonban ezen fajok evolúcióját és filogenetikáját még mindig alig ismerjük.

Munkánk céljával a mezei nyúl genetikai változatosságának megismerését tűztük ki. A filogenetikai elemzésekhez (távolságtételek meghatározása, Network analízis) az NCBI adatbázisból összegyűjtött mitokondriális DNS D-loop régió és citokróm b (*cyt b*) gén egy szakaszának szekvenciáját használtuk. Az eredményeink azt mutatják, hogy az olaszországi szekvenciák elkülönülnek a többtől. A genetikai analízis alátámasztotta a korábbi eredményeket, miszerint két nagyobb filogenetikai klád különíthető el: az egyikhez Görögország, a szigetek kivételével, valamint Bulgária, Olaszország, és Közép-Európa, a másikhoz pedig Kelet-Macedónia, Trákia görög prefektúrái, a keleti égei-tengeri szigetek, valamint Ciprus és Izrael északi területei tartoznak.

**Kulcsszavak:** mezei nyúl, eredet, filogenetika

### SUMMARY

Brown hare (*Lepus europaeus*) is one of the most wide spread mammal in Europe. Its genetic structure is affected not only by last glacial, even by human activities (hunting, agricultural activities), isolation of such areas or competing for food resources. According to literature data brown hare populations has different genetic variants in Europe, however its evolution, phylogenetics has not studied well.

The main goal of this work was to know genetic structure of some brown hare. Mitochondrial DNA analysis was performed in two regions (D-loop, 513 bp and cytochrome-b, 1183 bp). Genetic distance values and Network analysis were calculated. NCBI Genbank was used for further sequences. Our results showed that Italian samples differed from the Genbank samples. We found two main clades: 1: Greece without islands; Bulgaria, Italy and Central-Europe; 2: East-Macedonia, Greece with islands, Cyprus and North Israel.

**Keywords:** brownhare, origin, phylogenetics

### BEVEZETÉS

A mezei nyúl (*Lepus europaeus*) az emlősök (*Mammalia*) osztályába, a nyúlalakúak (*Lagomorpha*) rendjébe, ezen belül pedig a nyúlfélék (*Leporidae*) családjába tartozó faj. Szinte az egész világon elterjedt. Észak-, Közép- és Nyugat-Európában, valamint Kis-Ázsiában őshonos, azonban más országokba is betelepítették (Argentína, Ausztrália, Barbados, Brazília, Kanada, Chile, Falkland-szigetek, Új-Zéland és az Egyesült Államok) (Flux és Angermann, 1990).

Különböző tanulmányok számolnak be arról, hogy a mezei nyúl populációk különböző genetikai variációkkal rendelkeznek Európa-szerte (Suchentrunk et al., 2001), azonban ezen fajok evolúcióját, filogenetikáját és populációgenetikáját még mindig alig ismerjük, és néhány faj esetében a taxonómiai különbségek sem tisztázottak.

A nyúlfélék családja Ázsiában differenciálódott, Európába a korai miocén ideje alatt (20 millió évvel ezelőtt) zajló nagy vándorlás során kerültek (Lopez-Martinez, 1998). Európa más állataihoz és növényeihez hasonlóan, a mezei nyúlra is hatással voltak a pleisztocén alatt lezajló jégkorszakok (Hewitt, 1999), amelyek a populációk méretének csökkenését, azok izolálódását, a genomiális különbségek felhalmozódását és a más populációkkal való adaptálódást eredményezték (Frölich et al., 2007). A jégkorszakokat

sok, gyakran rövid életű felmelegedés szakította meg (Adams et al., 1999). Az északi féltekén a jégkorszak indukálta számos sarkvidéki faj déli irányba történő vándorlását, míg a mérsékelt égövi fajok kénytelenek voltak délebbre vonulni, ahol úgynevezett refugiákban éltek, és ahonnan a kevésbé hideg időszakok során elterjedtek. A legfőbb ilyen területek az Ibériai-félsziget, Olaszország és a Balkán (Albánia, Görögországtól Kis-Ázsiáig) vidéke voltak (Taberlet et al., 1998). A sarkvidéki fajok jól alkalmazkodtak a hideg körülményekhez, ezért tudták fenntartani a nagy elterjedési területüket a jégkorszakok alatt – Európára ekkor jellemző – sztyeppeken és tundrákon. Sok fajnál az éghajlat hidegebbé válása azonban a populáció növekedését, míg a felmelegedés a populáció csökkenését eredményezte (Hewitt, 2001). Ennek következtében egyes területeket az éghajlat változásától függően hol a sarkvidéki, hol a mérsékelt égövi fajok foglalták el, amelyek megteremtették a feltételeket a fajok átfedéséhez, versengéséhez, és esetleges hibridizációjukhoz. Az Ibériai-félsziget egyike lehetett azoknak a területeknek, ahol ez a fajta kölcsönhatás megtörtént (Pérez-Suárez et al., 1994).

Ebben az időszakban az Adriai-tenger szintje mintegy 120–135m-el alacsonyabb volt, mint napjainkban (Clark és Mix, 2002), az északi részénél a Balkán és Olaszország összeköttetésben állt, ami megteremtette a feltételeket a génáramláshoz a populációk közti keve-

redéshez. Létrejött egy földhíd az Égei- és Fekete-tenger között, amely Kis-Azsiát Európával kötötte össze (Aksu et al., 1999), ezáltal a keleti refugiumok jobban megközelíthetővé váltak a mezei nyúl számára. Ezeket a régiókat tekinthetjük az „állatgeográfiai” kereszteződések helyszínéneként, ahol a pleisztocén során rendkívül sok emlős húzódtott meg (Cheylan, 1991). Az éghajlat melegedésével, és az európai tundranövényzet egyidejű változásával az élőhely kedvezőbbé vált, a mezei nyulak elkezdtek újraterjeszkedni Európa középső területeire a keleti és délkeleti sztyeppék felől (valamint lehetséges, hogy Dél-Olaszországból és Délnyugat-Európából) (Corbet 1986). A Közép-Európába történő vándorlásuk során a genetikai variabilitásukat elveszthették, ennek következtében folytatódott a terjeszkedő és letelepedő populációk tényleges számának csökkenése (Hoffmann és Parsons, 1997).

Kasapidis et al. (2005) genetikai analízisek segítségével két különböző filogenetikai kládot különített el: klád A és klád B. A klád B-hez a következő területekhez tartozó mezei nyulakat sorolták: Görögország, a szigetek kivételével (Lefkada, Naxos, Kréta és Kythira), valamint Bulgária, Olaszország, és Közép-Európa (azaz Németország, Ausztria, Magyarország, Szerbia, Románia), a klád A-hoz pedig: Kelet-Macedónia és Trákia görög prefektúrái, a keleti égei-tengeri szigetek: Leszbosz, Chios, Samos, Rodosz, valamint Ciprus és Izrael északi területei. A kládok különválása nagyjából 2–5 jégkorszakkal ezelőtt történt. Bár a két klád földrajzilag elkülönült mégis átfednek (Kasapidis et al., 2005).

A mezei nyúl filogeográfiai tanulmányozásához meg kell vizsgálni az ember általi áttelepítéseket, amelyek lehet, hogy torzították a biogeográfiai történeket (Pierpaoli et al., 1999). Erre az egyik példa a tenyésztett nyulak Görögországba való behozatala lehet, amely elsősorban Olaszországból, a volt Jugoszláviából és Bulgáriából történt (Mamuris et al., 2001). Számos más területre azonban, mint például az égei-tengeri szigektől (például Chios, Samos, Leszbosz) az anatóliai-parton át a Jón-szigetekig (például Lefkada) a mezei nyúl természetes bevándorlási útvonalon keresztül jutott, tehát a különböző szigeteken teljesen különböző, vagy „kevert” mtDNS génállományú mezei nyulak találhatóak (Andel és Shackleton, 1982).

Az Európában széles-körben elterjedt áttelepítések hatására a helyi fajok génállománya egyre inkább kezd kicserélődni a betelepített fajokéra és a genetikai variabilitás csökkenését okozza (Pierpaoli et al., 1999). A

genetikai sokféleség megőrzése azonban az egyik legfontosabb feladat, mivel ezek a kiindulópontjai a populációkon belüli evolúciós változások tanulmányozásához.

Munkánk céljával a mezei nyúl genetikai változottságának megismerését tűztük ki. Ehhez elsősorban európai területekről származó mezei nyúl szekvenciákat használtunk az NCBI adatbázisból, illetve saját laborvizsgálatokat is végeztünk olasz mezei nyúl, illetve *Lepus capensis mediterraneus* bevonásával. Ez az alfaj az Arab-félszigeten elterjedt illetve Európában Szardínia és Ciprus szigetén (Suchentrunk et al., 2001). Azért vontuk be ezt a vizsgálatunkba, hogy jól látható legyen a *Lepus europaeus*-tól való elkülönülése, illetve a széleskörű földrajzi elterjedése ellenére kevés információnk van a filogenetikai kapcsolatairól más alfajokhoz (Alves et al., 2003).

## ANYAG ÉS MÓDSZER

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz 28, Olaszország különböző területéről származó (Szardínia, Toszkána) mezei nyúl genomiális DNS-mintáit használtuk. A PCR és szekvenálási reakciót Stamatis et al. (2009) és Scandura et al. (2007) módszere alapján végeztük el. Az általunk kapott szekvenciákhoz a „National Center for Biotechnology Information” (NCBI) adatbázisban található mitokondriális DNS (mtDNS) D-loop régió 669 illetve a citokrom b (cyt b) régió 199 szekvenciájának 512 bp illetve 1193 bp hosszú szakaszát használva végeztük el statisztikai értékelésünket.

A szekvenciák illesztése Clustal Omega program segítségével történt. A filogenetikai paraméterek, a haplotípusok számának megállapításához DnaSP 5.00 (Librado és Rozas 2009), a távolságértékek meghatározásához MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) programcsomagot használtunk. Az egyes haplocsoportokhoz tartozó haplotípusok leszármazási viszonyainak grafikus ábrázolását Network 4.6.0.0. (Bandelt et al., 1999) programcsomag segítségével végeztük.

## EREDMÉNYEK

### Távolságértékek

A populációk közötti átlagos genetikai távolságadatokat MEGA 5.0 program segítségével számoltuk ki. Az eredmények az 1–2. táblázatban láthatóak.

1. táblázat

Genetikai távolság értékek a cyt b régió alapján

	Észak-Európa(1)	Kelet-Európa(2)	Közép-Európa(3)	Nyugat-Európa(4)	Délkelet-Európa(5)	Közkelet(6)
Észak-Európa(1)	0					
Kelet-Európa(2)	0,027	0				
Közép-Európa(3)	0,022	0,042	0			
Nyugat-Európa(4)	0,010	0,015	0,030	0		
Délkelet-Európa(5)	0,017	0,031	0,025	0,018	0	
Közkelet(6)	0,020	0,016	0,035	0,010	0,025	0

Table 1: Genetic distance values in cyt b gene sequences Northern-Europe(1), Eastern-Europe(2), Central-Europe(3), Western-Europe(4), South-East Europe(5), Middle East(6)

## Genetikai távolság értékek a D-loop régió alapján

	Észak-Európa(1)	Kelet-Európa(2)	Közép-Európa(3)	Nyugat-Európa(4)	Délkelet-Európa(5)	Dél-Európa(6)	Közél-Kelet(7)	Ausztrália(8)
Észak-Európa(1)	0							
Kelet-Európa(2)	0,052	0						
Közép-Európa(3)	0,023	0,061	0					
Nyugat-Európa(4)	0,050	0,090	0,060	0				
Délkelet-Európa(5)	0,048	0,064	0,057	0,085	0			
Dél-Európa(6)	0,042	0,079	0,056	0,083	0,076	0		
Közél-Kelet(7)	0,069	0,069	0,074	0,107	0,066	0,092	0	
Ausztrália(8)	0,060	0,100	0,071	0,052	0,102	0,092	0,125	0

Table 2: Genetic distance values in D-loop region sequences

Northern-Europe(1), Eastern-Europe(2), Central-Europe(3), Western-Europe(4), South-East Europe(5), South-Europe(6), Middle East(7), Australia(8)

A cyt b régió alapján a legkisebb genetikai távolság az észak-európai és nyugat-európai, valamint a közél-keleti és nyugat-európai szekvenciák között (0,01) figyelhető meg; míg a legnagyobb a közép- és kelet-európai minták között (0,042).

A D-loop régió alapján a legkisebb genetikai távolságot az észak- és közép-európai szekvenciák között (0,023) detektáltuk, a legnagyobbat pedig a közél-keleti és ausztráliai minták között (0,125). A kapott érték alacsony a nyugat- és közép-európai minták között is.

## A cyt b haplotípusok Network analízise

A haplotípusok kapcsolatának median-joining hálózattal való vizsgálata során (1. ábra – a színes ábra elérhető a szerzőknél) megállapítottuk, hogy az összesen 199 szekvencia 40 haplotípusba (H) tartozik. A H39-es haplotípust teljesen, a H40 haplotípust részben *Lepus capensis mediterraneus* minták alkotják, amelyek Olaszországból, Szardíniáról származnak. Az ábrán jól látszik, hogy ezek a minták elkülönülnek a többi más országból származó *Lepus europaeus* szekvenciától, a differencia 13 bp. Egyedül a Lengyelország területéről származó mezei nyúlban előforduló H37-es haplotípus különül el az összes többi haplocsoporttól. A lengyel, izraeli valamint török állományoknál is magas genetikai variabilitást találtunk. A haplotípusok egy része kizárólag a lengyel (13-ból 10), valamint a görög (11-ből 8) mintákban található meg. Ezen haplotípusok legtöbbje közeli rokon, mindössze egy mutációban térnek el egymástól. Számos görög, lengyel és izraeli mintánál megfigyelhetjük, hogy az adott haplotípusba mindössze egyetlen minta tartozik (például H2, H29, H30), míg a 3 leggyakoribb haplotípus az egyedek 46,7%-ában megtalálható.

## A D-loop haplotípusok Network analízise

A haplotípusok kapcsolatának median-joining hálózattal való vizsgálata során (2. ábra – a színes ábra elérhető a szerzőknél) megállapítottuk, hogy a 669 szekvencia 259 haplotípusba tartozik. Az ábrán jól látható, hogy a legtöbb minta (178) egy haplotípusba sorolható (H91). Ebbe a haplotípusba tartozik többek között számos közép-európai, lengyel és olasz szekvencia.

Ezen haplotípus körül egy csillagszerű struktúra figyelhető meg, a haplotípusok közti különbség mindössze 1 mutáció. Az olasz és a közép-európai minták gyakran ugyanazt a haplotípust alkotják. A szlovák szekvenciák jól elkülönült csoportot alkotnak, míg az ausztrál szekvenciák ezekkel, illetve a közép-európaiakkal mutatják a legközelebbi rokonságot.

A Kelet-Közép Európából származó minták számos haplotípusba tartoznak; a trákiai mintákhoz hasonlóan magas a genetikai variabilitásuk, sok esetben egy haplotípust egyetlen szekvencia határoz meg.

A macedóniai szekvenciák (2. ábra: fekete) a kelet-európaiakkal (2. ábra: közép kék) állnak közvetlen kapcsolatban, hozzájuk kapcsolódnak a kizárólag ukrán szekvenciák által alkotott haplotípusok.

Az ibériai-félszigeti (2. ábra: magenta) populációk izolált csoportot alkotnak, legközelebb az olaszországi és lengyel (2. ábra: türkiz és zöld) szekvenciákkal állnak.

A 3 ciprusi szekvencia (2. ábra: fehér) 3 haplotípust alkot, melyek közeli rokonsága a trákiai szekvenciákkal (2. ábra: világoskék) megfigyelhető.

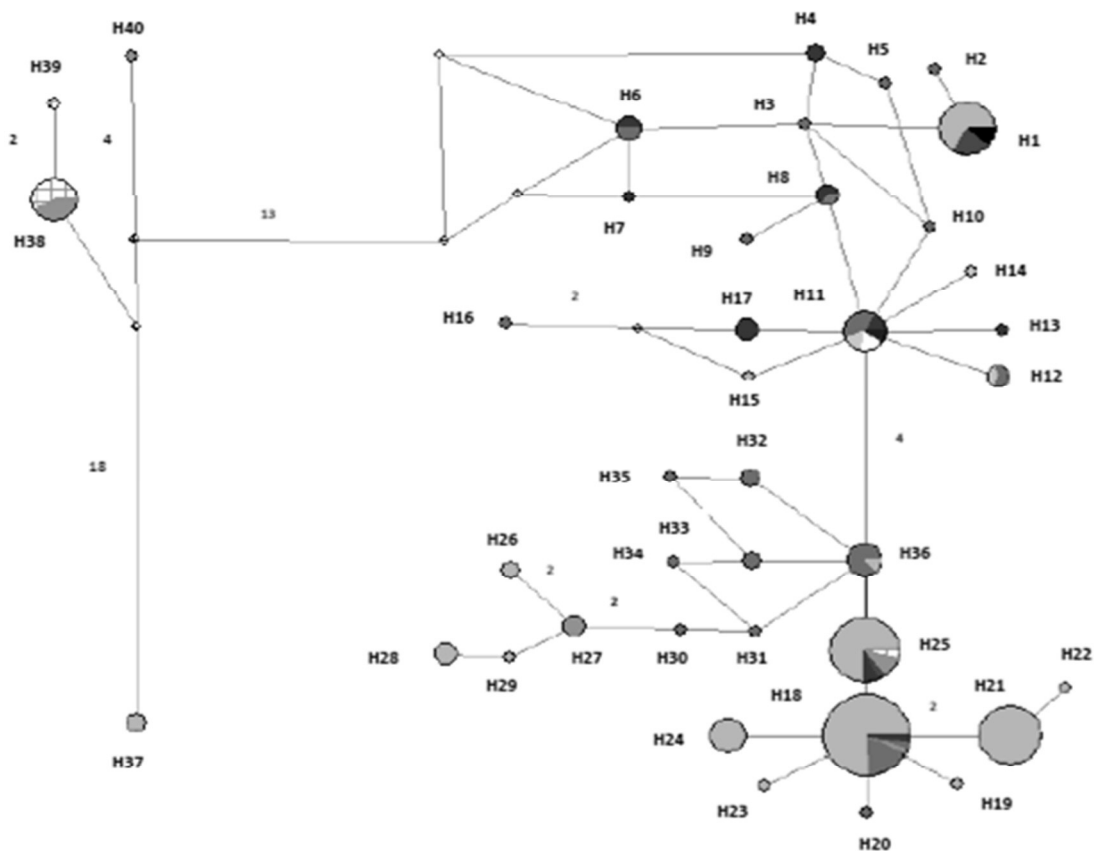
## KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink szerint az Olaszország különböző területein élő mezei nyulak magas haplotípus diverzitással (0,808/0,918) rendelkeznek. A Network analízis alapján megállapítottuk, hogy egy adott haplotípusba *Lepus capensis mediterraneus* és *Lepus europaeus* szekvenciák is tartoznak. Ennek és a magas genetikai sokféleségnek egyik magyarázata az lehet, hogy ezen a területen más *Lepus* fajok is jelen voltak – és vannak –, ezáltal hibridizációs folyamatok lezajlása következhetett be közöttük.

Cyt b régió esetében 40, D-loop régió esetén 259 haplotípust detektáltunk, amely nagyfokú genetikai diverzitásra utal. A haplotípus diverzitás a D-loop régió alapján 0,919-nek adódott, amely jól korrelál a korábban már publikált adatokkal (0,948) (Fickel et al., 2008).

A cyt b régió szekvenciáinak páronkénti összehasonlításából kiderült, hogy a genetikai és geográfiai távolságok általánosságban nem korreláltak az egyes területek között, ezért többek között feltételezzük a genetikai drift és mutációk hatását.

1. ábra: A 40 haplotípus összehasonlítása median-joining hálózattal, a mtDNS cyt b régiójának variábilis helyei alapján



Megjegyzés: – színekódok: zöld=Lengyelország, kék=Görögország, piros=Törökország, fehér=Anglia, narancssárga=Olaszország (Toszkána), lila=Izrael, rózsaszín=Ukrajna, fekete=Oroszország, türkiz=Németország, barna=Svédország, sötürke=Ausztria, halványkék=Bulgária, kockázott=*Lepus capensis mediterraneus* (Szardínia). – A körök mérete arányos a haplotípust alkotó minták számával, a különböző színek az egyes haplotípusokat jelölik. A feketével jelzett számok a mutációk számát mutatják. A vonalakon található fehér körök a szoftver által becsült, de nem mintázott köztes haplotípusokat jelölik.

Figure 1: Median-joining network showing relationships among the 40 *Lepus* haplotypes based on mtDNA cyt b datasets

Note: – colour-code: green=Poland, blue=Greece, red=Turkey, white=England, orange=Italy (Tuscany), purple=Israel, pink=Ukraine, black=Russia, turquoise=Germany, brown=Sweden, grey=Austria, pale blue=Bulgaria, checked=*Lepus capensis mediterraneus* (Sardine). – Circle sizes are proportional to the frequency of haplotypes. The number of mutations is reported along the lines connecting haplotypes. The white circles on the lines estimated by the software represent intermediate haplotypes.

Mindkét régió Network analízise alapján megállapítható, hogy a görög populációra rendkívül nagy genetikai diverzitás jellemző; ennek egyik oka az, hogy a szekvenciák Görögország különböző szigeteiről és területeiről származtak, ahová a *Lepus europaeus* más-más útvonalakon jutott. Az északi fajok genetikai diverzitása alacsonyabb szintű, a jégkorszak után lezajló alapító hatás miatt. A török és közel-keleti szekvenciák gyakran ugyanabba a haplotípusba tartoznak, amely egybevág a korábbi eredményekkel, hiszen ez a terület lehetett az „állatgeográfiai” kereszteződések színhelye a pleisztocén során. Megállapíthatjuk azonban, hogy a haplotípusok legtöbbje közeli rokon, mindössze pár mutációban térnek el egymástól.

A D-loop régió szekvenciáinak elemzése során a legalacsonyabb genetikai távolságot az észak-európai és közép-európai minták között detektáltunk, amely annak a következménye lehet, hogy Észak-Európába a mezei nyulak Közép-Európából kerültek. A legnagyobb különbség a közel-keleti és ausztrál minták között figyelhető meg, amely a geográfiai különbségekből adódhat.

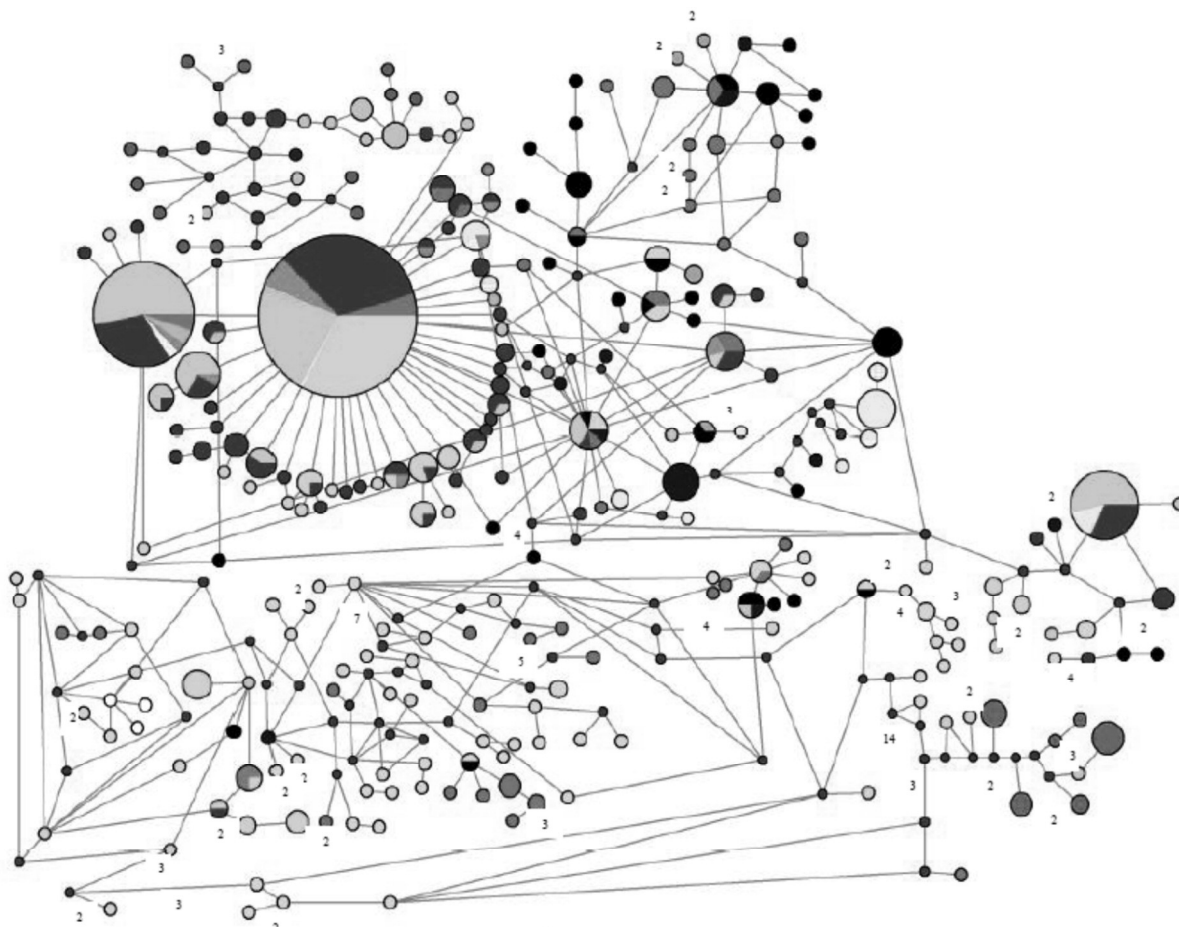
A D-loop régió Network analízise alapján megállapítottuk, hogy az Ibériai-félszigetről származó szekvenciák elkülönült csoportot alkotnak, melynek oka valószínűleg az ott élő más *Lepus* fajokkal való hibridizáció. Macedóniából, Trákiából, Bulgáriából és Közép-Kelet-Európából származó szekvenciák általánosságban jól elkülönült csoportokat alkotnak, a legnagyobb genetikai diverzitás azonban közöttük figyelhető meg. A görög szekvenciák egy része, és a 3 ciprusi minta is ehhez a csoporthoz tartozik, amely egybevág a korábban már publikált eredményekkel (Kasapidis et al., 2005).

Az Ausztráliába történő betelepítés – a szekvenciák nagyfokú hasonlóság miatt – valószínűleg Közép-Európából történt.

A számos haplotípus, melybe kizárólag egyetlen szekvencia tartozik, arra enged következtetni, hogy a betelepítések, a mesterséges génáramlás nem voltak elég erősek ahhoz, hogy teljesen elnyomják a lokális anyai vonalakat.



2. ábra: A 259 haplotípus összehasonlítása median-joining hálózattal, a mtDNS D-loop régiójának variábilis helyei alapján



Megjegyzés: színekódok: Lengyelország=zöld, Kelet-Közép Európa=középkék, Szlovákia=szürke, Ausztria=barack, Közép-Európa=piros, Ukrajna=barna, Dánia=sötétzöld, Izrael=vanília, Ciprus=fehér, Trákia=világoskék, Macedónia=fekete, Bulgária=rózsaszín, Görögország=sötétkék, Egyesült Királyság=sötétlila, Franciaország=fűzöld, Olaszország=türkiz, Ibériai-félsziget=magenta, Ausztrália=lila, Áltanuk szekvenált=sárga, *Lepus capensis mediterraneus*=kockázott. – A körök mérete arányos a haplotípust alkotó minták számával, a különböző színek az egyes haplotípusokat jelölik. A feketével jelzett számok a mutációk számát mutatják. A vonalakon található fehér körök a szoftver által becsült, de nem mintázott köztes haplotípusokat jelölik.

Figure 2: Median-joining network showing relationships among the 259 *Lepus* haplotypes based on mtDNA D-loop datasets

Note: colour-code: green=Poland, medium blue=East Central Europe, grey=Slovakia, peach= Austria, red=Central-Europe, brown=Ukraine, dark green=Denmark, vanilla=Israel, white=Cyprus, pale blue=Thrace, black=Macedonia, pink=Bulgaria, dark blue=Greece, dark purple=England, grass= France, turquoise=Italy, magenta=Iberian Peninsula, purple=Australia, yellow=Tuscany, checked=*Lepus capensis mediterraneus* (Sardine). – Circle sizes are proportional to the frequency of haplotypes. The number of mutations is reported along the lines connecting haplotypes. The white circles on the lines estimated by the software represent intermediate haplotypes.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító

rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## IRODALOM

- Adams, J.–Maslin, M.–Thomas, E. (1999): Sudden climate transitions during the Quaternary. *Prog. Phys. Geogr.* 23: 1–36.
- Aksu, A.–Hiscott, R.–Yaşar, D. (1999): Oscillating Quaternary water levels of the Marmara Sea and vigorous outflow into the Aegean Sea from the Marmara Sea–Black Sea drainage corridor. *Mar. Geol.* 153: 275–302.
- Alves, P. C.–Ferrand, N.–Suchentrunk, F.–Harris, D. J. (2003): Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Mol. Phylogen. Evol.* 27: 70–80.
- Andel, T.–Shackleton, J. (1982): Late Paleolithic and Mesolithic coastlines of Greece and the Aegean. *J. Field. Archaeol.* 9: 445–454.

- Bandelt, H. J.–Forster, P.–Röhl, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37–48.
- Cheylan, G. (1991): Patterns of Pleistocene turnover, current distribution and spéciation among *Mediterranean mammals*. Cambridge University Press. Cambridge. 227–262.
- Clark, P.–Mix, A. (2002): Ice sheets and sea level of the Last Glacial Maximum. *Quaternary Sci. Rev.* 21: 1–7.
- Corbet, G. (1986): Relationships and origins of the *European lagomorphs*. *Mammal. Rev.* 16: 105–110.
- Fickel, J.–Hauffe, C. H.–Pecchioli, E.–Soriguer, R.–Vapa, L.–Pitra, C. (2008): Cladogenesis of the European brown hare (*Lepus europaeus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 54: 495–510
- Flux, J.–Angermann, R. (1990): The hares and jackrabbits. [In: Rabbits et al. Status Survey and Conservation Action Plan.] International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. Gland. Switzerland.
- Frölich, K.–Fickel, J.–Ludwig, A.–Lieckfeldt, D.–Streich, W.–Jurčik, R.–Slamecka, J.–Wibbelt, G. (2007): New variants of European brown hare syndrome virus (EBHSV) strains in free-ranging European brown hares (*Lepus europaeus*) from Slovakia. *J. Wildl. Dis.* 43: 89–96.
- Hewitt, G. (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.* 68: 87–112.
- Hewitt, G. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Mol. Ecol.* 10: 537–549.
- Hoffmann, A.–Parsons, P. (1997): Extreme environmental change and evolution. Cambridge University Press.
- Kasapidis, P.–Suchentrunk, F.–Magoulas, A.–Kotoulas, G. (2005): The shaping of mitochondrial DNS phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of late pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34: 55–66.
- Librado, P.–Rozas, J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25: 1451–1452.
- Lopez-Martinez, N. (1998): A look to the lagomorph fossil record. [In: Reig, S. (ed.) Abstracts of the Euro-American Mammal Congress.] Universidade de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. 86.
- Mamuris, Z.–Sfougaris, A.–Stamatis, C. (2001): Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biol. Conserv.* 101: 187–196.
- Perez-Suarez, G.–Palacios, F.–Boursot, P. (1994): Speciation and parapatry in western mediterranean hares (*Lepus castroviejoi*, *L. europaeus*, *L. granatensis*, and *L. capensis*) revealed by mitochondrial DNA phylogeny. *Biochem. Genet.* 32: 423–436.
- Pierpaoli, M.–Riga, F.–Trocchi, V.–Randi, E. (1999): Species distinction and evolutionary relationship of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Ecol.* 8: 1805–1817.
- Scandura, M.–Iacolina, L.–Slimen, H. B.–Suchentrunk, F.–Apollonio, M. (2007): Mitochondrial CR-1 Variation in Sardinian Hares and Its Relationships with Other Old World Hares (*Genus Lepus*). *Biochemical Genet.* 45. 3–4: 305–323.
- Stamatis, C.–Suchentrunk, F.–Moutou, K. A.–Giacometti, M.–Haerer, G.–Djan, M.–Vapa, L.–Vukovic, M.–Tvrkovic, N.–Sert, H.–Alves, P. C.–Mamuris, Z. (2009): Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *J. Biol. Geogr.* 36: 515–528.
- Suchentrunk, F.–Jaschke, C.–Haiden, A. (2001): Little allozyme and mtDNA variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from New Zealand and Britain – A legacy of bottlenecks? *Mamm. Biol.* 66: 48–59.
- Taberlet, P.–Fumagalli, L.–Wust-Saucy, A.–Cosson, J. (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* 7: 453–464.
- Tamura, K.–Stecher, G.–Peterson, D.–Filipski, A.–Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.