ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου

Συγκριτική μελέτη φυσιολογικών προσαρμογών στα χερσαία σαλιγκάρια του γένους *Codringtonia* Kobelt 1898

Διδακτορική Διατριβή

Παναγιώτας Α. Κοτσακιόζη
Βιολόγου

ΑΘΗΝΑ 2013

NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Animal & Human Physiology

Comparative study of the physiological adaptations of the land snails of the genus *Codringtonia* Kobelt 1898

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis

Panayiota A. Kotsakiozi
Biologist

ATHENS 2013

Επιβλέπων Καθηγητής

Βαλάκος Δ. Ευστράτιος	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μυλωνάς Μωυσής	Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Κρήτης
Βαλάκος Δ. Ευστράτιος	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ευθυμιόπουλος Σπύρος	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Εφταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γαϊτανάκη Αικατερίνη	Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Μπέης Ισίδωρος	Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Μυλωνάς Μωυσής	Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Κρήτης
Βαλάκος Δ. Ευστράτιος	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ευθυμιόπουλος Σπύρος	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Παφίλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Ζωολογίας & Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Γκιώκας Σίνος	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ) του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστήμιου Αθηνών (ΕΚΠΑ), δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (*Ν. 5343/1932 άρθρο 202*).

Στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 1

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 9

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ 13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ-ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ 15

1.1 Η ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ 17

1.1.2. Η μετάβαση στη σύγχρονη θεώρηση 17

1.2. Η φυλογενετική συγκριτική μέθοδος και ερωτήματα ως προς την εφαρμογή της.... 21

1.3. Προβλήματα και περιορισμοί στην εφαρμογή της φυλογενετικης συγκριτικής μεθόδου 24

1.4. Μεθοδολογία της Φυλογενετικής Συγκριτικής Μεθόδου 25

1.4.1. Φυλογενετική μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων (Independent Contrasts) 26

1.4.2. Γενικευμένο μοντέλο ελαχίστων τετραγώνων (Generalized Least Squares-GLS) 28

1.4.3. Έλεγχος για την ύπαρξη φυλογενετικού σήματος 29

1.5. Το γένος Codringtonia Kobelt 1898 32

1.5.1. Περιγραφή των ειδών Codringtonia 34

1.5.2. Βιολογικός κύκλος 38

1.5.3. Στοιχεία φυσιολογίας 40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ-ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ 43

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 45

2.1.1. Περί φυλογένεσης 46

2.1.2. Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης 47

2.1.3. Έλεγχος φυλογενετικού σήματος 54

2.1.4. Μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης 54
2.1.5. Μοριακό ρολόι 55
2.1.6. Το μιτοχονδριακό DNA στη φυλογένεση 58
2.1.7. Η φυλογένεση στη Βιογεωγραφία 59
2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 63
2.2.1. Πληθυσμοί μελέτης 63
2.2.2. Μοριακοί σημαντές 63
2.2.3. Εξαγωγή γενετικού υλικού, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR. 67
2.2.4. Μεθοδολογία ανάλυσης 69
2.2.4.1. Διόρθωση και στοίχιση αλληλουχιών 69
2.2.4.2. Συνδυασμένη ή ανεξάρτητη ανάλυση; 70
2.2.4.3. Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης ... 70
2.2.4.4. Εκτίμηση αποστάσεων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 71
2.2.4.5. Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης και στατιστικός έλεγχος των φυλογενετικών δένδρων 71
2.2.4.6. Μοριακό ρολόι και εκτίμηση του χρόνου απόκλισης των κλάδων 73
2.2.4.7. Προτείνοντας βιογεωγραφικό σενάριο 75
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 78
2.3.1. Ανάλυση αλληλουχιών 78
2.3.2. Φυλογενετικές αναλύσεις 81
2.3.2.1. Χρόνος απόκλισης των κλάδων 82
2.3.2.2. Βιογεωγραφικό σενάριο 86
2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 91
2.4.1. Επίπεδα διαφοροποίησης, φυλογένεση και ζητήματα ταξινομικής 91
2.4.2. Βιογεωγραφία και χρόνος διαφοροποίησης 93

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ 95
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 97
3.1.1. Στοιχεία μορφομετρίας 97
3.1.2. Τα χερσαία γαστερόποδα στη μελέτη της μορφολογίας 98
3.1.3. Στόχοι και ερωτήματα 100
3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 101
3.2.1. Πληθυσμοί της μελέτης 101
3.2.2. Μετρήσεις στο κέλυφος 103
3.2.3. Κλιματικά χαρακτηριστικά 108
3.2.4. Μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών 109
3.2.5. Αναλύσεις λαμβάνοντας υπ' όψιν τη φυλογένεση 112
3.2.5.1. Δια-ειδική και ενδο-ειδική κελυφική ποικιλότητα 112
3.2.5.2. Έλεγχος για την ύπαρξη φυλογενετικού σήματος και πρότυπα διαφοροποίησης των χαρακτήρων 115
3.2.5.3. Κελυφική ποικιλότητα: η σχετική συνεισφορά του χώρου, του κλίματος και της φυλογένεσης 119
3.2.6. Λογισμικό για τις στατιστικές δοκιμασίες 122
3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 123
3.3.1. Μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών 123
3.3.2. Σχετική συμβολή της δια-ειδικής και ενδο-ειδικής ποικιλότητας στη συνολική μορφολογία του κελύφους 129
3.3.3. Φυλογενετικό σήμα και πρότυπα διαφοροποίησης 129
3.3.4. Σχετική συμβολή του κλίματος, του χώρου και της φυλογένεσης στον προσδιορισμό της κελυφικής ποικιλότητας 132
3.3.4.1. Κλίμα 135
3.3.4.2. Χώρος 135
3.3.4.3. Φυλογένεση 138

3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 141
3.4.1. Μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών 141
3.4.2. Κατάτμηση της μορφολογικής ποικιλότητας του κελύφους κατά μήκος της φυλογένεσης: η σχετική συμβολή των ειδών και των πληθυσμών 142
3.4.3. Φυλογενετικό σήμα και πρότυπα διαφοροποίησης των χαρακτήρων 144
3.4.4. Μορφολογική ποικιλότητα του κελύφους: η σχετική συμβολή του κλίματος, του χώρου και της φυλογένεση 145
3.4.5. Συμπερασματικά 148
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ-ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΩΝ 151
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 153
4.1.1. Υδατικό ισοζύγιο 154
4.1.2. Αρχές μεταβολισμού-παραγωγή ενέργειας 155
4.1.2.1. Αναερόβιος μεταβολισμός 155
4.1.2.2. Αερόβιος μεταβολισμός 156
4.1.3. Η φυσιολογία της διάπαυσης 157
4.1.5. Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins) 160
4.1.6. Στόχοι-Ερωτήματα 162
4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 163
4.2.1. Βιοχημικές αναλύσεις 163
4.2.1.1. Πληθυσμοί μελέτης 165
4.2.1.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών 166
4.2.1.3. Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκογόνου 166
4.2.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός λιπιδίων 167
4.2.1.5. Προσδιορισμός της δραστικότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) 167
4.2.1.6. Στατιστική επεξεργασία 168
4.2.2. Υδατικό περιεχόμενο και ρυθμός απώλειας νερού 171

4.2.2.1 Εποχική μεταβολή του υδατικού περιεχομένου στο πεδίο 172
4.2.2.2. Ρυθμός απώλειας νερού.....172
4.2.2.3. Στατιστική επεξεργασία 173
4.2.3. Επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού στρες.....176
4.2.3.1. Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 με PCR αντίστροφης μεταγραφής 176
4.2.3.2. Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 με ανάλυση κατά Western 179
4.2.3.3. Στατιστική επεξεργασία 181
4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....183
4.3.1. Βιοχημικές αναλύσεις.....183
4.3.1.1. C. parnassia 183
4.3.1.2. C. intusplicata 186
4.3.1.3. C. eucineta.....188
4.3.1.4. Δια-ειδική σύγκριση 198
4.3.1.5. Σχέση με γεωγραφικούς και κλιματικούς παράγοντες.....203
4.3.1.6. Υψομετρική διαφοροποίηση.....211
4.3.2. Υδατικό περιεχόμενο και ρυθμός απώλειας νερού.....211
4.3.2.1. Εποχική μεταβολή στο υδατικό περιεχόμενο.....211
4.3.2.2. Ρυθμός απώλειας νερού.....216
4.3.3. Επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ 218
4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....225
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ-ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....243
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....259
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....277
SUMMARY.....283
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 289

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή άρχισε το 2007 στον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευστράτιου Βαλάκου και σε αυτή ενεπλάκησαν, με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, πολλοί άνθρωποι. Ως εκ τούτου οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσοι βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτού του εγχειρήματος.

Πρώτα από όλους τον Αναπλ. Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ευστράτιο Βαλάκο που είχε επωμιστεί την επίβλεψη αυτής της διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την πολύτιμη βοήθεια του, τις συμβουλές και την υποστήριξη που μου παρείχε τόσο στο καθαρά επιστημονικό κομμάτι όσο και σε άλλα πρακτικά και προσωπικά προβλήματα που προέκυπταν όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Μωυσή Μυλωνά και τον Αναπληρ. Καθηγητή κ. Σπύρο Ευθυμιόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια τους καθ᾽ όλη τη διάρκεια της διατριβής. Ευχαριστώ θερμά τα άλλα μέλη της εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή κ. Ι. Μπέη, την Καθηγήτρια κ. Αικ. Γαϊτανάκη και τους Επικ. Καθηγητές κ. Π. Παφίλη και κ. Σ. Γκιώκα που συνέβαλαν με τις καλοπροαίρετες παρατηρήσεις τους στη διόρθωση και βελτίωση του παρόντος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Καθηγήτρια κ. Αικ. Γαϊτανάκη και τη Λέκτορα κ. Ι.Κ. Αγγελή για τη φιλοξενεία στα εργαστήρια τους και την πολύτιμη βοήθεια τους για την ολοκλήρωση των μετρήσεων της έκφρασης των Hsp. Χωρίς την καθοριστική συνεισφορά τους, αυτό το κομμάτι της διατριβής δεν θα είχε ολοκληρωθεί. Ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Κατερίνα Βαρδινογιάννη από το Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης, τον κ. Z. Feher από το Hungarian Museum of Natural History, τον Δρ. E. Newbert και τον Καθ. κ. E. Gittenberger για την παραχώρηση δειγμάτων *Codringtonia*. Θερμά ευχαριστώ επίσης τον Επικ. Καθηγητή κ. Σίνο Γκιώκα για τη συλλογή και παραχώρηση δειγμάτων από την Πελοπόννησο καθώς και για τη φιλοξενεία στο εργαστήριο του στο Πανεπιστήμιο Πατρών για την πραγματοποίηση πειραμάτων που αφορούσαν τη διατριβή. Ευχαριστώ επίσης τον Επικ. Καθηγητή Π. Παφίλη καθώς δεν ξεχνώ ότι με τη βοήθεια του έκανα τα πρώτα μου βήματα στον κόσμο των βιοχημικών αναλύσεων. Θα ήθελα να εκφράσω την υποχρέωση μου στον Peter Subai για την παροχή βιβλιογραφικού υλικού καθώς και στον Επικ. Καθηγητή Κώστα Τριάντη για τις συζητήσεις μας σε θέματα που σχετίζονταν με τη διατριβή και τις δημοσιεύσεις καθώς

επίσης και για τη συμβολή του στη συλλογή βιολογικού υλικού και σχετικής βιβλιογραφίας.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Επικ. Καθηγητή Α. Παρμακέλη για την πολύπλευρη και πολύτιμη βοήθεια του σε πολλά θέματα της διατριβής αυτής αλλά κυρίως για τη συντροφιά του στο πεδίο καθώς και για την καθογήση και την εκπαίδευση που μου παρείχε στο κομμάτι της μοριακής φυλογένεσης και της μορφομετρίας.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω στον φίλο και συνάδελφο Κώστα Σαγώνα χωρίς τη βοήθεια του οποίου όλα θα ήταν πολύ πιο δύσκολα, κυρίως τον ευχαριστώ όμως για το χαμόγελο του και την υπομονή που έδειξε μαζί μου όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαιτέρως ευχαριστώ τις συναδέλφους και συνοδοιπόρους Δρ. Όλγα Μαυροφρύδη και Κίρκη Ζηκάκη για τη συμπαράσταση αλλά κυρίως για την υπομονή τους να με ακούνε… Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους Σοφία Τερζοπούλου, Κατερίνα Μπαλανίκα, Θάνο Μουρίκη, Τάσο Κωνσταντάκη και Ειρήνη Παπανικολάου, Ιωάννα Τσίντζουρα και Πάρη Σιταρά για την καλή τους διάθεση, την υποστήριξη αλλά και για τα ευχάριστα διαλείματα από την εργαστηριακή δουλειά. Ευχαριστώ θερμά τον συνάδελφο Francois Rigal καθώς με εισήγαγε στον μαγικό κόσμο της R, τον ευχαριστώ επίσης για τις πολύωρες συζητήσεις μας και τις συμβουλές του σε θέματα στατιστικής.

Θερμά ευχαριστώ επίσης την Επικ. Καθηγήτρια κ. Π. Παπαζαφείρη και την Επικ. Καθηγήτρια κ. Ο. Τσιτσιλώνη καθώς και όλα τα μέλη του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου για τη ζεστή ατμόσφαιρα και τη βοήθεια τους.

Ξεχωριστό και σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε η οικογένεια μου (οι γονείς μου Μένη και Αντώνης, η αδελφή μου Ευστρατία και ο αδελφός μου Ιγνάτιος), χωρίς την υποστήριξη, τη συμπαράσταση και την ενθάρυνση των οποίων τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί, γι’ αυτό και από τα βάθη της καρδιάς μου τους ευχαριστώ και τους το αφιερώνω.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

16S rDNA: γονίδιο για τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, (16S ribosomal DNA)
AIC: κριτήριο του Akaike (Akaike Information Criterion)
AL: μήκος ανοίγματος (Aperture Length)
ANOVA: ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance)
ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Triphosphate)
AUC: περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under Curve)
BD: Διάμετρος κελύφους (Body Diameter)
BH: ύψος κελύφους (Body Height)
CCSM: Community Climate System Model (μαθηματικό μοντέλο για την άντληση κλιματικών δεδομένων)
cDNA: συμπληρωματικό DNA (complementary DNA)
COI: υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Cytochrome Oxidase subunit I)
COII: υπομονάδα II της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Cytochrome Oxidase subunit II)
CTAB: βρωμιούχο εξαδεκυλ-τριμεθυλ-αμμώνιο (Hexadecyltrimethylammonium Bromide)
CVA: Ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (Canonical Variate Analysis)
DA: Ανάλυση Διάκρισης (Discriminant Analysis)
DEPC: διαιθυλ-πυροκαρβονικό οξύ (Diethylpyrocarbonate)
DIVA: ανάλυση διασποράς βικαριανισμού (Dispersal-Vicariance Analysis)
dNTPs: δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotides)
DTT: διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol)
EDTA: αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ESS: δραστικό μέγεθος δείγματος (Effective Sample Size)
GLS: Γενικευμένο μοντέλο ελαχίστων τετραγώνων (Generalized Least Squares)
HKY: μοντέλο των Hasegama, Kishino και Yano
Hsp: πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (Heat shock proteins)
HVMs: ιεραρχικά μοντέλα βικαριανισμού (Hierarchical Vicariance Models)
HVP: ιεραρχική κατάτμηση διακύμανσης (Hierarchical Variance Partitioning)
IL: μήκος εσωτερικού χείλους (Inner Lip)
KCN: κυανιούχο κάλιο (Potassium Cyanide)
LDH: γαλακτική αφυδρογονάση (Lactate dehydrogenase)
LGM: μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου (Last Glacial Maximum)
LRT: δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test)
MCMCMC: μέθοδος Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo
MD: διάμετρος ανοίγματος (Mouth Diameter)
MH: ύψος ανοίγματος (Mouth Height)
MIROC: Model for Interdisciplinary Research On Climate (μαθηματικό μοντέλο για την άντληση κλιματικών δεδομένων)
mtDNA: μιτοχονδριακό DNA (mitochondrial DNA)
NADH: Νικοτιναμιδο αδενινοδινουκλεοτίδιο (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)
NUW: πλάτος χωρίς τον ομφαλό (Non Umbilicus Width)
PC1: κύρια συνιστώσα 1 (Principal Component 1)
PC2: κύρια συνιστώσα 2 (Principal Component 2)
PC3: κύρια συνιστώσα 3 (Principal Component 3)
PCA: ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis)
PCNM: μέθοδος των Κυρίων Συντεταγμένων Πινάκων Γειτνίασης (Principal Coordinates of Neighbor Matrices)
PcoA: Ανάλυση Κυρίων Συντεταγμένων (Principal Coordinate Analysis)
PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

PGLS: Φυλογενετική Γενικευμένη Μέθοδος Ελαχίστων Τετραγώνων (Phylogenetic Generalized Least Squares)
PMSF: φθοριούχο μεθυλ-φαινυλ-σουλφονύλιο (phenylmethylsulfonyl fluoride)
PSR: μέθοδος της αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (Phylogenwtic Signal Representation)
PVR: ανάλυση παλινδρόμησης φυλογενετικών ιδιοδιανυσμάτων (Phylogenetic Eigenvector Regression)
QE: τετραγωνική εντροπία (Quadratic Entropy)
Rsq: R^2 (R square)
RT-PCR: PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcriptase PCR)
SD: διάμετρος του κελύφους (Shell Diameter)
SDS: δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate)
SH: ύψος κελύφους (Shell Height)
SI: δείκτης σπειρών (Spire Index)
TrN: μοντέλο των Tamura και Nei
Ts: μεταπτώσεις (Transitions)
Tv: μεταστροφές (Transversions)
VIF: παράγοντας πληθωριστικής διακύμανσης (Variance Inflation Factor)
ΓΜ: Γεωγραφικό Μήκος
ΓΠ: Γεωγραφικό Πλάτος
ΜΠ: Μέγιστη Πιθανοφάνεια
ΜΣ: Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία
ΜΦ: Μέγιστη Φειδωλότητα
ΥΨ: Υψομέτρο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ-ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I have long felt that biology ought to seem
as exciting as a mystery story,
for a mystery story is exactly what biology is.
Richard Dawkins

1.1 Η ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

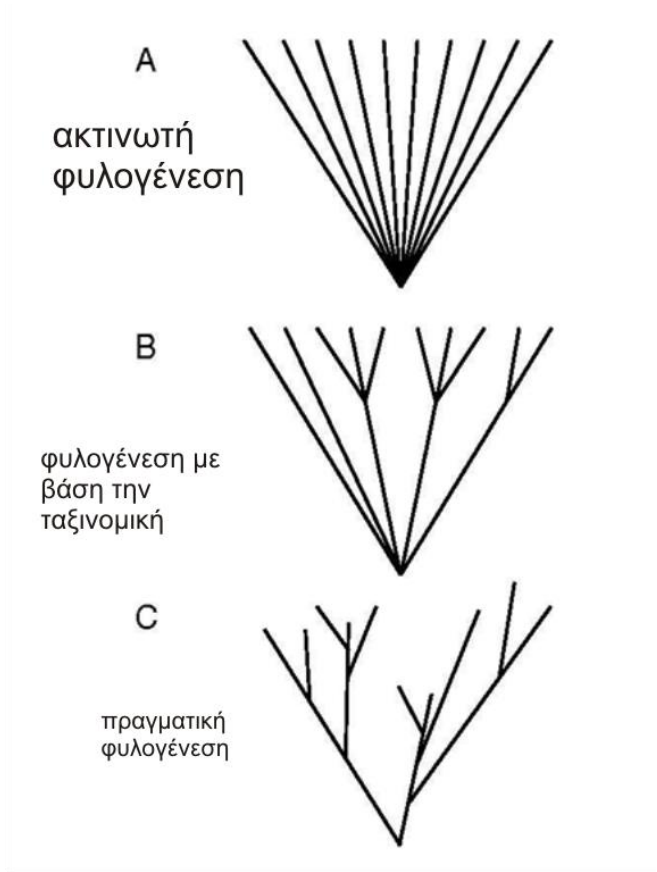
Από την αρχαιότητα ως σήμερα, φιλόσοφοι και επιστήμονες στην προσπάθεια τους να βρουν την «κρυμμένη» τάξη στη φύση, έχουν χρησιμοποιήσει δύο βασικές προσεγγίσεις. Η πρώτη ήταν η αναζήτηση νόμων που να μπορούν να εξηγήσουν τις κανονικότητες που παρατηρούνται και η δεύτερη ήταν η αναζήτηση των «σχέσεων». Ως προς τη δεύτερη προσέγγιση, φυσικά δεν αναζητούσαν φυλογενετικές σχέσεις αλλά απλά «τι κοινό υπάρχει μεταξύ…» και αυτό μπορούσε να επιτευχθεί μόνο μέσω της σύγκρισης. Η σύγκριση των οργανισμών, επομένως είναι αρχαίο ανθρώπινο εγχείρημα και γινόταν για διάφορους λόγους (Sanford, Lutterschmidt & Hutchison, 2002). Στην αρχή ήταν κάτι εντελώς εμπειρικό, αλλά μετά το 1859 και τη θεωρία του Δαρβίνου περί κοινής καταγωγής, άρχισε να γίνεται σιγά-σιγά επιστημονική μέθοδος. Η «συγκριτική μέθοδος», η σύγκριση δηλαδή πληθυσμών, ειδών ή ανώτερων ταξινομικών μονάδων έχει γίνει η πιο κοινή και παραγωγική μέθοδος για την αποκάλυψη και τη μελέτη εξελικτικών διαδικασιών που έλαβαν χώρα στο παρελθόν (Harvey & Pagel, 1991). Μάλιστα ήταν τόσο μεγάλη η επιτυχία της μεθόδου που σταδιακά άρχισε να χρησιμοποιείται σε διάφορους κλάδους της επιστήμης της βιολογίας (και όχι μόνο), έτσι προέκυψαν η συγκριτική φυσιολογία, η συγκριτική εμβρυολογία, η συγκριτική ψυχολογία κλπ (Mayr, 1997).

1.1.2. Η μετάβαση στη σύγχρονη θεώρηση

Μέχρι και πριν από 20 χρόνια περίπου όταν επιχειρούνταν κάποια συγκριτική ανάλυση μεταξύ ειδών (ή πληθυσμών ή και ανώτερων του είδους ταξινομικών μονάδων), χρησιμοποιούνταν συμβατικές στατιστικές μέθοδοι προκειμένου να εξεταστούν οι σχέσεις μεταξύ κάποιων χαρακτήρων (π.χ. μεταβολικός ρυθμός και μέγεθος σώματος) ή μεταξύ ενός χαρακτήρα και ενός περιβαλλοντικού παράγοντα (π.χ. ικανότητα του αίματος για μεταφορά οξυγόνου και υψόμετρο). Ωστόσο μια τέτοια προσέγγιση, εκ των προτέρων κάνει τη σιωπηρή παραδοχή ότι όλα τα δεδομένα (π.χ. οι μέσοι όροι για τα γνωρίσματα μιας σειράς ειδών) είναι στατιστικά ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Στην πραγματικότητα όμως, ο μέσος φαινότυπος μιας βιολογικής ταξινομικής μονάδας συνήθως ***δεν είναι στατιστικά ανεξάρτητος*** από τον φαινότυπο άλλων μονάδων, καθώς όλοι ***οι οργανισμοί σχετίζονται*** μεταξύ τους, ***μέσω της φυλογενετικής τους ιστορίας***. Με άλλα λόγια, τα είδη που είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους τείνουν να μοιάζουν (σε επίπεδο μορφολογίας, φυσιολογίας κλπ) περισσότερο μεταξύ τους (Garland, Bennett & Rezende, 2005). Οι μέθοδοι που δεν

ενσωματώνουν τη φυλογενετική πληροφορία, ουσιαστικά «δέχονται» ότι όλες οι υπό μελέτη ομάδες (π.χ. τα είδη) είναι μεταξύ τους το ίδιο σχετιζόμενα, ότι προήλθαν δηλαδή όλα από ακτινωτή φυλογένεση (Εικόνα 1.1.Α) ενώ στην πραγματικότητα οι εξελικτικές σχέσεις είναι ιεραρχημένες (Εικόνα 1.1.C). Η ακτινωτή φυλογένεση, (Εικόνα 1.1.Α) δείχνει ότι ένα σύνολο ειδών προήλθαν από έναν κοινό πρόγονο την ίδια χρονική στιγμή στο παρελθόν. Στην πραγματικότητα όμως κάποια είδη μπορεί να είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους από ότι με κάποια άλλα είδη και αυτό δεν είναι δυνατόν να αποκαλυφθεί αν κάποιος εξετάσει αποκλειστικά τους χαρακτήρες που προσπαθεί να μελετήσει. Αρκετές πρόσφατες μελέτες (π.χ. (Ackerly, 2004; Blomberg, Garland & Ives, 2003; Freckleton, Harvey & Pagel, 2002)) δείχνουν ότι τα περισσότερα γνωρίσματα δείχνουν «φυλογενετικό σήμα» υποδεικνύοντας ότι η ακτινωτή φυλογένεση συνήθως δεν ταιριάζει με τα δεδομένα που εξετάζονται.

Έτσι, προέκυψε η ***ανάγκη για ενσωμάτωση της φυλογενετικής πληροφορίας*** στις συγκριτικές μελέτες. Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, οι συγκριτικές μελέτες άλλαξαν σε μεγάλο βαθμό καθώς άρχισε (και σταδιακά επικράτησε) σε κάθε τέτοια προσέγγιση να λαμβάνονται πλέον υπ' όψιν και οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που μελετώνται. Μάλιστα ο Sanford *και συν. (2002)* προτείνουν αυτή η νέα τάση να ονομάζεται «***συγκριτική φυλογενετική μέθοδος***». Η αρχή της μετάβασης στις σύγχρονες συγκριτικές φυλογενετικές μεθόδους σηματοδοτείται από την έκδοση του βιβλίου του Ridley (1983) με τίτλο «The Explanation of Organic Diversity: The Comparative Method and Adaptations for Mating» και από το άρθρο του Felsenstein (1985) με τίτλο «Phylogenies and the Comparative Method». Και οι δύο υποστηρίζουν την ανάγκη ενσωμάτωσης των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών στις αναλύσεις συγκριτικών δεδομένων. Ωστόσο, αυτοί οι συγγραφείς δεν ήταν οι μόνοι που υποστήριξαν την ιδέα αυτή, και άλλοι ερευνητές υποστήριζαν, την ίδια περίπου περίοδο, ότι όταν συγκρίνονται είδη που σχετίζονται με κάποιο τρόπο μεταξύ τους λόγω της φυλογενετικής τους ιστορίας παραβιάζονται οι βασικές υποθέσεις των συμβατικών στατιστικών μεθόδων (Harvey & Pagel, 1991). Ο ***Felsenstein*** (1985) όμως, πρότεινε την ***πρώτη ολοκληρωμένη μέθοδο*** που μπορούσε να ενσωματώνει σε διάφορα δεδομένα, την πληροφορία που αφορούσε την τοπολογία και το μήκος των κλάδων του φυλογενετικού δέντρου των υπό εξέταση ομάδων (π.χ. ειδών), τη ***μέθοδο των ανεξάρτητων αντιθέσεων*** (Independent Contrasts).



Εικόνα 1.1. Α. Απεικόνιση της παραδοχής που κάνουν οι συμβατικές στατιστικές αναλύσεις (ακτινωτή φυλογένεση με ίσου μήκους κλάδους). Αυτό το μοντέλο θεωρεί ότι οι τιμές στα άκρα των κλάδων (μέσοι κάποιου γνωρίσματος για 10 είδη) είναι στατιστικώς ανεξάρτητες και ομοίως κατανεμημένες. Β. φυλογενετικό δέντρο που μπορεί να προέκυψε από πληροφορίες ταξινομικής π.χ. να αντιπροσωπεύονται 5 γένη μιας οικογένειας (οι 5 μεγάλοι κλάδοι του δέντρου) και επομένως γίνεται η παραδοχή ότι τα γένη είναι μη σχετιζόμενες ομάδες χωρίς καμία ιεραρχική δομή μεταξύ τους, και σε καθένα περιέχονται ένα, τρία ή δύο σύνολα δεδομένων (ανάλογα με τον αριθμό των μικρών κλάδων στα άκρα). C. Απεικόνιση πραγματικής φυλογένεσης όπου φαίνονται ιεραρχικές σχέσεις και οι κλάδοι διαθέτουν ασύγχρονα άκρα. Τα ασύγχρονα άκρα μπορεί να δείχνουν εξαφανισμένα τάξα που μπορεί να συμπεριλαμβάνονται στο σύνολο δεδομένων που εξετάζεται ή ότι ο ρυθμός εξέλιξης διαφέρει μεταξύ των κλάδων. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Garland, Bennett και Rezende (2005).

Σήμερα, ωστόσο σε πολλές φυσιολογικές, βιοχημικές, μορφολογικές και συμπεριφορικές μελέτες, εφαρμόζονται πολλές νέες αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται στη φυλογένεση οι οποίες αναπτύχθηκαν ραγδαία και ενσωματώθηκαν στη «συγκριτική μέθοδο». Οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες, και πιο κατανοητές, φυλογενετικές στατιστικές μέθοδοι είναι η μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων (Independent Contrasts), και τα μοντέλα ελαχίστων τετραγώνων (Generalized Least-Squares). Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση ποσοτικών χαρακτήρων (συνεχείς μεταβλητές), όπως είναι τα περισσότερα φυσιολογικά χαρακτηριστικά (π.χ. ο μεταβολικός ρυθμός, η ενζυμική ενεργότητα κ.ά.). Επιπρόσθετα οι μέθοδοι αυτές μπορούν εύκολα να ενσωματώσουν ανεξάρτητες μεταβλητές που θεωρούνται

ξεχωριστές κατηγορίες όπως οι διατροφικές συνήθειες των οργανισμών (εντομοφάγα ζώα κ.ά.) ή το ενδιαίτημα στο οποίο ζουν (π.χ. γλυκό ή αλμυρό νερό).

Βέβαια στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η «επανάσταση» αυτή στη συγκριτική μέθοδο δεν προέκυψε ξαφνικά αλλά ήταν το φυσικό επακόλουθο μιας σειράς σημαντικών θεωρητικών εξελίξεων, μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικές ήταν:

✓ η κατανόηση του ότι επειδή όλοι οι οργανισμοί σχετίζονται μεταξύ τους με διαφορετικό τρόπο, ***τα τάξα δεν μπορεί να θεωρούνται ανεξάρτητα*** το ένα από το άλλο για στατιστικούς λόγους.

✓ Τα τάξα που χρησιμοποιούνται στις συγκριτικές αναλύσεις πρέπει να επιλέγονται με ***κριτήρια*** τις ***φυλογενετικές τους σχέσεις*** καθώς και το ***πεδίο της έρευνας***. Παρ' όλο που υπάρχουν κατάλληλες μέθοδοι που μπορούν να εξαιρέσουν την επίδραση της φυλογένεσης από τα δεδομένα που εξετάζονται (π.χ. αποφυγή μεγεθυμένου σφάλματος τύπου I), η επιλογή των ειδών που θα μελετηθούν με βάση τις φυλογενετικές πληροφορίες που διαθέτουμε μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στο να αποκαλυφθούν οι σχέσεις μεταξύ των χαρακτήρων που εξετάζονται (βλ. (Garland *και συν.*, 1993)).

✓ Η ενσωμάτωση φυλογενετικών δεδομένων σε μια ανάλυση αυξάνει την ***ποιότητα*** και επηρεάζει τη ***μορφή*** των συμπερασμάτων σε σχέση με το να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά και μόνο συγκριτικά δεδομένα. Ο όρος «ποιότητα» αναφέρεται στο ότι η προσθήκη φυλογενετικών πληροφοριών σε μία συγκριτική ανάλυση αυξάνει, συχνά σε σημαντικό βαθμό, την ποσότητα των δεδομένων που έχει κανείς στη διάθεση του για να απαντήσει σε ένα συγκεκριμένο ερώτημα. Αντίθετα, ο όρος «μορφή» αναφέρεται σε αναλύσεις που μπορούν να γίνουν μόνο υπό το πρίσμα της φυλογένεσης, όπως η ανακατασκευή προγονικών καταστάσεων ή η σύγκριση των ρυθμών εξέλιξης μεταξύ γενεαλογικών γραμμών.

1.2. Η ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΙ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι σαφές ότι η φυλογένεση μπορεί να επηρεάσει τη στατιστική ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, επειδή οι συμβατικές στατιστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στα συγκριτικά δεδομένα, υπερεκτιμούν τον αριθμό των ανεξάρτητων παρατηρήσεων, συχνά οδηγούνται σε μεγεθυμένο σφάλμα τύπου Ι δηλαδή απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση ενώ είναι αληθής (Díaz-Uriarte & Garland, 1996; Grafen, 1989; Martins & T. Garland, 1991; Purvis, Gittleman & Luh, 1994). Υπάρχουν πραγματικά παραδείγματα από τη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι όντως μπορεί να υπάρξει διαφορετική ερμηνεία των αποτελεσμάτων μιας μελέτης ανάλογα με το αν θα ληφθεί υπ' όψιν ή όχι η επίδραση της φυλογένεσης (π.χ. (Garland, Huey & F.Bennett, 1991)).

Κάθε φορά όμως που κάποιος ερευνητής επιχειρεί να πραγματοποιήσει μια συγκριτική μελέτη καλείται πρώτα να δώσει απαντήσεις σε μια σειρά από ερωτήματα. Το πρώτο ερώτημα είναι ***τι είδους χαρακτήρες προσφέρονται για συγκριτικές φυλογενετικές αναλύσεις;*** Πρακτικά οποιοδήποτε μετρήσιμο χαρακτηριστικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια συγκριτική μελέτη. Μπορεί το χαρακτηριστικό αυτό να είναι ένας χαρακτήρας που λαμβάνει συνεχείς τιμές, π.χ. η διάμετρος του κελύφους των σαλιγκαριών ή να είναι κάποια διακριτή μεταβλητή π.χ. παρουσία ή απουσία ενός γνωρίσματος. Επίσης οι μέθοδοι αυτές μπορούν να συμπεριλάβουν στοιχεία οικολογίας (π.χ. εύρος οικολογικού θώκου), καθώς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. μέση θερμοκρασία). Ωστόσο, σε τέτοιου είδους μελέτες απαιτείται η ελαχιστοποίηση της επίδρασης του περιβάλλοντος στους χαρακτήρες που μελετώνται, κάτι που φυσικά για πολλά είδη δεν είναι εφικτό. Επιπλέον, επειδή τα υπό μελέτη είδη βρίσκονται σε περιοχές που μπορεί διαφέρουν ως προς τις περιβαλλοντικές συνθήκες, προκύπτει άλλο ένα ερώτημα που αφορά τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν και τα πράγματα γίνονται ακόμα πιο περίπλοκα όταν ο φαινότυπος διαφέρει εξαιτίας της αλληλεπίδρασης γονοτύπου και περιβάλλοντος. Η αλήθεια είναι ότι για τους προβληματισμούς αυτούς δεν υπάρχει ικανοποιητική απάντηση, το σίγουρο όμως είναι ότι πρέπει κάθε φορά να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την ανάλυση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Garland *και συν.*, 2005).

Το δεύτερο ερώτημα είναι: ***τι είδους χαρακτήρες απαιτούν φυλογενετική ανάλυση;*** Παρόλο που γενικά περιμένει κανείς οι περισσότεροι χαρακτήρες να ακολουθούν τη φυλογένεση, αυτό είναι ένα εμπειρικό ερώτημα. Η απλούστερη δυνατή

δοκιμασία για να εξετάσουμε αν οι συγγενικοί οργανισμοί μοιάζουν μεταξύ τους περισσότερο από ότι κάποιοι οργανισμοί που θα επιλέγονταν τυχαία στο φυλογενετικό δένδρο, είναι η διαδικασία της τυχαιοποίησης (randomization) (βλ. π.χ. (Ackerly, 2004; Laurin, 2004). Πιο συγκεκριμένα, στη μέθοδο αυτή εφαρμόζεται η μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων και στη συνέχεια υπολογίζεται η διασπορά των τιμών αυτών. Για να καθοριστεί η ύπαρξη ή μη φυλογενετικού σήματος (δηλαδή αν τα πιο συγγενικά είδη όντως μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους), συγκρίνεται η τιμή αυτή με τη διασπορά που προκύπτει από μία διαδικασία τυχαιοποίησης (βλ. επίσης κεφάλαιο 3), τυχαίας αναδιάταξης μεταξύ των άκρων στους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου (Blomberg & Garland, 2002; Blomberg *και συν.*, 2003). Σε μελέτες στις οποίες εξετάστηκαν περισσότερα από 20 είδη φάνηκε να υπάρχει φυλογενετικό σήμα σε περισσότερο από το 90% των χαρακτήρων που εξετάστηκαν (χαρακτήρες φυσιολογίας, συμπεριφοράς, στρατηγικών ζωής κ.ά.) (Al-kahtani *και συν.*, 2004; Ashton, 2004; Blomberg *και συν.*, 2003; Freckleton *και συν.*, 2002; Rezende, Bozinovic & Garland, 2004). Οι εμπειρικές μελέτες δείχνουν ξεκάθαρα ότι μια επιλυμένη φυλογένεση ερμηνεύει καλύτερα τους υπό μελέτη χαρακτήρες από ότι μια ακτινωτή φυλογένεση για αυτό και είναι πολύ σημαντικό να ενσωματώνεται η φυλογενετική πληροφορία στις συγκριτικές μελέτες. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι μια οποιαδήποτε μελέτη στην οποία λαμβάνεται υπ' όψιν η φυλογένεση μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα από μια απλή συγκριτική μελέτη. Για αυτό και είναι ζωτικής σημασίας οι ερευνητές να εξετάζουν αυστηρά τα δεδομένα τους, για να εντοπίσουν τυχόν αποκλίσεις από τις παραδοχές που κάνει η κάθε ανάλυση (αναλυτική συζήτηση γίνεται σε αρκετές εργασίες (π.χ. (Blomberg *και συν.*, 2003; Freckleton *και συν.*, 2002; Garland *και συν.*, 1993; Laurin, 2004) γιατί σε οποιαδήποτε περίπτωση παραβιάζονται οι παραδοχές της ανάλυσης (βλ. (Díaz-Uriarte & Garland, 1996; Diniz-Filho & Torres, 2002; Grafen, 1989; Martins & T. Garland, 1991) μπορεί κανείς να οδηγηθεί σε εσφαλμένα συμπεράσματα.

Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα που υπάρχει σε τέτοιου είδους μελέτες αφορά ***τα μήκη των κλάδων*** (του δέντρου) που πρέπει να χρησιμοποιούνται. Δεδομένης της ανακρίβειας που υπάρχει σχετικά με τα μήκη των κλάδων, πολλοί ερευνητές πραγματοποιούν τις αναλύσεις τους χρησιμοποιώντας διαφορετικά μήκη κλάδων κάθε φορά προκειμένου να βρουν τα σημεία σύγκλισης των αποτελεσμάτων τους (π.χ. (Ross *και συν.*, 2004)). Τις περισσότερες φορές τα αποτελέσματα είναι σχετικά σταθερά και ανεξάρτητα από τα μήκη των κλάδων, ορισμένες φορές όμως έχει ιδιαίτερη σημασία η χρήση των βέλτιστων μηκών κλάδων και του μετασχηματισμού τους. Για παράδειγμα υπάρχουν περιπτώσεις (π.χ. (Garland *και συν.*, 1993), (Hutcheon & Garland, 2004)) που

οι σχέσεις μεταξύ κάποιων χαρακτήρων αποκαλύφθηκαν μόνο όταν εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός του μήκους των κλάδων όπως προτείνεται από τους Blomberg *και συν.* (2003).

Το τελευταίο κρίσιμο ερώτημα είναι ***πώς επιλέγονται τα προς μελέτη είδη;*** Παραδοσιακά τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την επιλογή των ζώων για συγκριτικές μελέτες είναι η ευκολία ως προς τη συλλογή των δεδομένων (π.χ. ύπαρξη βιβλιογραφίας, βάσης δεδομένων, τοπική διαθεσιμότητα κλπ), η εμφάνιση ενδιαφέροντων βιολογικών γνωρισμάτων (π.χ. ο μακρύς λαιμός της καμηλοπάρδαλης), η κατάληψη κάποιου ακραίου ενδιαιτήματος (π.χ. η ζεστή και ξηρή έρημος) ή χαρακτηριστικά που επιτρέπουν τη μελέτη μιας συγκεκριμένης φυσιολογικής διαδικασίας (Garland & Adolph, 1994; Garland & Carter, 1994). Συχνά για να αυξηθεί η αναλυτική ισχύς περιλαμβάνονται αρκετά είδη που εκτίθενται σε μεγάλο εύρος κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα. Το ερώτημα που παραμένει είναι το αν θα έπρεπε η μελέτη να περιλαμβάνει μία μεγάλη ταξινομική βαθμίδα (π.χ. όλα τα γαστερόποδα) ή να εστιάσει σε μια συγκεκριμένη γενεαλογική γραμμή (π.χ. μια οικογένεια ή ένα γένος των γαστεροπόδων). Από άποψη σχεδιασμού η δεύτερη στρατηγική είναι προτιμότερη καθώς μια πιο ευρεία σύγκριση περιλαμβάνει μακρινούς συγγενείς οι οποίοι μπορεί να διαφέρουν σε πολλά γνωρίσματα και έτσι να κάνουν αρκετά πολύπλοκη τη μελέτη και την ανάλυση των γνωρισμάτων στα οποία εστιάζεται η μελέτη. Από φυλογενετική άποψη, συγκρίσεις με μακρινούς συγγενείς είναι σαν πείραμα με πολλές μη ελεγχόμενες μεταβλητές (Garland & Adolph, 1994). Μάλιστα υπάρχουν παραδείγματα από τη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι το να διευρύνεται πολύ μια μελέτη (δηλαδή να εστιάζει σε κάποια μεγάλη ταξινομική ομάδα π.χ. όλα τα πτηνά) μπορεί να μειώσει τη στατιστική της ισχύ (Garland & Ives, 2000). Φυσικά τα κριτήρια με τα οποία επιλέγονται τα προς μελέτη είδη είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα και υπάρχει μια σειρά από προβληματισμούς που πρέπει να λάβει κανείς υπ' όψιν του (πέρα από αυτούς που αναφέρθηκαν παραπάνω) πριν ξεκινήσει την όποια συγκριτική ανάλυση, αλλά δεν θα επεκταθώ σε ανάλυση των λόγων αυτών καθώς εκτενής συζήτηση γίνεται σε άλλα δημοσιεύματα (π.χ. βλ. (Garland *και συν.*, 2005)).

Το τελευταίο ερώτημα που απασχολεί κάποιον πριν ξεκινήσει μια συγκριτική μελέτη είναι το ***πόσα είδη ή τάξα πρέπει να συμπεριληφθούν*** στη μελέτη; Γενικά, η στατιστική ισχύς των αναλύσεων που λαμβάνουν υπ' όψιν τη φυλογένεση (με την προϋπόθεση ότι υπάρχει ακριβής φυλογένεση και κάποιο μοντέλο εξέλιξης του προς χαρακτήρα), είναι η ίδια με αυτή των συμβατικών στατιστικών μεθόδων. Επομένως

μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυπικοί υπολογισμοί (βλ. (Garland & Adolph, 1994)) για το πόσα είδη θα πρέπει να συμπεριληφθούν.

1.3. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σήμερα είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η ενσωμάτωση φυλογενετικών δεδομένων σε συγκριτικές μελέτες είναι όχι απλά χρήσιμη αλλά και απαραίτητη. Υπάρχουν πάρα πολλά δεδομένα που δείχνουν την πολύ μεγάλη σημασία της ενσωμάτωσης της φυλογενετικής πληροφορίας σε συγκριτικές μελέτες και μάλιστα είναι σαφές ότι κάποιοι υπολογισμοί θα ήταν αδύνατον να πραγματοποιηθούν (π.χ. πότε εμφανίστηκε ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό σε μια ομάδα, αν εμφανίστηκε μία ή περισσότερες φορές, βλ. επίσης κεφάλαιο 3) χωρίς την ενσωμάτωση φυλογενετικών δεδομένων (π.χ. (Autumn, Ryan & Wake, 2002; Berenbrink *και συν.*, 2005; Garland & Ives, 2000; Hodges, 2004; Hosken *και συν.*, 2001; Oakley, 2003; Reznick, Mateos & Springer, 2002; Schondube, Herrera-M. & Rio, 2001; Symonds & Elgar, 2002).

Όμως όλες οι τεχνικές έχουν εκτός από πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Έτσι λοιπόν και στη φυλογενετική συγκριτική μέθοδο υπάρχουν κάποια πρακτικά και θεωρητικά προβλήματα. Δύο από αυτά τα «μειονεκτήματα» είναι το ***απαιτείται μια φυλογένεση*** και το ποιος πρέπει να είναι ***ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός ειδών.*** Η ύπαρξη ενός φυλογενετικού δέντρου είναι ένα στάδιο το οποίο κάθε άλλο παρά τετριμμένο θα μπορούσε να θεωρηθεί (βλ. κεφάλαιο 2). Θα μπορούσε βέβαια κάποιος να κατασκευάσει ένα φυλογενετικό δέντρο με βάση την ταξινομική, αλλά αυτό είναι κάπως αυθαίρετο. Ακόμα όμως και αν η ταξινόμηση δεν είναι τόσο παραπλανητική, τις περισσότερες φορές χαρακτηρίζεται από πολυτομίες στο φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 1.1.Β). Αυτές οι πολυτομίες εκφράζουν φυλογενετική αβεβαιότητα και προκαλούν προβλήματα στις αναλύσεις. Ευτυχώς σήμερα η δημιουργία ενός φυλογενετικού δέντρου δεν είναι κάτι το ακατόρθωτο αλλά δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι οι φυλογενέσεις είναι εκτιμήσεις, αγνώστων εν πολλοίς, πραγματικών διακλαδώσεων. Επομένως, οποιοδήποτε συμπέρασμα εξαχθεί επιδέχεται βελτίωση ή/και τροποποίηση αν προκύψει μια νέα και πιο αναλυτική φυλογενετική προσέγγιση. Για αυτό πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί στην κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου (τα είδη που θα περιληφθούν, οι πληθυσμοί ανά είδος, το μοντέλο εξέλιξης χαρακτήρα που θα επιλεγεί, τα μήκη των κλάδων, η χρονολόγηση του δέντρου κλπ, βλ. επίσης κεφάλαιο 2) για να μην οδηγηθούμε σε παραπλανητικά αποτελέσματα. Το άλλο ζήτημα που

απαιτεί προσοχή είναι ότι ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός ειδών είναι τρία (δεν μπορεί να υποστηρίξει κανείς ότι υφίσταται συγκριτική μελέτη με δύο μόνο είδη), ώστε να υπάρχει τουλάχιστον ένας βαθμός ελευθερίας για τον έλεγχο της υπόθεσης (αναλυτικά το ζήτημα αυτό συζητείται σε άλλες μελέτες (Garland & Adolph, 1994)). Στην πράξη όμως, χρειάζονται πολύ περισσότερα τάξα για να επιτύχουμε ικανοποιητική στατιστική ισχύ και το επιθυμητό επίπεδο κάλυψης και των φυλογενετικών και των υποτιθέμενων προσαρμοστικών καταστάσεων. Το ζήτημα αυτό γίνεται πρόβλημα όταν για τον οποιοδήποτε λόγο κάποια από αυτά τα τάξα είναι δύσκολο ή αδύνατον να αποκτηθούν (βλ. (Garland *και συν.*, 2005) και σχετικές αναφορές).

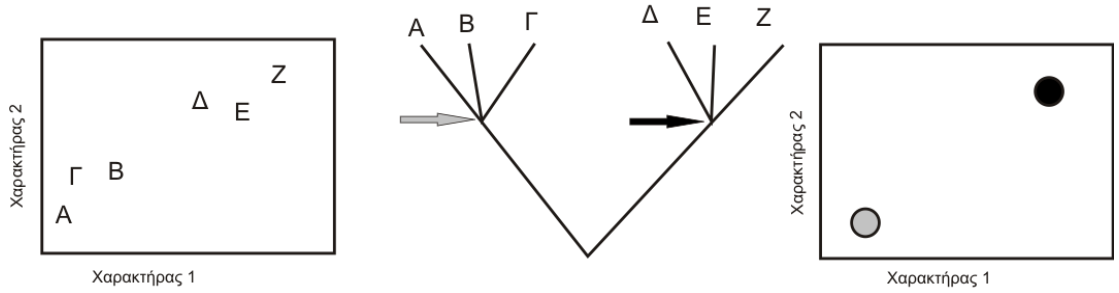
1.4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δεδομένου ότι η εξέλιξη λαμβάνει χώρα και ότι οι διάφορες ομάδες οργανισμών σχετίζονται μεταξύ τους με διαφορετικό τρόπο, διάφορες θεωρητικές προσεγγίσεις και στατιστικά μοντέλα υπέδειξαν ότι σε κάθε μελέτη που περιλαμβάνει πολλά είδη οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών αυτών πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν. Σε αντίθετη περίπτωση, οι φυλογενετικές σχέσεις επηρεάζουν την έκβαση των αναλύσεων ως μια παράμετρος μη ελεγχόμενη και οδηγούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Τα οφέλη από την ενσωμάτωση της φυλογενετικής πληροφορίας στη συγκριτική μέθοδο είναι πολλαπλά. Είναι ο καλύτερος τρόπος για να αντιληφθούμε ότι όλοι οι χαρακτήρες είναι προϊόν της εξέλιξης. Αυτή είναι και η βάση της εξελικτικής φυσιολογίας σύμφωνα με την οποία οι χαρακτήρες δεν είναι αμετάβλητοι στο χρόνο αλλά υπόκεινται σε αλλαγές. Οι φυλογενετικές συγκριτικές μέθοδοι, αποτελούν κυρίαρχο πλέον εργαλείο της εξελικτικής φυσιολογίας για τη μελέτη του προτύπου αλλαγής των χαρακτήρων. Δίνουν τη δυνατότητα να υποθέσουμε την προγονική κατάσταση ενός χαρακτήρα και να εκτιμήσουμε τον ρυθμό της εξελικτικής αλλαγής. Η χρήση της φυλογένεσης στη συγκριτική μέθοδο επέτρεψε στους ερευνητές να προσεγγίσουν θέματα που προηγουμένως αδυνατούσαν.

Σήμερα, πλέον έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε συγκριτικές μελέτες και ενσωματώνουν και τη φυλογενετική ιστορία των ομάδων που μελετώνται. Στη συνέχεια αναφέρονται οι βασικές αρχές κάποιων από αυτές τις μεθόδους που είναι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες και εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν και στη διατριβή αυτή.

1.4.1. Φυλογενετική μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων (Independent Contrasts)

Η καλύτερα κατανοητή και δεσπόζουσα στατιστική μέθοδος που βασίζεται στη φυλογένεση είναι αυτή του Felsenstein (1985), η Φυλογενετική μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων (Independent Contrasts). Για να γίνει καλύτερα κατανοητή η αρχή της μεθόδου, ας εξετάσουμε ένα υποθετικό παράδειγμα: έστω ότι εξετάζουμε τη σχέση δύο χαρακτήρων (χαρακτηριστικό 1 και χαρακτηριστικό 2) για έξι είδη (Α, Β, Γ, Δ, Ε, Ζ) και έστω ότι βρίσκουμε να υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση (Εικόνα 1.2) μεταξύ τους, το ερώτημα είναι πόσο αξιόπιστο είναι το αποτέλεσμα αυτό δεδομένου ότι τα είδη που εξετάζουμε δεν είναι ανεξάρτητα το ένα από το άλλο αλλά σχετίζονται μεταξύ τους όπως φαίνεται στο υποθετικό φυλογενετικό δέντρο της εικόνας 1.2. Το πιο πιθανό είναι ότι τα είδη Α, Β, Γ μοιράζονται παρόμοιες τιμές για τα χαρακτηριστικά που μελετάμε λόγω του ότι κληρονόμησαν αυτά τα χαρακτηριστικά (χαρακτηριστικό 1 π.χ. μικρό μέγεθος σώματος) από τον κοινό τους πρόγονο και με αντίστοιχο σκεπτικό μπορούμε να καταλήξουμε ότι και τα είδη Δ, Ε, Ζ κληρονόμησαν από τον δικό τους κοινό πρόγονο το δικό τους φαινότυπο (π.χ. μεγάλο μέγεθος σώματος).

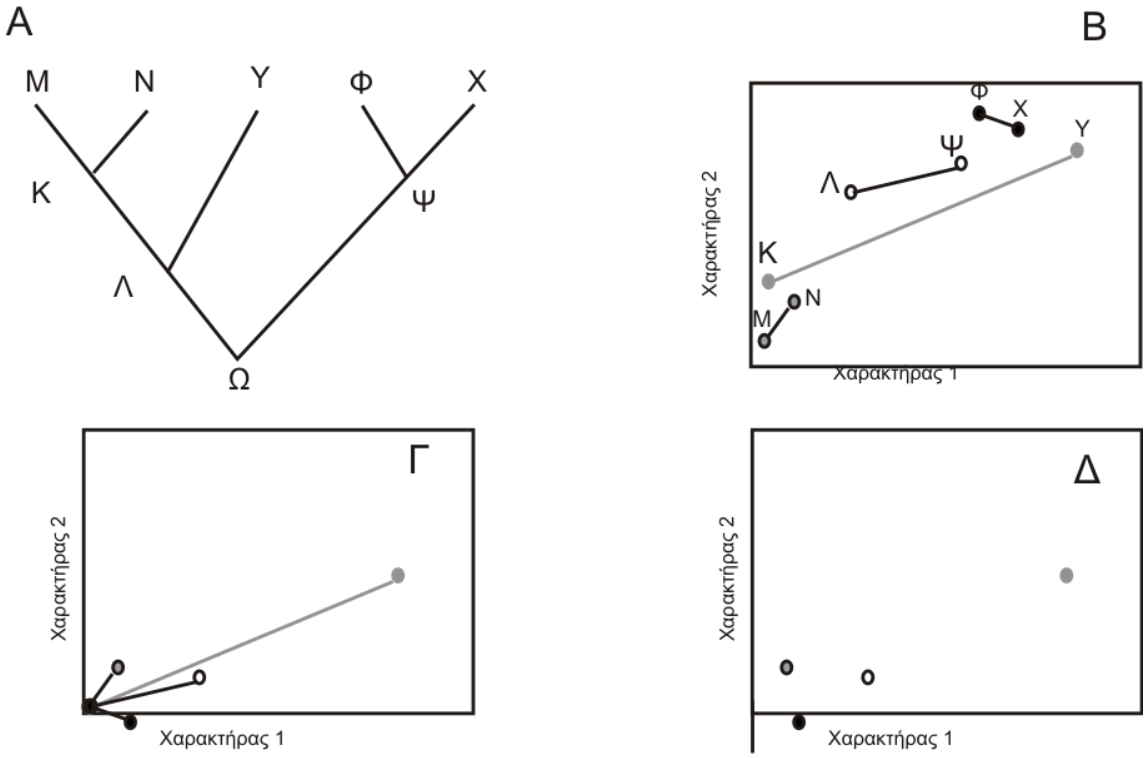


Εικόνα 1.2. Ένα παράδειγμα για το πώς μπορούν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που μελετώνται να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης. Η εικόνα είναι ανακατασκευή από το βιβλίο των Freeman & Herron (2007), Evolutionary analysis.

Αν λοιπόν, σχεδιάσουμε ξανά το γράφημα αλλά αυτή τη φορά με τους κοινούς προγόνους (Εικόνα 1.2) τότε πόσο αξιόπιστο είναι ένα αποτέλεσμα που στηρίζεται σε ένα γράφημα με δύο μόνο σημεία;

Η μέθοδος του Felsenstein (1985) εξετάζει τα πρότυπα της διαφοροποίησης καθώς τα αδελφά είδη εξελίσσονται ανεξάρτητα από τον κοινό τους πρόγονο (Εικόνα 1.2). Φυσικά για να εφαρμοστεί η μέθοδος είναι απαραίτητο το φυλογενετικό δέντρο των προς μελέτη ειδών. Έστω το υποθετικό φυλογενετικό δέντρο των ειδών Μ, Ν, Υ, Φ, Χ και οι πρόγονοι τους Κ, Λ, Ψ, Ω ((Εικόνα 1.3.Α). Το ερώτημα είναι όταν κάποιο από αυτά τα είδη διαφοροποιείται από τον αδελφό κλάδο του και το χαρακτηριστικό 1 εξελίσσεται προς μία κατεύθυνση (π.χ. μεγάλο μέγεθος σώματος) εξελίσσεται παράλληλα και το χαρακτηριστικό 2 προς την αντίστοιχη κατεύθυνση (ώστε να έχουμε

τη θετική συσχέτιση που παρατηρήσαμε προηγουμένως); Για να απαντηθεί ένα τέτοιο ερώτημα αυτό που μπορούμε να κάνουμε είναι ένα γράφημα σαν αυτό της Εικόνα 1.3.Β όπου τα σημεία για την τιμή του κάθε χαρακτήρα ενώνονται μεταξύ των αδελφών ειδών. Στη συνέχεια το κάθε ζεύγος μετακινείται προς τα αριστερά μέχρι το σημείο προέλευσης του (Εικόνα 1.3.Γ) και τέλος σβήνονται οι γραμμές και τα σημεία που βρίσκονται στην αρχή των αξόνων, δηλαδή στο αρχικό σημείο προέλευσης (Εικόνα 1.3.Δ). Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει την απόκλιση ή την αντίθεση ανάμεσα στα αδελφά είδη ενός ζεύγους αδελφών ειδών, καθώς αυτά εξελίσσονται/διαφοροποιούνται ανεξάρτητα (το καθένα) από τον κοινό τους πρόγονο. Αν συνεχίζει να υπάρχει θετική συσχέτιση τότε αυτό σημαίνει ότι καθώς ένα είδος διαφοροποιείται από το αδελφό του είδος και εξελίσσει το χαρακτηριστικό 1 προς μία κατεύθυνση (π.χ. μεγάλο μέγεθος σώματος) εξελίσσει παράλληλα και το χαρακτηριστικό 2 προς την αντίστοιχη κατεύθυνση (ώστε να έχουμε τη θετική συσχέτιση). Αναλυτικά οι μαθηματικοί υπολογισμοί για να βρεθούν οι τιμές των ανεξάρτητων αντιθέσεων αναφέρονται λεπτομερώς τόσο σε συγγράμματα (Freeman & Herron, 2007) όσο και σε διάφορες εργασίες (Felsenstein, 1985; Garland *και συν.*, 2005) και δεν θα αναλυθούν περαιτέρω εδώ. Η μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 4 όπου και αναφέρονται αναλυτικά το λογισμικό και οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 1.3. Ένα παράδειγμα για το πώς λειτουργεί η φυλογενετική μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων (Felsenstein, 1985). Η εικόνα είναι ανακατασκευή από το βιβλίο των Freeman & Herron (2007), Evolutionary analysis.

1.4.2. Γενικευμένο μοντέλο ελαχίστων τετραγώνων (Generalized Least Squares-GLS)

Εναλλακτική μέθοδος είναι αυτή που αναλύεται από τους Garland και Ives (2000), το γενικευμένο μοντέλο ελαχίστων τετραγώνων (generalized least squares-GLS). Οι δύο μέθοδοι ξεκινούν από το ίδιο στατιστικό μοντέλο, χρησιμοποιούν την ίδια φυλογένεση, παράγουν ταυτόσημα αποτελέσματα και εκτιμούν ακριβώς τις ίδιες παραμέτρους. Οι δύο μέθοδοι διαφέρουν μόνο στον τρόπο με τον οποίο κάνουν τους υπολογισμούς. Η Φυλογενετική μέθοδος των ανεξάρτητων αντιθέσεων υπολογίζει τις τιμές για τα χαρακτηριστικά X και Y για τα προγονικά είδη (ουσιαστικά υπολογίζει τον μέσο όρο για ένα γνώρισμα από τα δύο αδελφά είδη και εξισορροπεί με την εξελικτική απόκλιση των δύο αυτών αδελφών ειδών). Στην GLS γίνεται το εξής: έστω ότι έχουμε δύο γνωρίσματα το X (ως ανεξάρτητη μεταβλητή) και το Y (ως εξαρτημένη μεταβλητή) τα οποία μετράμε σε κάποια είδη, στην κλασσική ανάλυση παλινδρόμησης ισχύει η εξίσωση $\boldsymbol{Y=X\beta+\varepsilon}$, στην GLS η εξίσωση αυτή μετασχηματίζεται στην $\boldsymbol{Z=U\beta+a}$ όπου Z=DY, U=DX και a=Dε δηλαδή οι νέες μεταβλητές Z και U είναι ουσιαστικά οι αρχικές μετρήσεις μας X και Y για τα είδη αλλά μετασχηματισμένες με έναν τέτοιο τρόπο (πρόκειται για γραμμικό συνδυασμό) ώστε να λαμβάνονται υπ' όψιν και οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών. Η δυναμική της προσέγγισης GLS έγκειται στο ότι

μετατρέπει μια παλινδρόμηση με συσχετιζόμενα κατάλοιπα (τα είδη σχετίζονται μεταξύ τους αρά και οι μετρήσεις που αφορούν το φαινότυπο τους σχετίζονται μεταξύ τους) σε πρόβλημα μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων και αυτό ανοίγει τον δρόμο για την εφαρμογή διαγνωστικών δοκιμασιών που εφαρμόζονται και στη κλασσική στατιστική ανάλυση και με τις οποίες είμαστε πολύ πιο εξοικειωμένοι (όπως οι δοκιμασίες κανονικότητας, γραμμικότητας, κλπ). Αναλυτικά ο τρόπος με τον οποίο γίνονται οι μετασχηματισμοί για τη μέθοδο αυτή παρέχονται από τους Garland και Ives (2000) και η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 3 όπου και αναφέρονται περισσότερες πρακτικές πληροφορίες για την πραγματοποίηση της.

1.4.3. Έλεγχος για την ύπαρξη φυλογενετικού σήματος

Όπως αναλύθηκε ήδη παραπάνω, οι οργανισμοί που σχετίζονται φυλογενετικά μεταξύ τους τείνουν να μοιάζουν και περισσότερο μεταξύ τους ως προς τα περισσότερα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου τους, για να περιγράψουν το γεγονός αυτό ο Blomberg *και συν.* (2003) χρησιμοποίησαν τον όρο «***φυλογενετικό σήμα***». Για να γίνει καλύτερα κατανοητή η έννοια του φυλογενετικού σήματος ας υποθέσουμε ότι έχουμε ένα φυλογενετικό δέντρο (π.χ. σαν αυτό στην εικόνα 1.1.C), που έχει μια κάποια δομή ιεράρχησης, σύμφωνα με ένα απλό μοντέλο εξέλιξης χαρακτήρα, όπως αυτό της κίνησης Brown, οι εξελικτικές αλλαγές για ένα χαρακτήρα, είναι τιμές που απλά προστίθενται στην ήδη υπάρχουσα τιμή της προηγούμενης γενιάς ή του προηγούμενου κόμβου στο φυλογενετικό δέντρο. Με το σκεπτικό αυτό, τα μέλη μιας γενεαλογικής γραμμής που διαφοροποιήθηκαν πρόσφατα αναγκαστικά θα μοιάζουν, κατά μέσο όρο, περισσότερο μεταξύ τους, σε σχέση με πιο απομακρυσμένες γενεαλογικές γραμμές. Η ύπαρξη φυλογενετικού σήματος σε διάφορα δεδομένα (π.χ. φυσιολογίας, μορφολογίας κλπ) έχει εξ' ορισμού σημαντικές επιπτώσεις, οι οποίες ήδη αναλύθηκαν παραπάνω (π.χ. τα είδη άρα και οι φαινότυποι τους δεν μπορούν να θεωρούνται ανεξάρτητα και επομένως οι κλασικές στατιστικές προσεγγίσεις δεν είναι κατάλληλες για συγκρίσεις ειδών, η ύπαρξη μεγεθυμένου σφάλματος τύπου Ι, η ανάπτυξη μεθόδων για να λαμβάνονται υπ' όψιν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών κλπ). Στην πραγματικότητα όμως η πρόταση «οι οργανισμοί που σχετίζονται φυλογενετικά μεταξύ τους τείνουν να μοιάζουν και περισσότερο μεταξύ τους» έχει και τις εξαιρέσεις της, για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η συγκλίνουσα εξέλιξη οδηγεί είδη τα οποία σχετίζονται μεταξύ τους να μοιάζουν πολύ περισσότερο από ότι αναμένεται με βάση τις φυλογενετικές τους σχέσεις, ενώ έχει επίσης βρεθεί ότι λόγω μετατόπισης χαρακτήρα είναι δυνατόν στενοί συγγενείς να μοιάζουν λιγότερο μεταξύ τους από ότι θα ήταν αναμενόμενο ((Blomberg

και συν., 2003) και σχετική βιβλιογραφία). Έτσι, αρκετοί ερευνητές θεωρούν ότι πριν κανείς προχωρήσει σε ενσωμάτωση της φυλογενετικής πληροφορίας στα συγκριτικά του δεδομένα θα πρέπει πρώτα να εξετάσει την ύπαρξη φυλογενετικού σήματος (ή έστω αν υπάρχει ισχυρό φυλογενετικό σήμα) γιατί μπορεί τελικά να μην είναι απαραίτητη αυτή η ενσωμάτωση (Abouheif, 1999; Losos, 1999; Westoby, Leishman & Lord, 1995). Έτσι, προκλήθηκε μία διχοτόμηση ανάμεσα στην ανάλυση που λαμβάνει υπ' όψιν τη φυλογένεση και σε αυτή που δεν τη λαμβάνει, αν και στην πραγματικότητα δεν υπάρχει λόγος να υφίσταται μια τέτοια διχοτόμηση καθώς και οι δύο μέθοδοι που περιγράφηκαν παραπάνω (Independent Contrasts και Generalized Least Squares-GLS), μπορούν να εφαρμοστούν ακόμη και σε δεδομένα που δεν εμφανίζουν φυλογενετικό σήμα και να δώσουν ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα με τις συμβατικές μεθόδους.

Ένας τρόπος για να διερευνηθεί η ύπαρξη φυλογενετικού σήματος (δηλαδή αν για ένα σύνολο συγκριτικών δεδομένων τα πιο συγγενικά είδη έχουν την τάση να μοιάζουν και περισσότερο μεταξύ τους) είναι η δοκιμασία τυχαιοποίησης (randomization test). Το βασικό σκεπτικό της μεθόδου είναι το εξής: έστω ότι έχουμε ένα φυλογενετικό δέντρο (με συγκεκριμένη τοπολογία και μήκη κλάδων) και δεδομένα για ένα χαρακτήρα που έχουν συγκεκριμένες τιμές (π.χ. οι μετρήσεις που πήραμε) που αφορούν τα άκρα αυτού του δέντρου (π.χ. στα είδη). Το ερώτημα που προκύπτει είναι αν το δέντρο που έχουμε στη διάθεση μας ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα μας σε σχέση με το αν οι τιμές του χαρακτήρα αντιστοιχίζονταν τυχαία στα άκρα του φυλογενετικού δέντρου (και επομένως καταστρεφόταν το όποιο φυλογενετικό σήμα μπορεί να υπήρχε στα δεδομένα μας). Η δοκιμασία τυχαιοποίησης μπορεί να εφαρμοστεί και μέσω της μεθόδου GLS και μέσω αυτής των ανεξάρτητων αντιθέσεων (η διαφορά βρίσκεται στον τρόπο με τον οποίο γίνονται οι υπολογισμοί αλλά η λογική της μεθόδου είναι η ίδια και στις δύο περιπτώσεις και φυσικά τα αποτελέσματα είναι ταυτόσημα).

Η δοκιμασία τυχαιοποίησης όταν εφαρμόζεται μέσω της μεθόδου των ανεξάρτητων αντιθέσεων πραγματοποιείται ως εξής: αρχικά υπολογίζονται οι τιμές των ανεξάρτητων αντιθέσεων για το σύνολο των δεδομένων. Στη συνέχεια υπολογίζεται η διακύμανση των αντιθέσεων ως δείκτης του πόσο καλά ταιριάζει το δέντρο στα δεδομένα. Αν τα συγγενικά είδη τείνουν να έχουν παρόμοιες τιμές για ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (δηλαδή, εμφανίζει φυλογενετικό σήμα), τότε η διακύμανση των αντιθέσεων θα τείνει να είναι χαμηλή. Για να διερευνηθεί αν το παρατηρούμενο φυλογενετικό σήμα είναι στατιστικά σημαντικό, γίνεται σύγκριση της διακύμανσης των αντιθέσεων για τα πραγματικά δεδομένα με τις τιμές που λαμβάνονται αν τα δεδομένα μετατεθούν τυχαία στα άκρα του δέντρου χωρίς να λαμβάνονται υπ' όψιν οι

φυλογενετικές σχέσεις. Αν, το 95% των προσομοιώσεων (ανακατατάξεις) δείξουν ότι η διακύμανση των αντιθέσεων είναι μεγαλύτερη από εκείνη για τα πραγματικά δεδομένα (στις σωστές θέσεις τους) τότε απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση για τη μη ύπαρξη φυλογενετικού σήματος (Blomberg *και συν.*, 2003).

Η δοκιμασία τυχαιοποίησης ουσιαστικά δείχνει κατά πόσο η ομοιότητα μεταξύ συγγενικών ειδών διαφέρει από το να είναι τυχαία, για να ποσοτικοποιηθεί ωστόσο το φυλογενετικό σήμα (πόσο ισχυρό είναι) εφαρμόζεται μία άλλη δοκιμασία, ο υπολογισμός της παραμέτρου K (Blomberg *και συν.*, 2003). Η παράμετρος υπολογίζεται μέσω μαθηματικών υπολογισμών που αφορούν το τετράγωνο του μέσου σφάλματος και αναλυτικά οι υπολογισμοί και οι εξισώσεις αναφέρονται από τους Blomberg *και συν.* (2003). Το βασικό σημείο στη μέθοδο αυτή είναι η ερμηνεία της τιμής K. Αν η τιμή K είναι μεγαλύτερη από τη μονάδα τότε τα είδη (γενικά οι ομάδες που συγκρίνονται π.χ. είδη, πληθυσμοί κλπ) που είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους, έχουν και μεγαλύτερες ομοιότητες στον χαρακτήρα που εξετάζεται από ότι αναμένεται με βάση την εξέλιξη κάτω από το μοντέλο της κίνησης κατά Brown. Αντίθετα αν η τιμή του K είναι μικρότερη από τη μονάδα τότε τα είδη που είναι πιο συγγενικά, είναι λιγότερο όμοια μεταξύ τους από ότι αναμένεται.

Μια άλλη ανάλυση για την εκτίμηση του φυλογενετικού σήματος, είναι η προσέγγιση της αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (phylogenetic signal-representation, PSR) που προτάθηκε από τον Diniz-Filho *και συν. (2012)*. Στη μέθοδο αυτή, αρχικά με βάση το φυλογενετικό δέντρο που έχουμε, κατασκευάζεται ένας πίνακας φυλογενετικών αποστάσεων και από αυτόν τον πίνακα εξάγονται τα ιδιοδιανύσματα (eigenvectors). Όπως είναι γνωστό, τα ιδιοδιανύσματα σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 90° (είναι δηλαδή ορθογώνια), έτσι το καθένα απεικονίζει ένα συγκεκριμένο μέρος των εξελικτικών σχέσεων των γενεαλογικών γραμμών που μελετώνται. Για παράδειγμα, τα πρώτα ιδιοδιανύσματα, που είναι αυτά που έχουν και τις μεγαλύτερες ιδιοτιμές (eigenvalues), αντιπροσωπεύουν τις μεγάλες φυλογενετικές αποστάσεις (συνήθως αντιπροσωπεύουν την απόσταση των κυρίων κλάδων του φυλογενετικού δέντρου, που βρίσκονται πιο κοντά στη ρίζα του). Σταδιακά, τα επόμενα ιδιοδιανύσματα, θα έχουν ολοένα και μικρότερες ιδιοτιμές, και θα σχετίζονται με ολοένα και μικρότερες φυλογενετικές αποστάσεις (για παράδειγμα τις πιο πρόσφατες διαφοροποιήσεις προς τα άκρα του δέντρου). Στη μέθοδο της αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (PSR), τα ιδιοδιανύσματα (τα οποία θα μπορούσαν να θεωρηθούν, κατά μία έννοια, εκτίμηση των φυλογενετικών αποστάσεων) προστίθενται το ένα μετά το άλλο σε μια σειρά από γραμμικά μοντέλα και υπολογίζεται η τιμή R^2 για

καθένα από αυτά. Στη συνέχεια, κατασκευάζεται μία γραφική παράσταση, στον οριζόντιο άξονα της οποίας βρίσκονται οι ιδιοτιμές των ιδιοδιανυσμάτων (θα μπορούσε να θεωρηθεί ως η φυλογενετική διάσταση) και στον κατακόρυφο άξονα οι τιμές R^2 που αντιστοιχούν σε καθένα ιδιοδιάνυσμα. Αν η εξέλιξη ενός χαρακτήρα ακολουθεί το μοντέλο της κίνησης Brown τότε αναμένεται η ποικιλομορφία στον υπό μελέτη χαρακτήρα να αυξάνει γραμμικά με τη φυλογενετική πληροφορία. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις του κεφαλαίου 3 όπου και γίνεται αναλυτικά η περιγραφή της μεθόδου καθώς του λογισμικού που πραγματοποιήθηκε.

Η μελέτη αυτή είναι μία συγκριτική μελέτη σε επίπεδο φυσιολογίας και μορφολογίας που εστιάζεται στα είδη *Codringtonia.* Το συγκεκριμένο γένος χερσαίων γαστεροπόδων είναι καλό «μοντέλο» για μια τέτοια μελέτη για μία σειρά από λόγους όπως ενδημισμός του γένους, η μικρή χωρική κλίμακα της διαφοροποίησης του και το μωσαϊκό πρότυπο κατανομής τους, οι ιδιαιτερότητες του βιολογικού τους κύκλου κ.ά.

1.5. ΤΟ ΓΕΝΟΣ CODRINGTONIA KOBELT 1898

Το γένος *Codringtonia* Kobelt 1898 (Πίνακας 1.1) κατανέμεται κατά κύριο λόγο στην Ελλάδα. Υπάρχει μονάχα ένα αρκετά διαφοροποιημένο είδος (*C. neocrassa*) που ανήκει σε διαφορετικό υπογένος (*Neocrassa*) που κατανέμεται στη βόρεια Ελλάδα, την Κέρκυρα και τη νότια Αλβανία. Σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση της συστηματικής του από τον Subai (2005) το γένος *Codringtonia* περιλαμβάνει 8 είδη: *C. codringtonii* (Gray 1834)*, C. gittenbergeri* Subai 2005*, C. parnassia* (Roth 1855)*, C. helenae* Subai 2005*, C. intusplicata* (Pfeiffer 1851)*, C. eucineta* (Bourguignat 1857)*, C. elisabethae* Subai 2005 και το αρκετά διαφοροποιημένο (κέλυφος, αναπαραγωγικό σύστημα) *C. neocrassa* Zilch 1952. Η συστηματική κατάταξη των ειδών βασίστηκε σε μορφολογικά χαρακτηριστικά του κελύφους και του αναπαραγωγικού συστήματος. Το τυπικό είδος του γένους είναι το *C. codringtonii* (Εικόνα 1.12) το οποίο κατανέμεται στην περιοχή του Ναυαρίνου στη νότια Πελοπόννησο (Subai, 2005). Τα είδη *Codringtonia* είναι σαλιγκάρια μεγάλου μεγέθους (Subai, 2005) και συναντώνται σε βιότοπους με μακία βλάστηση, δάση φυλλοβόλων και κωνοφόρων (εκτός από δάση πεύκης) και ζουν αποκλειστικά σε σχισμές ασβεστολιθικών βράχων (Hadjicharalambous, 1996). Συναντώνται σε περιοχές ποικίλου υψομέτρου, από σχεδόν στο επίπεδο της θάλασσας όπως το *C. codringtonii* στο Ναυαρίνο ως και υψόμετρο πάνω από 2000μ όπως το *C. parnassia* στη Γκιώνα (Subai 2005). Τα είδη *Codringtonia* εμφανίζουν περιορισμένη και μωσαϊκή κατανομή στην ηπειρωτική Ελλάδα: τέσσερα από τα οκτώ

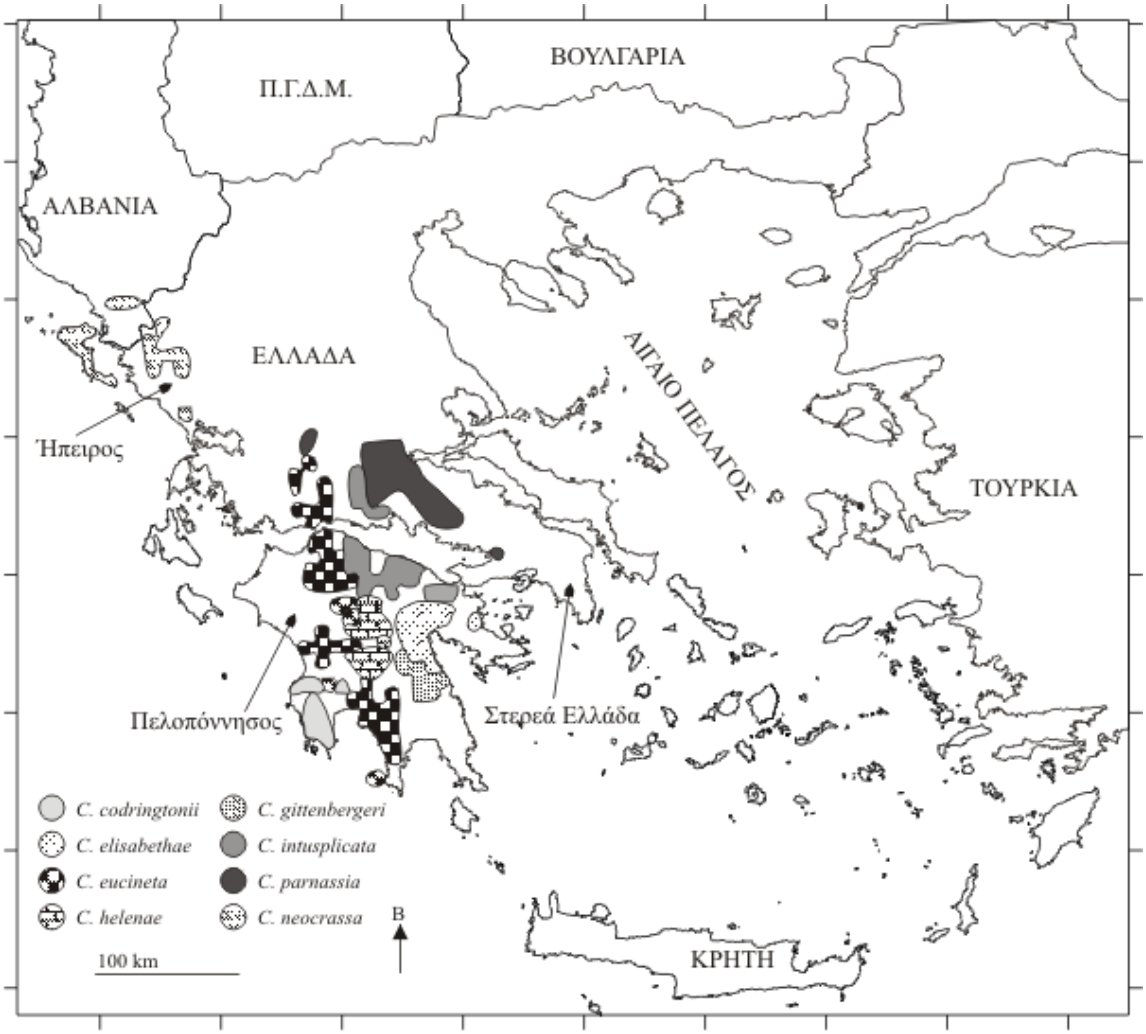
είδη βρίσκονται αποκλειστικά στη Πελοπόννησο, δυο βρίσκονται τόσο στη Στερεά Ελλάδα όσο και την Πελοπόννησο, ένα είδος ζει μόνο στη Στερεά Ελλάδα ενώ το *C. neocrassa* συναντάται στην Ήπειρο. Η νησιωτική τους εξάπλωση είναι εξαιρετικά περιορισμένη καθώς μόνο το *C. neocrassa* εμφανίζει νησιωτική κατανομή (Κέρκυρα). Οι περιοχές εξάπλωσης όλων των ειδών *Codringtonia* φαίνονται στο χάρτη της Εικόνας 1.4. Τα συγγενέστερα γένη στο *Codringtonia* θεωρούνται τα γένη *Levantina* και *Assyriella* (Hadjicharalambous, 1996; Subai, 2005).

Πίνακας 1.1. Η συστηματική κατάταξη των ειδών του γένους *Codringtonia .*

Υπερβασίλειο	*Eukaryota*
Βασίλειο	*Metazoa*
Φύλο	*Mollusca*
Τάξη	*Gastropoda*
Υφομοταξία	*Eupulmonata*
Υπόταξη	*Stylommatophora*
Υπεροικογένεια	*Helicoidea*
Οικογένεια	*Helicidae*
Γένος	*Codringtonia Kobelt 1898*
Είδος	*C. codringtonii (Gray 1834)*
	C. elisabethae Subai 2005
	C. eucineta (Bourgouignant 1857)
	C. gittenbergeri Subai 2005
	C. helenae Subai 2005
	C. intusplicata (Pfeiffer 1851)
	C. parnassia (Roth 1855)
Υπογένος	*Neocrassa*
Είδος	*C. (Neocrassa) neocrassa Zilch 1952*

Όλα σχεδόν τα είδη του γένους (με εξαίρεση το *C. neocrassa*) είναι εδώδιμα (Hadjicharalambous, 1996). Σε αυτό ίσως να οφείλεται η αισθητή μείωση που υπέστησαν οι φυσικοί πληθυσμοί των ειδών τα τελευταία χρόνια (Hadjicharalambous, 1996). Σήμερα όλα τα είδη εντάσσονται στο κόκκινο βιβλίο των απειλούμενων ζώων της Ελάδας χαρακτηριζόμενα ως τρωτά (Legakis & Maragou, 2009). Παρά τον χαρακτηρισμό τους αυτό, εντυπωσιακή είναι η έλλειψη στοιχείων από τη βιβλιογραφία για το γένος γενικότερα. Τα μοναδικά διαθέσιμα στοιχεία για το γένος *Codringtonia* αντλούνται από τρεις μόνο πηγές: την διδακτορική διατριβή της Δρ. Έλενας Χατζηχαραλάμπους (1996) που αφορά την οικολογία και τη βιολογία των σαλιγκαριών αυτών και δύο μόνο δημοσιευμένες εργασίες (Giokas *και συν.*, 2007; Subai, 2005) εκ

των οποίων η μία αφορά τη συστηματική αναθεώρηση του γένους και η άλλη τις εποχιακές μεταβολές στη βιοχημική σύσταση ενός μόνο από τα είδη του γένους.



Εικόνα 1.4. Χάρτης των περιοχών κατανομής των ειδών του γένους *Codringtonia.* Επανασχεδιασμός του χάρτη από (Subai, 2005).

1.5.1. Περιγραφή των ειδών Codringtonia

Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά όλων των ειδών αναφέρονται στις παραγράφους που ακολουθούν, η περιγραφή στηρίζεται στην τελευταία αναθεώρηση από τον Subai (2005). Για τις διαστάσεις του κελύφους έχουν χρησιμοποιηθεί 4 μετρήσεις, το ύψος (Υ) και το πλάτος (Π) του κελύφους, το ύψος (ΥΣ) και το πλάτος (ΠΣ) του ανοίγματος, και οι τιμές που αναφέρονται παρακάτω είναι αυτές που αναφέρονται από τον Subai (2005) στην περιγραφή των ειδών.

Το *C. neocrassa* (Εικόνα 1.5) θεωρείται ότι ανήκει στο υπογένος *Neocrassa* του γένους *Codringtonia*. Κατανέμεται στην Ήπειρο ως και την Αλβανία, και είναι το μόνο

είδος που έχει νησιωτική εξάπλωση (Κέρκυρα). Θεωρείται μεγάλο ως μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, με σκληρό καφετί κέλυφος. Ο ομφαλός του είναι συχνά ανοιχτός ή μισο-καλυμμένος. Η πρωτοκόγχη του είναι 1,75 σπείρες ενώ ένα ενήλικο άτομο διαθέτει 4,5-5,5 σπείρες. Διαστάσεις (mm): Υ: 19-25,5, Π: 34-47,5, ΥΣ: 16,5-22 και ΠΣ: 17,5-27.

Εικόνα 1.5. Κέλυφος του είδους *C. neocrassa*.

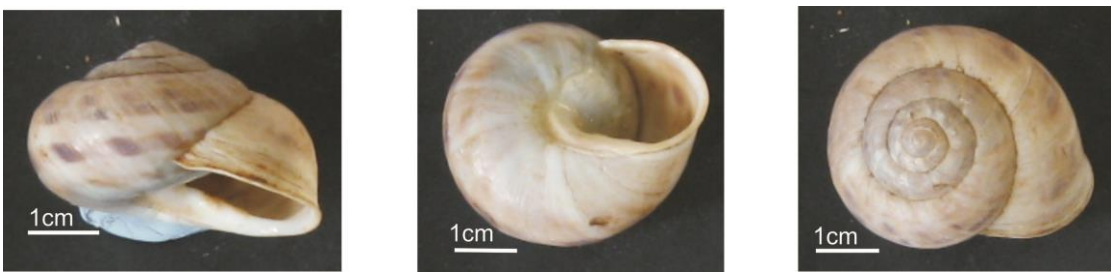
Το είδος *C. parnassia* (Εικόνα 1.6) κατανέμεται στη Στερεά Ελλάδα (Εικόνα 1.4). Ο ολότυπος προέρχεται από τη Φθιώτιδα, από το όρος Οίτη. Θεωρούνται μικρά ως μεσαίου μεγέθους σαλιγκάρια, με ανοιχτόχρωμο-φωτεινό κέλυφος που έχει στενές γραμμές/ραβδώσεις. Ο ομφαλός τους είναι καλυμμένος. Η πρωτοκόγχη τους είναι 1,5-1,75 σπείρες ενώ τα ενήλικα διαθέτουν 3,75-5,25 σπείρες. Διαστάσεις (mm): Υ: 16,5-27, Π: 27-44, ΥΣ: 13-22 και ΠΣ: 16-27.

Εικόνα 1.6. Άτομο του είδους *C. parnassia*.

Το είδος *C. intusplicata* (Εικόνα 1.7) εξαπλώνεται στη Στερεά Ελλάδα καθώς και στη βόρεια Πελοπόννησο (Εικόνα 1.4). Ο ολότυπος του προέρχεται από τον Χελμό της Αρκαδίας. Πρόκειται για ένα μικρό ως μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, με ανοιχτόχρωμο/φωτεινό κέλυφος με πολύ ισχνές, στενές ραβδώσεις. Ο ομφαλός του συνήθως καλύπτεται κατά το ένα τρίτο ως τρία τέταρτα. Η πρωτοκόγχη του είναι 1,5-2 σπείρες ενώ στα ενήλικα οι σπείρες φτάνουν τις 4-5. Διαστάσεις (mm): Υ: 14-23, Π: 28,5-45,2, ΥΣ: 12,5-21 και ΠΣ: 15-27.

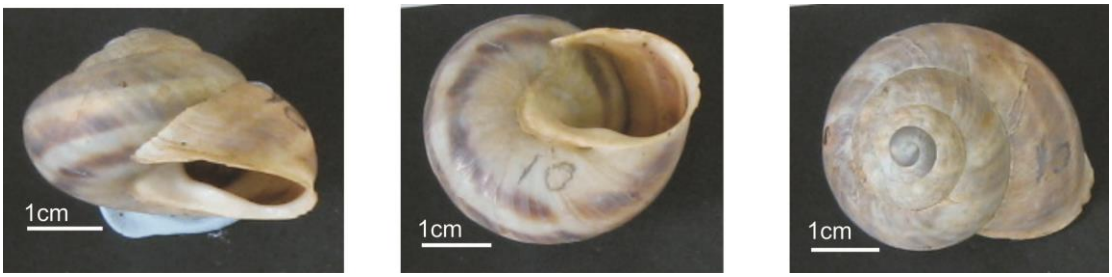
Εικόνα 1.7. Άτομο του είδους *C. intusplicata*.

Το είδος *C. helenae* (Εικόνα 1.8) κατανέμεται αποκλειστικά στην περιοχή της Αρκαδίας στην Πελοπόννησο (Εικόνα 1.4). Η τυπική περιοχή εξάπλωσης του είναι η Αρκαδία, 3,7Km από το Περθώρι προς τη Μονή Επάνω Χρέπας. Πρόκειται για ένα μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, στο κέλυφος του οποίου επίσης παρατηρούνται στενές ραβδώσεις. Το είδος αυτό έχει καλυμμένο ομφαλό ωστόσο σε κάποιους πληθυσμούς μπορεί να υπάρχει ένα άνοιγμα ή ακόμα και να είναι μισο-καλυμμένος. Η πρωτοκόγχη του είναι 1,5-1,75 σπείρες ενώ τα ενήλικα διαθέτουν 4,75-5,25 σπείρες. Διαστάσεις (mm): Υ: 18-27, Π: 33,5-47, ΥΣ: 16,5-22 και ΠΣ: 21-30.



Εικόνα 1.8. Κέλυφος του είδους *C. helenae*.

Το είδος *C. elisabethae* (Εικόνα 1.9) κατανέμεται αποκλειστικά στην Αργολίδα στην Πελοπόννησο (Εικόνα 1.4). Η τυπική περιοχή εξάπλωσης του βρίσκεται 7 Km από τον Αχλαδόκαμπο στην κατεύθυνση προς Άργος. Θεωρείται μεγάλο ως μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, με σκληρό ανοιχτόχρωμο κέλυφος που ως επί το πλείστον διαθέτει και καφετί «θολές» ραβδώσεις. Ο ομφαλός του καλύπτεται, η πρωτοκόγχη του μπορεί να είναι 1,5-1,75 σπείρες ενώ τα ενήλικα διαθέτουν 4,5-5,5 σπείρες. Διαστάσεις (mm): Υ: 22-31, Π: 39-48, ΥΣ: 18-24 και ΠΣ: 24-31.



Εικόνα 1.9. Κέλυφος του είδους *C. elisabethae*.

Η κατανομή του είδους *C. eucineta* (Εικόνα 1.10) είναι η ευρύτερη σε σχέση με την κατανομή των υπολοίπων ειδών. Το είδος εξαπλώνεται από τη Στερεά Ελλάδα μέχρι και τη νότια Πελοπόννησο (Εικόνα 1.4). Ο ολότυπος του αναφέρεται σε πληθυσμό από την Καλαμάτα, Μεσσηνίας. Πρόκειται για μεγάλο ως μεσαίου μεγέθους είδος, με φωτεινό καφέ χρώμα κελύφους. Έχει καλυμμένο τον ομφαλό ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει ένα μικρό άνοιγμα. Η πρωτοκόγχη του είναι 1,5-1,75 σπείρες ενώ τα ενήλικα διαθέτουν 4,75-5,75 σπείρες. Διαστάσεις (mm): Υ: 19-35, Π: 33,5-54,5, ΥΣ: 16-27,5 και ΠΣ: 20-36.

Εικόνα 1.10. Κέλυφος του είδους *C. eucineta*.

Το είδος *C. gittenbergeri* (Εικόνα 1.11) κατανέμεται αποκλειστικά στην ανατολική-κεντρική Πελοπόννησο (Εικόνα 1.4). Η τυπική περιοχή εξάπλωσης του είναι στην Αρκαδία, 7 Km από τον Άγιο Πέτρο. Διαθέτει μεγάλο και κωνικό κέλυφος, χρώματος καστανό προς μαύρο. Ο ομφαλός του είναι εντελώς καλυμμένος. Η πρωτοκόγχη του είναι 1,75 σπείρες ενώ τα ενήλικα διαθέτουν 5-5,5 σπείρες. Διαστάσεις (mm): Υ: 25,5-32, Π: 43-48, ΥΣ: 20-24 και ΠΣ: 25-31.

Εικόνα 1.11. Κέλυφος του είδους *C. gittenbergeri*.

Το είδος *C. codringtonii* (Εικόνα 1.12) κατανέμεται αποκλειστικά στη Μεσσηνία της Πελοποννήσου (Εικόνα 1.4). Το τυπικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή του είδους προέρχεται από το Παλαιόκαστρο στο Ναυαρίνο. Πρόκειται για μεγάλο είδος σαλιγκαριού, το κέλυφος του οποίου είναι κωνικό-σφαιρικό, καφέ χρώματος και φαίνεται σαν να έχει φωτεινές ίνες στην επιφάνεια του (Εικόνα 1.12). Το είδος έχει καλυμμένο ομφαλό, η πρωτοκόγχη του είναι 1,75-2 σπείρες ενώ τα ενήλικα διαθέτουν 4,75-5,75 σπείρες. Διαστάσεις (mm): Υ: 23-34, Π: 38-51, ΥΣ: 19-26,5 και ΠΣ: 24,5-34,5.

Εικόνα 1.12. Κέλυφος του είδους *C. codringtonii*

1.5.2. Βιολογικός κύκλος

Με τον όρο «βιολογικό κύκλο» εννοούμε το χρονικό διάστημα εκείνο που περιλαμβάνει τα διάφορα στάδια ανάπτυξης των ατόμων από τη στιγμή της γέννησης τους μέχρι τη σεξουαλική τους ωρίμανση, καθώς και τις στρατηγικές αναπαραγωγής και επιβίωσης που ακολουθούν τα άτομα. Η γεννητική ωρίμανση σηματοδοτείται στο κέλυφος από τον πλήρη σχηματισμό του χείλους.

Εικόνα 1.13. Άτομα του είδους *C. intusplicata* κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος. Η φωτογραφία λήφθηκε στις 5/4/2009 και ο σταθμός βρίσκεται στο 11° Km της διαδρομής από Διακοπτό προς Καλάβρυτα. Στη φωτογραφία διακρίνεται το αρσενικό γεννητικό σύστημα του κάθε ατόμου (Φωτογραφία: προσωπικό αρχείο Π. Κοτσακιόζη).

Η πλειονότητα των ατόμων *Codringtonia* ωριμάζει γεννητικά στα τέσσερα περίπου χρόνια ενώ σε ένα μικρό ποσοστό των ατόμων η διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί νωρίτερα ή αργότερα από αυτό το χρονικό πλαίσιο ανάλογα με το αν έχει επιταχυνθεί ή επιβραδυνθεί η αύξηση τους αντίστοιχα (Hadjicharalambous, 1996).

Η αναπαραγωγική περίοδος αρχίζει περίπου δύο εβδομάδες μετά την ενεργοποίηση των ατόμων μετά τη διαχείμαση. Ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες του εκάστοτε έτους (για την ενεργοποίηση από τη διαχείμαση η θερμοκρασία πρέπει να υπερβαίνει τους 15 °C) η αναπαραγωγή μπορεί να ξεκινήσει από τα τέλη Φεβρουαρίου ως τα μέσα Μαρτίου και συνήθως διαρκεί δυο με δυόμισι μήνες, ολοκληρώνεται οπωσδήποτε το Μάιο καθώς δεν έχει παρατηρηθεί αναπαραγωγική δραστηριότητα κατά τους θερινούς μήνες (Hadjicharalambous, 1996). Η αναπαραγωγή κατά την άνοιξη φαίνεται ασυνήθιστη καθώς τα σαλιγκάρια που κατανέμονται στη νότια Ελλάδα συνήθως αναπαράγονται το φθινόπωρο ενώ την άνοιξη αναπαράγονται κυρίως τα είδη σαλιγκαριών που κατανέμονται πιο βόρεια (βλ. (Parmakelis & Mylonas, 2002) και σχετική βιβλιογραφία).

Η αναπαραγωγή την άνοιξη θεωρείται μια υπολειμματική στρατηγική των ειδών που διατηρήθηκε από περιόδους όταν η καταλληλότερη κλιματολογικά περίοδος αναπαραγωγής ήταν η άνοιξη όπως η τελευταία παγετώδης περίοδος (Hadjicharalambous, 1996). Ωστόσο, σε ένα τουλάχιστον είδος *Codringtonia* (*C. eucineta*) έχει παρατηρηθεί ότι κάποια άτομα αναπαράγονται το φθινόπωρο (Οκτώβριος-Νοέμβριος) (Hadjicharalambous, 1996). Αυτή όμως η δεύτερη αναπαραγωγική περίοδος, σύμφωνα με τη Δρ. Χατζηχαραλάμπους (1996), είναι άνευ σημασίας για τον πληθυσμό καθώς περιλαμβάνει λίγα μόνο ζευγαρώματα και λίγες ωαποθέσεις και η συγγραφέας την αποδίδει σε μια προσπάθεια του πληθυσμού να προσαρμοστεί στις σύγχρονες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Της αναπαραγωγικής διαδικασίας προηγείται ένας μακράς διάρκειας ερωτικός χορός που καταλήγει στη συνεύρεση των δύο ατόμων και την αμοιβαία ανταλλαγή σπερματοφόρων (Εικόνα 1.13). Ένα μήνα περίπου μετά το ζευγάρωμα, τα αυγά αποτίθενται σε φωλιές (τρύπες στο έδαφος) που κατασκευάζονται από το ίδιο το σαλιγκάρι-γεννήτορα. Η προετοιμασία της φωλιάς διαρκεί σχεδόν 48 ώρες. Η ωαπόθεση διαρκεί περίπου 24 ώρες και σε κάθε φωλιά τοποθετούνται 18-56 αυγά (κατά μέσο όρο 45). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας η φωλιά σφραγίζεται με χώμα ποτισμένο με βλέννα από το ίδιο το ζώο. Ένα μήνα περίπου μετά εκκολάπτονται τα αυγά και τα μικρά παραμένουν στις φωλιές τους μέχρι τις πρώτες βροχές του φθινοπώρου. Φυσικά

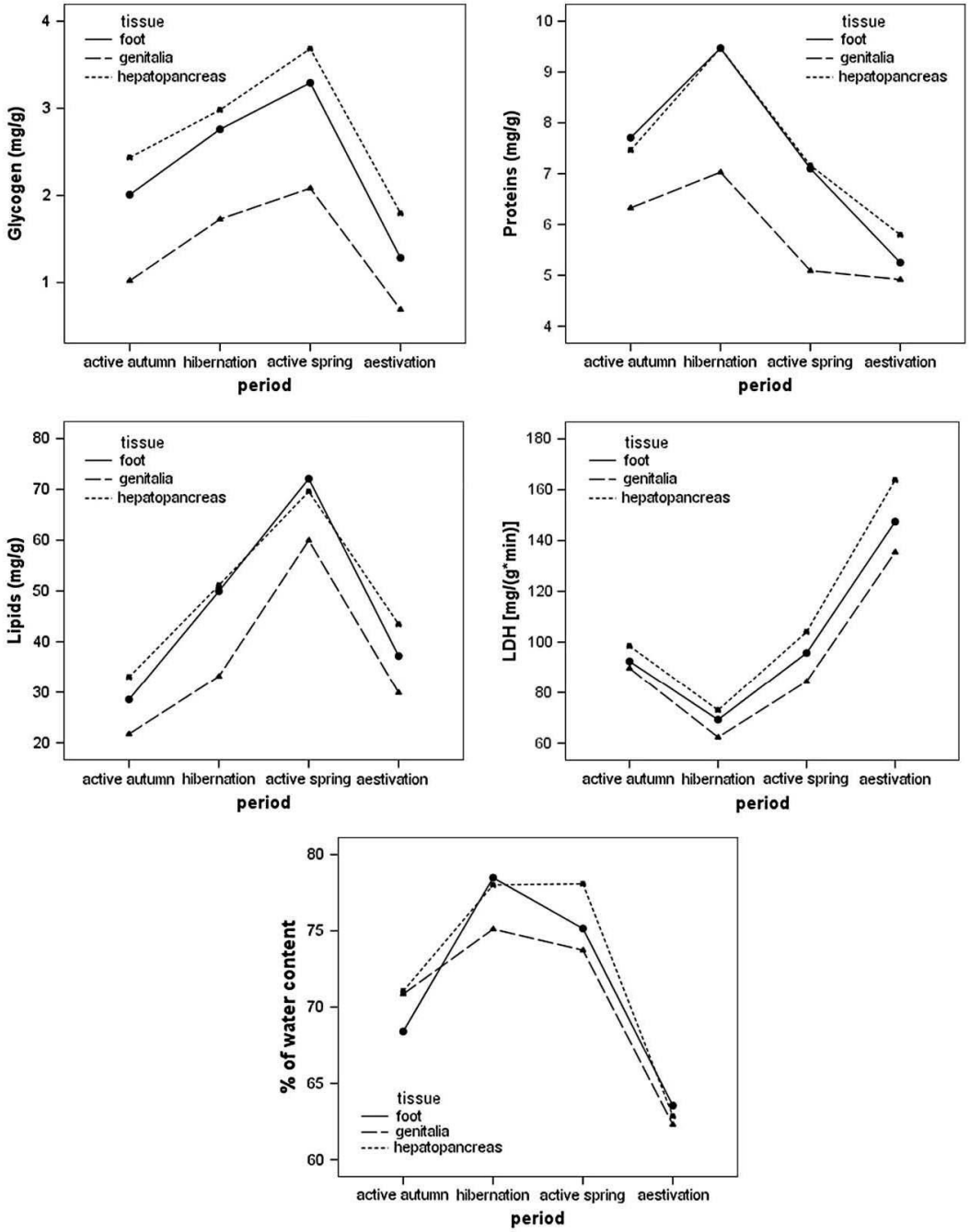
υπάρχει μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας που οφείλεται κυρίως στην ξηρασία του καλοκαιριού, την ύπαρξη θηρευτών και άλλους παράγοντες (Hadjicharalambous, 1996).

Το φθινόπωρο μετά τις πρώτες βροχές τα άτομα δραστηριοποιούνται ενώ κατά τη διάρκεια του χειμώνα πέφτουν σε διαχείμαση για να ενεργοποιηθούν ξανά την άνοιξη όταν γίνεται και η αναπαραγωγή. Ανενεργά παραμένουν επίσης και κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (διαθέριση). Τα είδη *Codringtonia* επομένως εμφανίζουν δύο περιόδους δραστηριότητας και δύο περιόδους διάπαυσης (Giokas *και συν.*, 2007). Τόσο η χειμερινή όσο και η καλοκαιρινή διάπαυση είναι σχετικά καθορισμένης διάρκειας αλλά η θερινή φαίνεται να είναι ευκαιριακή και άμεσα εξαρτημένη από τις κλιματικές συνθήκες (Hadjicharalambous, 1996). Η διάπαυση είναι ένα είδος αερόβιας νάρκωσης στην οποία καταφεύγουν πολλά είδη οργανισμών (σπονδυλωτά και ασπόνδυλα) όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνονται αντίξοες για την επιβίωσή τους. Μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες όπως οι κλιματικές συνθήκες (ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες κ.ά.) ή από άλλους παράγοντες όπως η έλλειψη τροφής (Storey, 2002). Μπορεί να είναι μικρής ή μεγάλης διάρκειας ανάλογα με τον οργανισμό και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρά το ότι η διάπαυση εμφανίζεται σε πολλές ζωικές ομάδες όπως αμφίβια (Etheridge, 1990), ερπετά (Kennett & Christian, 1994), μικρά θηλαστικά (Wilz & Heldmaier, 2000) η φυσιολογία και η βιοχημεία της κατάστασης αυτής έχουν μελετηθεί περισσότερο στα άνουρα αμφίβια και στα χερσαία γαστερόποδα. Τα χερσαία γαστερόποδα κατά τη διάπαυση εκκρίνουν το επίφραγμα, ένα κάλυμμα από βλέννα, για να καλύψουν το στόμιο του κελύφους τους και να μειώσουν έτσι τις απώλειες νερού για όσο διάστημα παραμείνουν ανενεργά (Barnhart, 1983). Η διάπαυση επίσης απαιτεί πλήθος φυσιολογικών και συμπεριφορικών μηχανισμών με σκοπό τη μείωση του μεταβολικού ρυθμού και την εξασφάλιση επαρκών αποθεματικών ουσιών για να εξασφαλιστεί η επιβίωση των ζώων. Η ζωή σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν (κατά περιόδους) αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες επιβάλλει την ύπαρξη προσαρμοστικών μηχανισμών σε πολλά επίπεδα-φυσιολογίας, βιοχημείας, συμπεριφοράς-προκειμένου τα ζώα να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους (Storey, 2002).

1.5.3. Στοιχεία φυσιολογίας

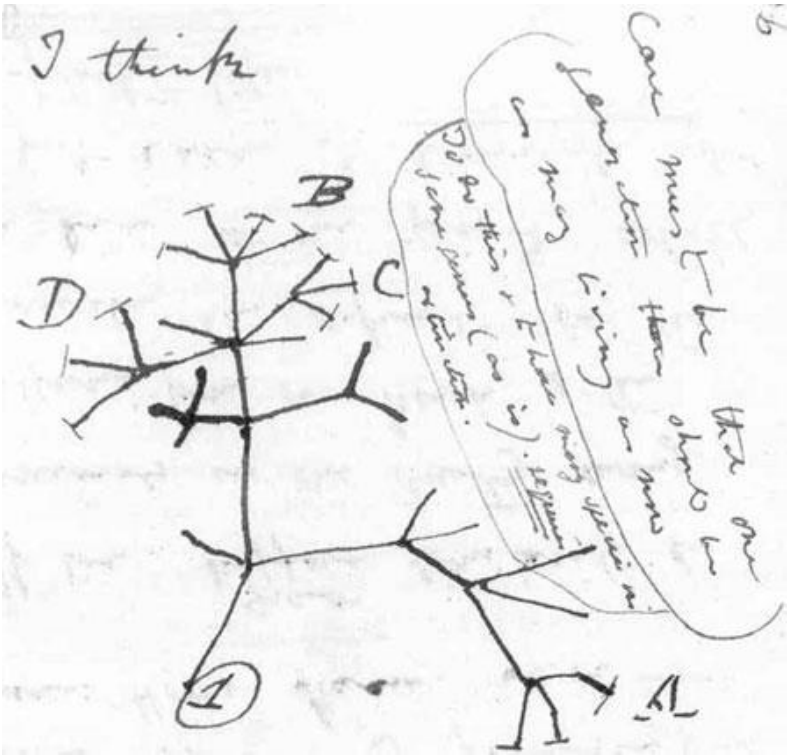
Τα είδη του γένους *Codringtonia* εμφανίζουν, όπως ήδη αναφέρθηκε, κάποιες ιδιαιτερότητες στον κύκλο ζωής τους σε σχέση με άλλα είδη σαλιγκαριών που κατανέμονται στη νότια Ελλάδα. Αυτές οι ιδιαιτερότητες αφορούν τόσο την περίοδο αναπαραγωγής (τα είδη *Codringtonia* αναπαράγονται την άνοιξη, ενώ τα σαλιγκάρια της νότιας Ελλάδας συνήθως αναπαράγονται το φθινόπωρο) όσο και την ύπαρξη δυο

περιόδων κατά τη διάρκεια του έτους κατά τις οποίες τα ζώα δεν είναι δραστήρια (διαχείμαση και διαθέριση). Η διάπαυση, όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνονται αντίξοες, είναι μια κοινή στρατηγική των χερσαίων σαλιγκαριών προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους υπό αντίξοες συνθήκες (Storey, 2002) και έχει μελετηθεί σε αρκετά είδη χερσαίων σαλιγκαριών της Ελλάδας (Giokas, Pafilis & Valakos, 2005; Kotsakiozi *και συν.*, 2012a; Michaelidis, 2002; Michaelidis *και συν.*, 2007). Αυτό το εποχιακό πρότυπο για το οποίο έγινε λόγος παραπάνω (ενεργοποίηση: άνοιξη και φθινόπωρο, διάπαυση: χειμώνας και καλοκαίρι) αντικατοπτρίζεται και στις μεταβολές της βιοχημικής σύστασης των ιστών και γενικότερα στις μεταβολές σε επίπεδο φυσιολογίας κατά τις τέσσερις εποχές του έτους (Giokas *και συν.*, 2007). Για τη φυσιολογία των ειδών *Codringtonia ,* γνωρίζουμε ελάχιστα, χαρακτηριστικό είναι ότι στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει ***μόνο μία*** μελέτη (Giokas *και συν.*, 2007) που αφορά τις φυσιολογικές αποκρίσεις ***ενός μόνο είδους***. Στην εικόνα 1.14 απεικονίζονται οι εποχιακές μεταβολές στη βιοχημική σύσταση, το υδατικό περιεχόμενο των ιστών και τη δραστικότητα του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), ένα ένζυμο που σχετίζεται με την ενεργοποίηση αναερόβιων μεταβολικών μονοπατιών, σε άτομα του είδους *C. helenae* στο πεδίο χωρίς να μεσολαβήσει κανενός είδους εγκλιματισμός σε εργαστηριακές συνθήκες, κατά τη διάρκεια ενός έτους (Giokas *και συν.*, 2007). Από τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται να υπάρχει σαφής διάκριση ανάμεσα στις περιόδους δραστηριότητας και σε αυτές της διάπαυσης. Τα λιπίδια και το γλυκογόνο συσσωρεύονται την άνοιξη, μια περίοδο κατά την οποία τα ζώα είναι δραστήρια και προετοιμάζονται για τη θερινή διάπαυση που θα ακολουθήσει. Οι συγκεντρώσεις των αυτών μειώνονται κατά το καλοκαίρι όταν παρατηρείται επίσης σημαντική μείωση του υδατικού περιεχομένου των ιστών αλλά και σημαντική αύξηση της δραστικότητας της LDH. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της διαχείμασης, δεν παρατηρείται κανένα από τα τρία αυτά χαρακτηριστικά της διαθέρισης. Οι συγγραφείς της εργασίας αυτής καταλήγουν στο ότι η συμπεριφορά του είδους αυτού είναι, κατά ένα μέρος τουλάχιστον, υπολειμματική και σχηματίστηκε σε παλιότερες πιο ψυχρές και υγρές κλιματολογικές συνθήκες (Giokas *και συν.*, 2007).



Εικόνα 1.14. Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση γλυκογόνου, πρωτεϊνών, λιπιδίων, στη δραστικότητα της LDH και την εκατοστιαία περιεκτικότητα σε νερό σε τρεις ιστούς (πόδα, ηπατοπάγκρεας και γεννητικό σύστημα) σε άτομα του είδους *C. helenae.* Η εικόνα προέρχεται από την εργασία (Giokas *και συν.*, 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ- ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ



Το πρώτο σκίτσο ενός εξελικτικού δέντρου από τον Δαρβίνο (1837). Η εικόνα προέρχεται από το βιβλίο: Reconstructing Evolution, 2007.

Η αλληλουχία του DNA κρύβει

την ιστορία των οργανισμών

Emil Zuckerkandl

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κόσμος των ζωντανών οργανισμών διακρίνεται από μια απεριόριστη και θαυμαστή ποικιλομορφία. Ποικιλομορφία στις μορφές, στους μηχανισμούς και στη συμπεριφορά. Αυτό που βλέπουμε δίπλα μας, αυτό που είμαστε είναι αποτέλεσμα μιας μακροχρόνιας πορείας αλλαγών. Ερωτήματα όπως από πού προέρχεται αυτή η ποικιλομορφία, πώς διατηρείται από γενιά σε γενιά και ποια είναι η πηγή της, έχουν απασχολήσει την ανθρώπινη σκέψη από αρχαιοτάτων χρόνων. Μετά το 1859 είναι πλέον αποδεκτό ότι η ζωή είναι αποτέλεσμα της εξελικτικής διαδικασίας. Η κατανόηση της φύσης της ποικιλομορφίας κατέστη δυνατή μετά το 1900 χάρη στην πρόοδο στη γενετική και στη μοριακή βιολογία. Για την κατανόηση της διαδικασίας της εξέλιξης όμως, απαραίτητη είναι και η κατανόηση των βασικών στοιχείων της κληρονομικότητας που εξηγούν την παρατηρούμενη ποικιλότητα (Mayr, 2001).

Απαραίτητο στοιχείο της εξελικτικής διαδικασίας είναι η «αλλαγή». Ως αλλαγή μπορεί γενικά να ορισθεί οποιαδήποτε μεταβολή της σύστασης ενός πληθυσμού ή με όρους γενετικής πληθυσμών οποιαδήποτε αλλαγή στη συχνότητα των γονιδίων (Wilson & Bossert, 1971). Σχεδόν τα πάντα στο αβιοτικό σύμπαν εξελίσσονται, αλλάζουν δηλαδή κατά μια αλληλουχία με σαφή προσανατολισμό. Τα είδη και οι ομάδες ειδών (ανώτερες του είδους ταξινομικές μονάδες) στην ιεραρχία του Λιννάιου σίγουρα εξελίσσονται. Είναι πλέον αποδεκτό ότι το μικρότερο επίπεδο έμβιας οργάνωσης που μπορεί να εξελιχθεί είναι ο πληθυσμός και η εξέλιξη μπορεί κάλλιστα να νοηθεί ως «η γενετική ανανέωση των ατόμων κάθε πληθυσμού από γενιά σε γενιά» (Mayr, 2001). Οι κύριοι παράγοντες (εξελικτικές δυνάμεις) που επιδρούν πάνω στους πληθυσμούς ώστε να φέρουν τη γενετική τους ανανέωση ή με άλλα λόγια να αλλάξουν τις γονιδιακές τους συχνότητες είναι: (α) η μεταλλακτική πίεση, (β) η γονιδιακή ροή, (γ) η επιλογή και (δ) η γενετική παρέκκλιση (Wilson & Bossert, 1971).

Στο παρελθόν υπήρξαν έντονες διαφωνίες ως προς το κατά πόσο οι ιδιότητες ενός οργανισμού οφείλονται στη «φύση» (τα γονίδια του) ή στην «ανατροφή» (περιβάλλον). Η πλειονότητα των ερευνών τα τελευταία 100 χρόνια αποδεικνύουν ότι τα περισσότερα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού επηρεάζονται και από τους δύο παράγοντες. Έτσι γίνεται σαφές ότι σε έναν εγγενώς αναπαραγόμενο πληθυσμό υπάρχουν δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πηγές ποικιλότητας: η ποικιλότητα του γονοτύπου και η ποικιλότητα του φαινοτύπου. Στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες τα διαφορετικά φάσματα αντιδράσεων μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα σχετικά διαφορετική αντίδραση (Mayr, 2001).

Η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μέσα και ανάμεσα στις εξελικτικές βαθμίδες, η εξεύρεση των προτύπων στις γενεαλογικές γραμμές των απογόνων ή η διάσπαση των γενεαλογικών γραμμών αποτελεί το ***αντικείμενο της φυλογένεσης*** η οποία μπορεί να οριστεί πιο απλά ως ***οι σχέσεις ανάμεσα σε ομάδες οργανισμών όπως αυτές αντικατοπτρίζονται στην εξελικτική τους ιστορία*** (Allaby, 1991).

2.1.1. Περί φυλογένεσης

Η φυλογένεση μέχρι σήμερα έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλούς τομείς της επιστημονικής έρευνας όπως για παράδειγμα στην εκτίμηση (ή/και αντιπροσώπευση) της βιοποικιλότητας, για τη μελέτη εισβλητικών ειδών (invasive species) και την αξιολόγηση των προτεραιοτήτων διατήρησης (Mace, Gittleman & Purvis, 2003). Ακόμη, φυλογενέσεις που περιλαμβάνουν πολλά είδη, οι οποίες περιέχουν και μια εκτίμηση για το χρόνο απόκλισης των κλάδων, φέρουν και πληροφορία για τους ρυθμούς των εξαφανίσεων αλλά και για την ειδογένεση που ακολουθεί τις μαζικές εξαφανίσεις (Bromham, Phillips & Penny, 1999). Πολλές συγκριτικές μελέτες, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του κινδύνου εξαφάνισης (model extinction risk), καθώς αυτός θεωρείται βιολογικό χαρακτηριστικό των ειδών, και έτσι μπορεί να αξιολογηθεί η κατάσταση ειδών για τα οποία δεν γνωρίζουμε τον κίνδυνο εξαφάνισης τους (Purvis *και συν.*, 2000). Τέλος, η φυλογένεση είναι ζωτικής σημασίας και για τον κλάδο της σύγχρονης επιδημιολογίας. Το να καταλαβαίνουμε πώς σχετίζονται οι οργανισμοί (αλλά και τα γονίδια τους) μεταξύ τους, είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο που βοηθάει στον προσδιορισμό και στην κατηγοριοποίηση ταχέως εξελισσόμενων νόσων καθώς επίσης και στην πρόβλεψη επιδημιών (Ferguson, Galvani & Bush, 2003; Ross & Rodrigo, 2002).

Το πρόβλημα που πρέπει κανείς να αντιμετωπίσει όταν προσπαθεί να ανακατασκευάσει την εξελικτική ιστορία των ομάδων που μελετά (π.χ. ειδών), είναι ότι τα εξελικτικά γεγονότα συνέβησαν στο παρελθόν. Δυστυχώς, δεν έχουμε μηχανή του χρόνου όπως φαντάστηκε ο H.G. Wells, και υπάρχουν μόνο λίγες άμεσες παρατηρήσεις ή πειραματικά αποτελέσματα για τις εξελικτικές διαδικασίες. Τα περισσότερα δεδομένα που χρησιμοποιούμε είναι σύγχρονα και έτσι αναγκαζόμαστε να βασιστούμε σε μαθηματικά μοντέλα για να κατανοήσουμε το παρελθόν (Gascuel & Steel, 2007).

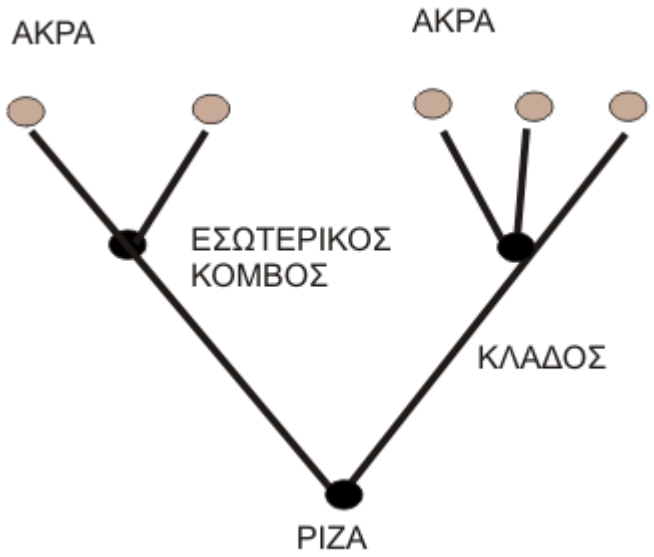
Οι αλληλουχίες DNA είναι πολύτιμο εργαλείο για την κατανόηση του παρελθόντος και την ανακατασκευή των σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Μεγάλο μέρος της σύγχρονης βιολογίας στηρίζεται πλέον στην εκμετάλλευση της πληροφορίας που είναι αποθηκευμένη στις αλληλουχίες των γονιδίων. Στις εξελικτικές μελέτες, οι αλληλουχίες των γονιδίων χρησιμεύουν ως ένα ανεκτίμητο «έγγραφο» που αφορά την ιστορία της

ζωής στη γη. Αυτό είναι και το αντικείμενο μελέτης του κεφαλαίου αυτού, να «διερευνηθεί» η εξελικτική πληροφορία που είναι καταγεγραμμένη στις αλληλουχίες των γονιδίων και πώς αυτή η πληροφορία μπορεί να ανακτηθεί. Αυτή είναι η μοριακή εξέλιξη.

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί σχετίζονται μέσω της κοινής καταγωγής. Η ανακατασκευή αυτού του προτύπου, το «Δέντρο της Ζωής», είναι ένας από τους πρωταρχικούς στόχους της εξελικτικής βιολογίας. Τι είναι όμως ένα φυλογενετικό δέντρο; Ένα δέντρο είναι μια μαθηματική δομή η οποία χρησιμοποιείται για να οπτικοποιήσει την πραγματική εξελικτική ιστορία μιας ομάδας αλληλουχιών ή οργανισμών. Αυτό το πραγματικό σχεδιάγραμμα των ιστορικών σχέσεων είναι η φυλογένεση ή το εξελικτικό δέντρο που προσπαθούμε να κατασκευάσουμε. Ένα δέντρο (Εικόνα 2.1) αποτελείται από κόμβους που συνδέουν κλάδους μεταξύ τους (ονομάζονται επίσης άκρα). Τα άκρα αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες ή οργανισμούς για τους οποίους έχουμε στοιχεία και μπορεί να υπάρχουν σήμερα ή να έχουν εξαφανιστεί. Οι εσωτερικοί κόμβοι αντιπροσωπεύουν υποθετικούς προγόνους και ο πρόγονος όλων των ακολουθιών που αποτελούν το δέντρο είναι η ρίζα του δένδρου (Page & Holmes, 1998).

2.1.2. Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης

Η μοριακή φυλογένεση μετατρέπει την πληροφορία από αλληλουχίες (π.χ. νουκλεοτιδικές) σε ένα εξελικτικό δέντρο για αυτές τις αλληλουχίες. Σήμερα χρησιμοποιούνται πολλές μέθοδοι στη φυλογενετική ανάλυση, κάθε μια από τις οποίες έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της για αυτό οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν περισσότερες από μια μεθόδους (η καθεμία βασίζεται σε διαφορετικές παραδοχές) για να βρουν τα σημεία σύγκλισης μεταξύ των αποτελεσμάτων τους. Οι πιο γνωστές από αυτές τις μεθόδους είναι: η ανάλυση Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony), η ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximun Likelihood), η Μπεϋσιανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference) και η ανάλυση Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor Joining). Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν με κριτήριο (i) τα δεδομένα που χρησιμοποιούν, σε αυτές που χρησιμοποιούν μήτρες αποστάσεων και σε αυτές που χρησιμοποιούν ξεχωριστούς χαρακτήρες και (ii) με κριτήριο τον τρόπο που κατασκευάζουν τα δέντρα σε μεθόδους ομαδοποίησης ή μεθόδους διερεύνησης δέντρων (Page & Holmes, 1998).

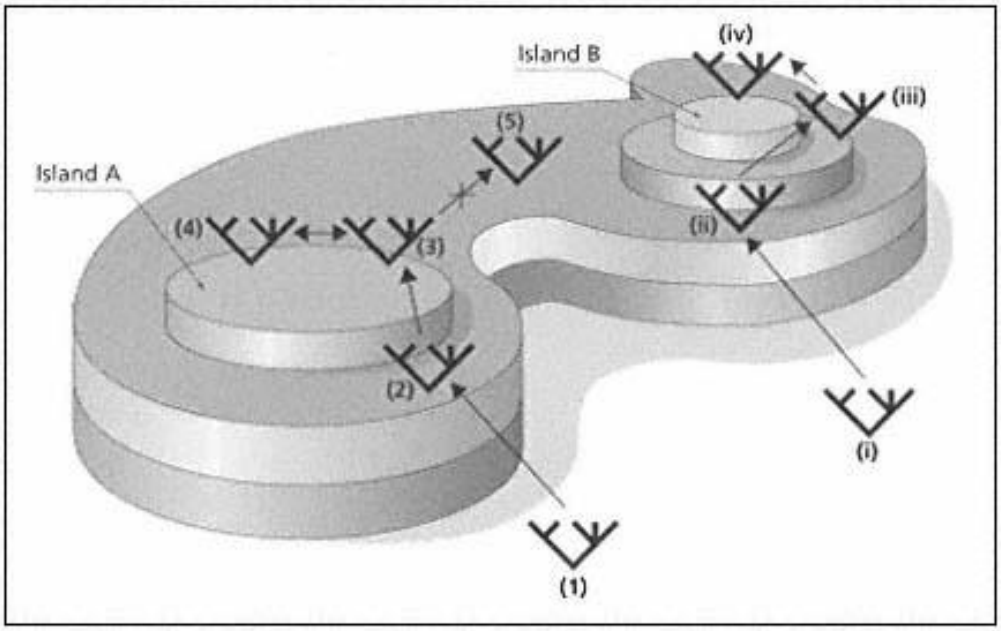


Εικόνα 2.1. Παράδειγμα φυλογενετικού δέντρου, όπου φαίνονται οι έννοιες του κλάδου, της ρίζας του δέντρου και οι μαύροι κύκλοι δηλώνουν τους εσωτερικούς κόμβους, οι γκρι χρώματος κύκλοι τα άκρα του δέντρου (π.χ. είδη). Η εικόνα είναι ανακατασκευή από το βιβλίο *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach (1998).*

Η μέθοδος της ***Σύνδεσης Γειτόνων*** βασίζεται σε μήτρα αποστάσεων, δηλαδή με βάση τα πρωτογενή δεδομένα (π.χ. νουκλεοτιδικές αλληλουχίες) καταλήγει σε μήτρα αποστάσεων και με βάση αυτή καταλήγει σε πολύ σύντομο χρόνο σε ένα και μοναδικό δέντρο. Συγκεκριμένα, ξεκινάει με ένα ακτινωτό δέντρο (star tree) και στη συνέχεια δημιουργεί ομάδες, ομαδοποιώντας τα τάξα ανά δυο με βάση τη γενετική τους απόσταση, μέχρις ότου επιλυθεί πλήρως η φυλογένεση (Yang & Rannala, 2012). Αυτή είναι η βασική αρχή της μεθόδου, όμως το ερώτημα είναι κατά πόσο υπάρχει ***το «σωστό» δέντρο*** που απεικονίζει με απόλυτη ακρίβεια τη σειρά των γεγονότων που συνέβησαν στο παρελθόν αλλά και τον ακριβή τρόπο διαφοροποίησης των ομάδων που μελετώνται; Αυτό που γίνεται στη μοριακή φυλογένεση είναι να διατυπώνονται υποθέσεις που εξηγούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο (λαμβάνοντας υπ' όψιν τα υπάρχοντα πρωτογενή δεδομένα αλλά και τα διαθέσιμα υπολογιστικά προγράμματα) τα πρότυπα που παρατηρούνται σήμερα, έτσι προτιμώνται οι άλλες μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης (δηλαδή οι μέθοδοι διερεύνησης δέντρων) καθώς καταλήγουν σε μια ομάδα πιθανών δέντρων (και όχι σε ένα δέντρο) και από αυτά επιλέγονται τα «καλύτερα» εφαρμόζοντας τα κριτήρια της εκάστοτε μεθόδου, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι υπάρχουν και άλλα δέντρα που εξηγούν επίσης τα διαθέσιμα δεδομένα με ικανοποιητικό τρόπο. Βέβαια εδώ πρέπει να διευκρινιστεί ότι αυτό δεν είναι μειονέκτημα της μεθόδου (μέθοδος αποστάσεων) αυτής καθαυτής αλλά των διαθέσιμων υπολογιστικών προγραμμάτων που πραγματοποιούν την ανάλυση. Παρ' όλα αυτά, είναι γεγονός ότι με τις μεθόδους αποστάσεων χάνεται ένα σημαντικό μέρος της διαθέσιμης πληροφορίας

(Page & Holmes, 1998). Για αυτό παρακάτω θα αναφερθούν συνοπτικά (αναλυτική και εκτενής περιγραφή των φυλογενετικών μεθόδων έχει γίνει σε άλλα συγγράμματα (Page & Holmes, 1998; Parmakelis, 2003; Poulakakis, 2005)) μόνο οι μέθοδοι διερεύνησης δέντρων καθώς είναι αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή, ενώ τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων καθώς και η βασική αρχή της καθεμίας αναφέρονται στον Πίνακα 2.1.

Η ανάλυση ***Μέγιστης Φειδωλότητας (ΜΦ)*** βασίζεται στο ότι το «καλύτερο» δέντρο είναι αυτό που προκύπτει με τον ***ελάχιστο αριθμό αλλαγών***. Το δέντρο αυτό μπορεί να κατασκευαστεί με βάση τις αλληλουχίες (π.χ. νουκλεοτιδικές) που διαθέτουμε και οι οποίες μπορεί να ποικίλουν σε μήκος. Το ερώτημα είναι αν χρησιμοποιείται το σύνολο των θέσεων στην κατασκευή του δέντρου (δηλαδή όλες οι νουκλεοτιδικές βάσεις του συνόλου δεδομένων). Στην πραγματικότητα δεν χρησιμοποιούνται όλες οι θέσεις καθώς κάποιες από αυτές δεν είναι καθόλου χρήσιμες στην ανάλυση. Για παράδειγμα, οι θέσεις που είναι αμετάβλητες σε όλα τα είδη (δηλαδή σε μία συγκεκριμένη θέση υπάρχει το ίδιο νουκλεοτίδιο σε όλα τα είδη) δεν χρησιμοποιούνται στην ανάλυση. Άλλη μια περίπτωση που δεν λαμβάνεται υπ' όψιν για την κατασκευή του δέντρου, είναι οι θέσεις που αλλάζουν μόνο σε ένα είδος και σε όλα τα άλλα παραμένουν αμετάβλητες (singleton sites). Επομένως, λαμβάνονται υπ' όψιν μόνο οι πληροφοριακές θέσεις (parsimony informative sites) δηλαδή εκείνες στις οποίες παρατηρούνται δύο τουλάχιστον διαφορετικοί χαρακτήρες, τουλάχιστον δύο φορές ο καθένας (Yang & Rannala, 2012).



Εικόνα 2.2. Ξεκινώντας από το δέντρο 1 η ανάλυση μπορεί να φτάσει στα δέντρα 3 και 4 (λόφος A) τα οποία όμως δεν είναι τα βέλτιστα καθώς υπάρχει καλύτερο δέντρο από αυτά το iv (λόφος B) στο οποίο θα καταλήξει η ανάλυση αν ξεκινήσει από το δέντρο i. Στην περίπτωση όμως που ξεκινήσει από το δέντρο 1 δεν θα βρει το iv γιατί αν προσπαθήσει να κινηθεί από το 3 (ή το 4) προς το iv μεσολαβεί το δέντρο 5 που δεν είναι καλύτερο από το 3 (ή το 4) οπότε η ανάλυση θα παγιδευτεί στον μη βέλτιστο λόφο A. Η εικόνα προέρχεται από το βιβλίο *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach (1998)*.

Η ανάλυση ***Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ΜΠ)*** είναι πλέον ***ευρέως χρησιμοποιούμενη*** μέθοδος και σε αυτό συνέβαλε η ανάπτυξη ρεαλιστικών μοντέλων νουκλεοτιδικής υποκατάστασης (βλ. παράγραφος 2.1.4) αλλά και η αύξηση της υπολογιστικής δύναμης. Η τοπολογία του δέντρου που προκύπτει από αυτή τη μέθοδο είναι περισσότερο ένα μοντέλο με παραμέτρους (α) το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης και (β) τα μήκη των κλάδων των διαφορετικών δέντρων. Το συναινετικό δέντρο που προκύπτει από τη ΜΠ συνδυάζει πολλά μοντέλα, με τον ίδιο αριθμό παραμέτρων το καθένα (Yang & Rannala, 2012).

Η ***Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (ΜΣ)*** διαφέρει από τη ΜΠ στο ότι οι παράμετροι του μοντέλου θεωρούνται τυχαίες μεταβλητές με στατιστική κατανομή στη ΜΣ, ενώ στη ΜΠ θεωρούνται άγνωστες και σταθερές. Πιο συγκεκριμένα, πριν την ανάλυση οι παράμετροι κατανέμονται σε μια πρώτη κατανομή και στη συνέχεια, αυτή η κατανομή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τα δεδομένα, για να υπολογιστεί μια εκ των υστέρων κατανομή. Στη συνέχεια όλες οι εκτιμήσεις που γίνονται βασίζονται σε αυτή την εκ των υστέρων κατανομή. Η ΜΣ άρχισε να χρησιμοποιείται κυρίως τα ***20 τελευταία χρόνια*** και αυτό ***χάρη στη μέθοδο Metropolis-coupled Markov Chain***

Monte Carlo (MCMCMC) και την αύξηση της υπολογιστικής δύναμης (Yang & Rannala, 2012).

Η ***μέθοδος MCMCMC***, μπορεί να θεωρηθεί σαν μια ομάδα ανεξάρτητων αναζητήσεων που περιστασιακά ανταλλάσσουν πληροφορίες. Έτσι επιτρέπεται στην αναζήτηση να διασχίσει μια κοιλάδα και να μην παγιδευτεί σε έναν μη βέλτιστο λόφο (Εικόνα 2.2). Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια ομάδα δέντρων η οποία έχει αξιολογηθεί επανειλημμένως. Αυτή η ομάδα συγκροτεί την κορυφή του λόφου. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το ότι απαντάει άμεσα ερωτήματα και καταλήγει σε αποτελέσματα που είναι εύκολο να ερμηνευθούν. Για παράδειγμα οι εκ των υστέρων πιθανότητες των δέντρων είναι οι πιθανότητες αυτό το δέντρο να είναι σωστό με βάση το μοντέλο και τα δεδομένα.

Όλες οι μέθοδοι που περιγράφηκαν στον παραπάνω πίνακα είναι μέθοδοι διερεύνησης δέντρων, αυτό σημαίνει ότι αναζητούν το «καλύτερο» δέντρο (ή τα καλύτερα δέντρα) μέσα από μια ομάδα πιθανών δέντρων (Εικόνα 2.2). Το ερώτημα είναι πώς; Υπάρχουν τρεις ***τρόποι αναζήτησης δέντρων***: (α) η διεξοδική (exhaustive) αναζήτηση, η οποία όμως μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε εξαιρετικά μικρά σύνολα δεδομένων καθώς ψάχνει όλα τα πιθανά δέντρα για να καταλήξει στο καλύτερο, (β) η μέθοδος κλαδί και άλμα (branch and bound) η οποία επίσης εγγυάται ότι θα βρει το καλύτερο δέντρο αλλά και πάλι για μεγάλο αριθμό τάξων ο χρόνος είναι απαγορευτικός και (γ) η ευρετική (heurestic) που αποτελεί τη χρυσή τομή ανάμεσα στην επιθυμία μας να βρεθεί το καλύτερο δέντρο και τον χρόνο που θα χρειαστεί για να συμβεί αυτό.

Η ΜΣ και η ΜΦ καταλήγουν τελικά σε μια ομάδα από εξίσου «καλά» δέντρα με τους τρόπους που αναφέρθηκαν παραπάνω, πώς λοιπόν από αυτά ***επιλέγεται*** τελικά ***το ένα δέντρο***; Μια καλή λύση είναι να υπολογιστεί ένα συναινετικό (consensus) δέντρο με βάση κάποιο κριτήριο που να συνοψίζει την κοινή πληροφορία από όλες τις τοπολογίες. Υπάρχουν δύο τρόποι κατασκευής του συναινετικού δέντρου (i) το 50% πλειοψηφικής αποδοχής δέντρο (50% majority rule) δηλαδή εκείνο στο οποίο εμφανίζονται οι κλάδοι που υπάρχουν στο 50%, τουλάχιστον, των φειδωλότερων δέντρων και (ii) το δέντρο απόλυτης αποδοχής (strict consensus) δηλαδή εκείνο στο οποίο εμφανίζονται μόνο οι κλάδοι που υπάρχουν σε όλα τα πλέον φειδωλά (ή γενικά καλά) δέντρα. Μια άλλη επιλογή είναι η εφαρμογή της τεχνικής bootstrap (βλ. παρακάτω). Το δέντρο bootstrap, όπως και το συναινετικό δέντρο, δεν δείχνει μήκη κλάδων, δείχνει όμως πόσες φορές εμφανίζεται ο συγκεκριμένος κλάδος (ομάδα τάξων).

Το ερώτημα που προκύπτει μετά από όλα αυτά είναι: πόσο αξιόπιστα είναι τα δέντρα στα οποία καταλήγουν οι αναλύσεις; Με τον όρο αξιοπιστία νοείται η πιθανότητα

τα μέλη ενός συγκεκριμένου κλάδου να είναι πάντοτε μέλη αυτού του κλάδου. Για αυτό χρησιμοποιείται μια δειγματοληπτική μέθοδος που ονομάζεται bootstrap και πραγματοποιεί ψευδό-επαναλήψεις των δεδομένων. Μια πολύ απλή περιγραφή της μεθόδου είναι ότι χρησιμοποιεί τις στοιχισμένες αλληλουχίες και αναδιατάσσει τις βάσεις έτσι ώστε να κατασκευάσει μια άλλη στοίχιση (ψευδό-στοίχιση) η οποία όμως να μην έχει την ίδια αλληλουχία βάσεων με την αρχική-πραγματική. Δηλαδή ένας τυχαίος χαρακτήρας (π.χ. νουκλεοτιδική βάση) χρησιμοποιείται ως η πρώτη θέση στην ψευδό-στοίχιση. Στη συνέχεια μια άλλη τυχαία θέση τοποθετείται στη δεύτερη θέση της ψευδό-στοίχισης, και η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι η ψευδό-στοίχιση να έχει τον ίδιο αριθμό χαρακτήρων με την αρχική στοίχιση. Η διαφορά σε σχέση με την πραγματική αλληλουχία είναι ότι η ψευδό-στοίχιση ενώ διαθέτει τον ίδιο αριθμό θέσεων οι θέσεις διατάσσονται με διαφορετική σειρά. Φυσικά, με τον τρόπο που σχηματίζεται αυτή η ψευδό-στοίχιση (δειγματοληπτικά) κάποια θέση μπορεί να τοποθετηθεί στην ψευδό-στοίχιση πάνω από μία φορά, ή μπορεί να μην εμφανίζεται καθόλου. Στη συνέχεια κατασκευάζεται ένα δέντρο βάσει της ψευδό-στοίχισης με την ίδια μέθοδο και τις ίδιες παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή του αρχικού δέντρου (αυτού από την πραγματική αλληλουχία). Κατόπιν συγκρίνεται το αρχικό δέντρο με το νέο δέντρο. Σε κάθε κλάδο του αρχικού δέντρου δίνεται η τιμή 1 εάν αυτός ο κλάδος υπάρχει και στο νέο δέντρο, και η τιμή 0 εάν αυτός ο κλάδος απουσιάζει από το νέο δέντρο. Αυτή η διαδικασία αποτελεί ένα δείγμα bootstrap. Η τιμή κάθε κλάδου καταγράφεται και ξεκινά ένας νέος κύκλος bootstrap. Συνήθως γίνονται 100 ως 1000 τέτοιες δοκιμασίες γιατί όσο αυξάνονται οι κύκλοι τόσο αυξάνεται και ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η ανάλυση. Στο τέλος προκύπτει ένα δέντρο στο οποίο, για κάθε κλάδο, φαίνεται πόσες φορές αυτός ο κλάδος εμφανίστηκε στις bootstrap επαναλήψεις.

Πίνακας 2.1. Συνοπτική παρουσίαση των μεθόδων φυλογενετικής ανάλυσης. Συντμήσεις: ΜΦ: Μέγιστη Φειδωλότητα, ΜΠ: Μέγιστη Πιθανοφάνεια, ΜΣ: Μπεϋσιανή Συμπερασματολογία.

Μέθοδος	Βασική αρχή	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
ΜΦ	Το πιο πιθανό δέντρο είναι αυτό που απαιτεί τον μικρότερο αριθμό αλλαγών. Καταλήγει σε ομάδα από φειδωλά δέντρα και από αυτά επιλέγεται ένα συναινετικό.	1. Απλή και σχετικά γρήγορη.	1. Χωρίς εξελικτικό μοντέλο είναι αδύνατο να ερμηνευθούν τα δεδομένα. 2. Επηρεάζεται από τον ρυθμό εξέλιξης των αλληλουχιών έτσι όταν υπάρχουν κάποιες αλληλουχίες που εξελίσσονται γρήγορα και κάποιες αργά (ή αν οι αλληλουχίες είναι πολύ διαφορετικές), οδηγεί σε παρερμηνείες (long branches attract).
ΜΠ	Με δεδομένο μοντέλο εξελικτικής αλλαγής και δεδομένο δέντρο, πόσο πιθανό είναι να προκύψουν τα πρωτογενή δεδομένα; Καταλήγει συνήθως σε ένα δέντρο που είναι αυτό με τη μεγαλύτερη πιθανοφάνεια.	1. Δυναμική προσέγγιση 2. Μπορούμε να προσδιορίσουμε το εξελικτικό μοντέλο που θέλουμε. 3. Μπορεί να χρησιμοποιήσει πολύπλοκα μοντέλα.	1. Σχετικά αργή 2. Επηρεάζεται πολύ από το μοντέλο εξελικτικής αλλαγής, για αυτόν τον λόγο πρέπει το μοντέλο να επιλέγεται με πολύ προσοχή.
ΜΣ	Με δεδομένο μοντέλο εξελικτικής αλλαγής και με αυτά τα πρωτογενή δεδομένα, πόσο πιθανό είναι το δέντρο που εξετάζεται κάθε φορά; Καταλήγει στα πλέον πιθανά δέντρα δηλαδή εκείνα που δεν επιδέχονται πλέον βελτίωση.	1. Επιτρέπει την εφαρμογή ρεαλιστικών μοντέλων 2. Οι εκ των προτέρων πιθανότητες επιτρέπουν την ενσωμάτωση επιπλέον πληροφοριών ή γνώσης.	1. Επηρεάζεται ως έναν βαθμό από το μοντέλο εξελικτικής αλλαγής. 2. Η ανάλυση MCMC απαιτεί μεγάλη υπολογιστική δύναμη. 3. Σε μεγάλα σύνολα δεδομένων η σύγκλιση μπορεί να απαιτεί πολύ χρόνο (δηλαδή να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί). 4. Κάποιες φορές οι εκ των υστέρων πιθανότητες υπερεκτιμώνται.

2.1.3. Έλεγχος φυλογενετικού σήματος

Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις βασίζονται στο ότι οι χαρακτήρες (π.χ. νουκλεοτιδικές αλληλουχίες) που αναλύονται εξελίσσονται με έναν τέτοιο ρυθμό ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί με ακρίβεια η φυλογένεση εξετάζοντας αυτούς τους χαρακτήρες. Μέχρι πρόσφατα όμως η υπόθεση αυτή δεν ελέγχονταν στατιστικά. Με άλλα λόγια αν ο ρυθμός εξέλιξης των χαρακτήρων είναι τόσο υψηλός, ώστε μεταξύ των διαδοχικών κόμβων ενός φυλογενετικού δέντρου, οι χαρακτήρες να αλλάζουν τυχαία και όχι λόγω κάποιας εξελικτικής/ιστορικής σχέσης των υπό εξέταση ομάδων, τότε έχουμε «τυχαίο θόρυβο» (random noise) και όχι «φυλογενετικό σήμα» (phylogenetic signal). Μια φυλογενετική ανάλυση με τέτοιους χαρακτήρες είναι απίθανο να αποκαλύψει τις πραγματικές εξελικτικές σχέσεις των ομάδων που μελετώνται. Για αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητο να ελέγχονται (στατιστικά) οι χαρακτήρες που θα χρησιμοποιηθούν στη φυλογενετική ανάλυση για την ύπαρξη ή μη φυλογενετικού σήματος (Hillis & Huelsenbeck, 1992).

2.1.4. Μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

Όταν έχουμε δυο αλληλουχίες στη διάθεση μας το ερώτημα που προκύπτει αμέσως είναι «ποιο είναι το μέγεθος της εξελικτικής αλλαγής που έχει συμβεί σε αυτές τις δύο αλληλουχίες». Μια πολύ απλή προσέγγιση είναι να μετρήσουμε τις γενετικές θέσεις στις οποίες διαφέρουν (απόσταση των αλληλουχιών-genetic distance). Αυτό όμως μπορεί να οδηγήσει σε υποτίμηση των πραγματικών αλλαγών διότι μια συγκεκριμένη θέση μπορεί να υποστεί επαναλαμβανόμενες αλλαγές (και έτσι σταδιακά να επιστρέψει στην αρχική κατάσταση) και με την πάροδο του χρόνου οι αλλαγές που μπορούν να παρατηρηθούν σταδιακά λιγοστεύουν. Για την αποφυγή προβλημάτων όπως το προηγούμενο, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι (μοντέλα) που μετατρέπουν τις παρατηρούμενες αλλαγές σε πραγματικές εξελικτικές αλλαγές και ονομάζονται μέθοδοι διόρθωσης της απόστασης (distance correction methods). Υπάρχει μια σειρά τέτοιων μεθόδων, οι διαφορές τους εντοπίζονται στις παραδοχές που κάνει το κάθε μοντέλο (Page & Holmes, 1998). Στη συνέχεια θα αναφερθούν περιληπτικά μόνο τρία από αυτά τα μοντέλα που είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις της διατριβής. Πριν την όποια ανάλυση των μοντέλων είναι απαραίτητο να οριστούν οι έννοιες της μετάπτωσης (Transition-Ts) και της μεταστροφής (Transversion-Tv). Τα νουκλεοτίδια διακρίνονται σε πουρίνες (A και G) και πυριμιδίνες (T, U και C). Όταν γίνεται μια αντικατάσταση από πουρίνη σε πουρίνη

ή από πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη τότε αυτή ονομάζεται μετάπτωση, αν όμως η αντικατάσταση είναι από πουρίνη σε πυριμιδίνη ή το αντίστροφο τότε ονομάζεται μεταστροφή (Page & Holmes, 1998). Το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura (K2P) δέχεται ότι οι συχνότητες και των τεσσάρων νουκλεοτιδικών βάσεων είναι ίσες και ότι οι μεταστροφές έχουν διαφορετικό ρυθμό υποκατάστασης από τις μεταπτώσεις (δηλαδή θεωρεί ότι οι μεταπτώσεις και οι μεταστροφές δεν είναι το ίδιο συχνές) έτσι με ένα μαθηματικό τύπο υπολογίζει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση (Kimura, 1980). Το μοντέλο των Hasegama, Kishino και Yano (1985) (HKY85) διαφέρει από το K2P στο ότι θεωρεί ότι οι συχνότητες των τεσσάρων νουκλεοτιδίων διαφέρουν. Τέλος, το μοντέλο των Tamura και Nei (1993) (TrN) επιτρέπει τρεις τύπους υποκαταστάσεων (δύο μεταπτώσεις και μια μεταστροφή) και διαφορετική συχνότητα νουκλεοτιδίων.

Όλες οι μέθοδοι διόρθωσης της απόστασης βασίζονται σε κάποιες κοινές παραδοχές:

1. Η αλλαγή σε μία νουκλεοτιδική θέση είναι ανεξάρτητη από την αλλαγή σε κάποια άλλη θέση.
2. Ο ρυθμός υποκατάστασης είναι σταθερός μέσα στο χρόνο και στις διαφορετικές γενεαλογικές γραμμές.
3. Η σύνθεση των βάσεων είναι σε ισορροπία.
4. Οι κατά συνθήκη πιθανότητες να αλλάξει κάποια θέση είναι ίδιες για όλες τις θέσεις και δεν αλλάζουν με τον χρόνο.

Φυσικά υπάρχουν περιπτώσεις που όλες αυτές οι υποθέσεις δεν μπορεί να πληρούνται και έτσι οι μέθοδοι αυτές γίνονται μη ρεαλιστικές. Για παράδειγμα, η πρώτη υπόθεση δεν μπορεί να ισχύει σε περιπτώσεις όπως σε αυτή του rRNA το οποίο αναδιπλώνεται και σχηματίζει «στελέχη» και «θηλιές» με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, έτσι αν συμβεί κάποια αλλαγή σε μία θέση που να μην επιτρέπει τη σωστή αναδίπλωση του μορίου, τότε είναι πιθανό να συμβεί και κάποια άλλη αντισταθμιστική αλλαγή σε κάποια άλλη θέση έτσι ώστε να εξυπηρετείται η σωστή αναδίπλωση του μορίου (Page & Holmes, 1998).

2.1.5. Μοριακό ρολόι

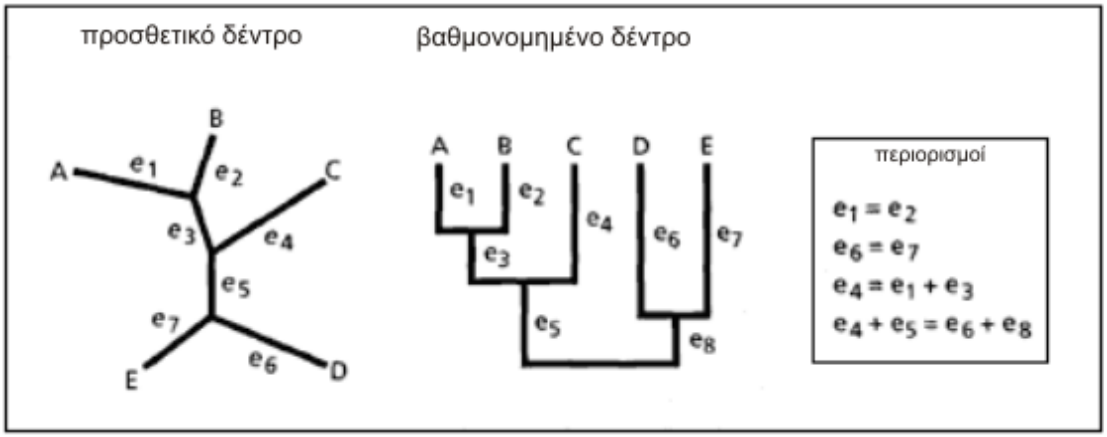
Το μοριακό ρολόι (molecular clock) δηλαδή η παραδοχή ότι η εξέλιξη των γονιδίων συμβαίνει με σταθερό ρυθμό και για τον λόγο αυτό οι μοριακές διαφορές μεταξύ δύο τάξα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του χρόνου που

παρήλθε από τον διαχωρισμό τους. Το μοριακό ρολόι είναι ίσως ένας από τους πιο συναρπαστικούς και ταυτόχρονα αντιφατικούς (Avise, 1994; Goodman, 1981a; Goodman, 1981b; Wilson *και συν.*, 1985) ισχυρισμούς στη μοριακή εξέλιξη. Το μοριακό ρολόι δεν είναι απλά ένας γενικός εξελικτικός κανόνας, είναι μια υπόθεση/παραδοχή που επιτρέπει την εκτίμηση του χρόνου απόκλισης των κλάδων απλώς παρατηρώντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων τους. Με άλλα λόγια αν αποδειχθεί η ισχύς του μοριακού ρολογιού (στις υπό εξέταση αλληλουχίες) αυτό σημαίνει ότι η γενετική απόσταση μεταξύ των ομάδων που μελετώνται (π.χ. μεταξύ των ειδών) μπορεί να «μεταφραστεί» σε χρόνο απόκλισης των ομάδων αυτών. Η ισχύς του μοριακού ρολογιού δεν σημαίνει ότι όλα τα γονίδια (και οι πρωτεΐνες) εξελίσσονται ακριβώς με τον ίδιο ρυθμό. Είναι σαφές ότι τα διαφορετικά συστήματα εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς, για παράδειγμα είναι γνωστό ότι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) εξελίσσεται ταχύτερα από το πυρηνικό (Galtier *και συν.*, 2009). Το ερώτημα που αφορά την ισχύ του μοριακού ρολογιού (και της θεωρίας της ουδετερότητας-neutral theory) είναι αν ο ρυθμός εξέλιξης εντός συγκεκριμένων γονιδίων είναι σταθερός στο χρόνο. Ωστόσο, ακόμα και αν μακροπρόθεσμα ο μέσος ρυθμός εξέλιξης είναι σταθερός, αυτό δεν αποκλείει μικρές (σε διάρκεια) διακυμάνσεις στον ρυθμό εξέλιξης των αλληλουχιών. Ακόμη, επειδή πολλοί ερευνητές αμφισβητούν την ισχύ του μοριακού ρολογιού, πρέπει να διευκρινιστεί ότι δεν υπάρχει ένα «**παγκόσμιο**» ρολόι που ισχύει για όλους τους οργανισμούς (μη συγγενικά είδη) αλλά πρόκειται για ένα «**τοπικό**» μοριακό ρολόι, που εάν επαληθευτεί η ισχύς, θα μπορούσε να εφαρμοσθεί μόνο στην ομάδα των οργανισμών που μελετώνται (Poulakakis, 2005). Υπάρχουν πολλές μελέτες στη μοριακή εξέλιξη που αφορούν τον έλεγχο της ισχύος του μοριακού ρολογιού και όπως είναι αναμενόμενο υπάρχουν και πολλές μέθοδοι όπως είναι ο Πίνακας διασποράς (the dispersion index), η δοκιμασία του σχετικού ρυθμού (the relative rate test) και η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test-LRT) που ελέγχουν την ισχύ του (Page & Holmes, 1998). Στη συνέχεια θα αναλυθεί μόνο η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (LRT) καθώς είναι η πιο κοινή χρησιμοποιούμενη δοκιμασία για τον έλεγχο της ισχύος του μοριακού ρολογιού και αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή. Η δοκιμασία αυτή είναι ένας τρόπος να ελέγχονται εναλλακτικές υποθέσεις που αφορούν στα ίδια δεδομένα και είναι ουσιαστικά ο λόγος της πιθανότητας μιας εναλλακτικής υπόθεσης προς την πιθανότητα της μηδενικής υπόθεσης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πραγματοποιηθεί έλεγχος μιας ποικιλίας από υποθέσεις όπως αν ισχύει ένα

συγκεκριμένο μοντέλο μοριακής εξέλιξης, αν μια φυλογενετική υπόθεση είναι (στατιστικά) σημαντικά καλύτερη από μια άλλη και τέλος αν το μοριακό ρολόι περιγράφει επαρκώς τα υπό εξέταση δεδομένα (Page & Holmes, 1998). Η δοκιμασία αυτή δέχεται ότι αν δεν ισχύει το μοριακό ρολόι για τα δεδομένα (δηλαδή αν οι αλληλουχίες εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς) τότε ένα προσθετικό δέντρο (additive tree) θα μπορούσε να απεικονίσει καλύτερα τις σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών σε σχέση με ένα χρονικά βαθμονομημένο δέντρο (ultrametric tree) (Εικόνα 2.3). Ωστόσο, αν δεχτούμε σταθερό ρυθμό εξέλιξης των αλληλουχιών τότε το προσθετικό δέντρο δεν θα είναι (στατιστικά) σημαντικά καλύτερο από το χρονικά βαθμονομημένο δέντρο. Έτσι κατασκευάζονται δύο δέντρα με την ίδια τοπολογία (ένα με την ισχύ του μοριακού ρολογιού και ένα χωρίς) και υπολογίζεται η διαφορά των πιθανοτήτων σύμφωνα με τον τύπο:

$$\boldsymbol{2\Delta = Log(Lno_clock) - Log(Lclock)}$$

Όπου *Lno_clock* η πιθανοφάνεια του δέντρου χωρίς την ισχύ του μοριακού ρολογιού, *Lclock* η πιθανοφάνεια του δέντρου με την ισχύ του μοριακού ρολογιού, Δ η διαφορά του λογαρίθμου των δύο πιθανοφανειών. Στη συνέχεια ελέγχεται αν αυτή η διαφορά είναι σημαντική ή όχι και άρα αν ισχύει ή όχι το μοριακό ρολόι.



Εικόνα 2.3. Προσθετικό (additive tree) και χρονικά βαθμονομημένο δέντρο (ultrametric tree) για τις ίδιες αλληλουχίες. Οι κλαδιστικές σχέσεις μεταξύ των ομάδων είναι οι ίδιες ωστόσο το πρώτο έχει 7 ανεξάρτητους κλάδους ενώ το δεύτερο 4, αφού κάποιοι από αυτούς είναι ίσοι με κάποιους άλλους ή συνδυασμούς αυτών. Από *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach (1998)*.

2.1.6. Το μιτοχονδριακό DNA στη φυλογένεση

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) αντιστοιχεί σε ένα μικρό μόνο μέρος του συνολικού γονιδιώματος των οργανισμών, ωστόσο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς (για περισσότερα από 30 χρόνια) στις μελέτες των φυλογενετικών σχέσεων τόσο μεταξύ πληθυσμών όσο και μεταξύ ειδών και έχει αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο για τη μοριακή οικολογία, τη φυλογεωγραφία κ.ά. (Ballard & Whitlock, 2004). Οι λόγοι που το mtDNA είναι τόσο δημοφιλές στη μοριακή φυλογένεση είναι πολλοί. Ο πολλαπλασιασμός του είναι σχετικά εύκολος, αφού υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφά του μέσα στα κύτταρα. Τα γονίδια του mtDNA είναι πολύ συντηρημένα μεταξύ των ζωικών ομάδων, επιπλέον δεν υπάρχουν εσώνια, υπάρχουν πολύ λίγοι διπλασιασμοί και πολύ μικρές περιοχές μεταξύ των γονιδίων του mtDNA (Gissi, Iannelli & Pesole, 2008). Ακόμη, το mtDNA στους φυσικούς πληθυσμούς έχει μεγάλη ποικιλότητα/μεταβλητότητα, εξαιτίας του υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων, πράγμα το οποίο μπορεί να αποκαλύψει πληροφορίες για την εξελικτική ιστορία των πληθυσμών που μπορεί να αφορά μικρές χρονικές περιόδους. Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, το mtDNA, αποτελεί την πιο φθηνή και εύκολη λύση, για τη διερεύνηση, σε γενετικό επίπεδο, νέων ειδών. Εκτός από αυτούς, υπάρχουν και πιο σημαντικοί λόγοι που καθιστούν το mtDNA τόσο σημαντικό δείκτη της μοριακής ποικιλότητας. Πρώτον, ο τρόπος κληρονόμησής του (μητρική προέλευση), που σημαίνει ότι όλο το mtDNA κληρονομείται σαν ένα ενιαίο μόριο, χωρίς ανασυνδυασμούς (Hagelberg, 1994) (αν και υπάρχουν ενδείξεις που θέτουν αυτόν τον ισχυρισμό υπό αμφισβήτηση (Zouros *και συν.*, 1994)), πράγμα που απλοποιεί σε μεγάλο βαθμό τις επακόλουθες αναλύσεις. Δεύτερον, το mtDNA υποτίθεται ότι εξελίσσεται με ένα ουδέτερο τρόπο, αφού τα γονίδια του κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος σε πολύ σημαντικές διαδικασίες (π.χ. οξειδωτική φωσφορυλίωση) του κυττάρου, έτσι δεν θεωρείται πιθανό να υπόκεινται σε κάποιο είδος επιλογής. Αυτός ο ουδέτερος τρόπος εξέλιξής του μας επιτρέπει να υποθέσουμε και την ύπαρξη του μοριακού ρολογιού (βλ. παράγραφος 2.1.5). Βέβαια, αυτή η τελευταία ιδιότητά του (ουδετερότητα), τελευταία τίθεται υπό αμφισβήτηση (Bazin, Glemin & Galtier, 2006; Grossman *και συν.*, 2004) και φυσικά όπως ήταν αναμενόμενο έντονη συζήτηση και έρευνα έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια για αυτό το θέμα [βλ. εργασίες επισκόπησης (Galtier *και συν.*, 2009; Parmakelis, Kotsakiozi & Rand, 2013)]. Παρ' όλα αυτά, είναι γεγονός ότι οι μελέτες μοριακής φυλογένεσης, στην πλειονότητα τους (αν όχι όλες), χρησιμοποιούν το mtDNA σε κάποιο βαθμό.

2.1.7. Η φυλογένεση στη Βιογεωγραφία

Η ιδέα ότι οι φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών μπορούν να αποκαλύψουν πληροφορίες για τη γεωγραφική τους κατανομή στο παρελθόν, είναι τόσο παλιά όσο και η ίδια η εξελικτική βιολογία. Ωστόσο, το πεδίο της φυλογενετικής βιογεωγραφίας γεννήθηκε το 1966, όταν η κλαδιστική μέθοδος του Hennig (1966) για την ανακατασκευή γενεαλογικών σχέσεων εφαρμόστηκε στη βιογεωγραφία (Brundin, 1966). Η ιδέα στην οποία βασίζεται η βιογεωγραφία είναι ότι τα τάξα που μοιράζονται παρόμοια φυλογενετικά πρότυπα και πρότυπα κατανομής, πρέπει να μοιράζονται και κοινή βιογεωγραφική ιστορία. Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί πάνω σε αυτή τη βασική αρχή. Οι πρώτες από αυτές, βασίζονται στην αρχή της φειδωλότητας (parsimony principle) και στόχευαν στην ανεύρεση προτύπων μεταξύ γεωγραφικών περιοχών που εμφανίζουν ενδημισμό (Morrone & Crisci, 1995). Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, οι βιογεωγράφοι άρχισαν να στρέφονται σε πιθανοκρατικές τεχνικές. Αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως η ραγδαία αύξηση των διαθέσιμων μοριακών δεδομένων, η γρήγορη ανάπτυξη των τεχνικών της Μέγιστης Πιθανοφάνειας και της Μπεϋσιανής Συμπερασματολογίας και η ισχύς των παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών σε τέτοιου είδους διαδικασίες αλλά και η ικανότητα να διακρίνουν μεταξύ εναλλακτικών υποθέσεων (Ronquist & Sanmartin, 2011).

Τα βιογεωγραφικά μοντέλα που εφαρμόζονται στην αναλυτική βιογεωγραφία μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις ομάδες (Εικόνα 2.4). Το πρώτο από αυτά αντιπροσωπεύει τις κατανομές χρησιμοποιώντας συνεχείς μεταβλητές ενώ τα άλλα τρία υποδιαιρούν την κατανομή σε διακριτές μονάδες-περιοχές. Στην πρώτη περίπτωση (diffusion models, Εικόνα 2.4α) οι γενεαλογικές γραμμές αντιστοιχούν σε σημεία πάνω στη γεωγραφική περιοχή που μελετάται (η οποία μπορεί να είναι αμετάβλητη ή να αλλάζει με τον χρόνο) και οι βιογεωγραφικές διαδικασίες αντιστοιχούν σε μετακινήσεις σε αυτή την περιοχή. Τα διακριτά μοντέλα (discrete models), αντίθετα, βασίζονται σε γεωγραφικές περιοχές που προσδιορίζονται εκ των προτέρων και οι βιογεωγραφικές διαδικασίες αντιστοιχούν σε γεγονότα που αλλάζουν την κατανομή των οργανισμών (Ronquist & Sanmartin, 2011).

Τα διακριτά μοντέλα μπορούν να υποδιαιρεθούν επιπλέον σε τρεις κατηγορίες: τα μοντέλα νησιού (island models), τα ιεραρχικά μοντέλα βικαριανισμού (hierarchical vicariance models-HVMs) και τα μοντέλα δικτύων (reticulate models).

Τα μοντέλα του νησιού εστιάζουν στη διασπορά των οργανισμών μεταξύ των περιοχών και είναι επίσης εφαρμόσιμα σε περιπτώσεις μετακίνησης τεκτονικών

πλακών, απομόνωσης βιοκοινοτήτων θαλάσσιων οργανισμών, απομόνωσης γεωγραφικών περιοχών λόγω ύπαρξης οροσειρών κ.ά. (Ronquist & Sanmartin, 2011).

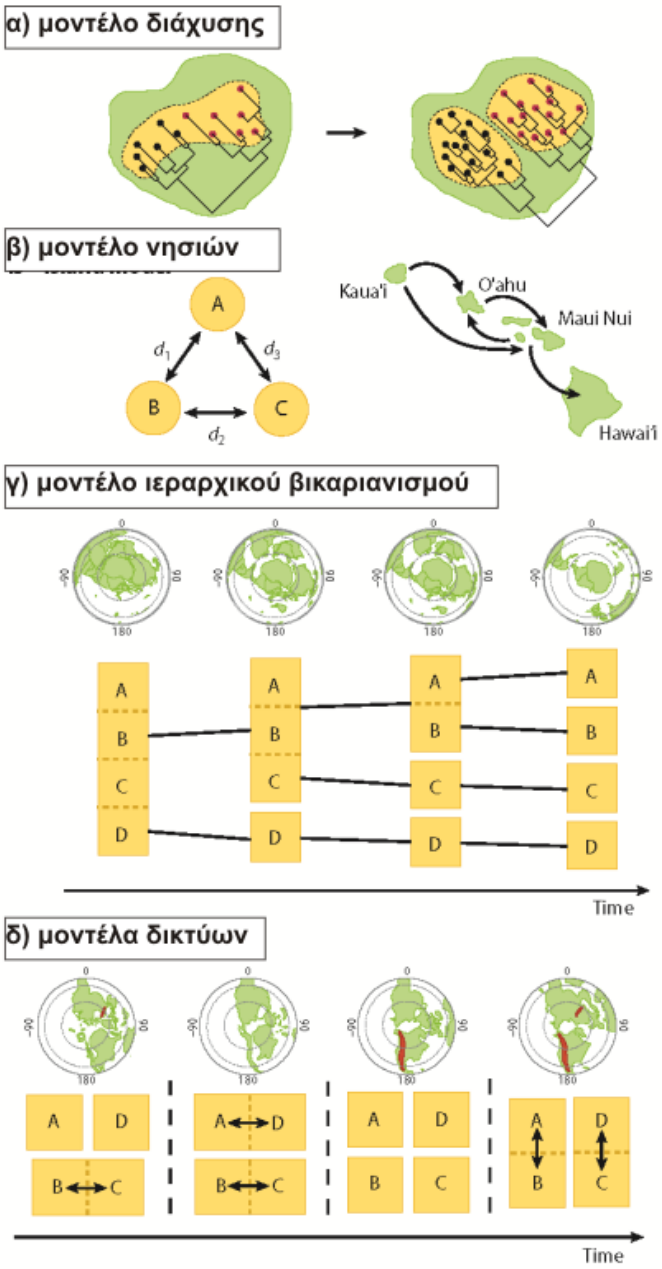
Τα HVMs αφορούν τον κατακερματισμό μιας ενιαίας αρχέγονης περιοχής λόγω εμφάνισης περιορισμών/ορίων στη διασπορά. Κάθε τέτοιος περιορισμός, διαιρεί την αρχέγονη περιοχή σε δύο, έτσι οδηγεί σε αλλοπάτρια ειδογένεση ή βικαριανισμό (Ronquist & Sanmartin, 2011). Η αλλοπάτρια ειδογένεση είναι ένα από τα πρότυπα ειδογένεσης που έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός φραγμού που διαχωρίζει τον αρχικό ενιαίο πληθυσμό. Ο βικαριανισμός περιλαμβάνει διαχωρισμό του πληθυσμού όταν η συνεχής κατανομή της προγονικής μορφής κατακερματίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως φαινόμενα ορογένεσης, διαρρήξεις ηπειρωτικών μαζών κλπ.

Στα μοντέλα δικτύων οι περιοχές υπόκεινται σε κύκλους διαχωρισμού και ένωσης μέσα στο χρόνο. Έτσι, κατά τους διαχωρισμούς δημιουργούνται βικαριανιστικές συνθήκες (όπως και στην περίπτωση των HVMs) ενώ κατά την ένωση παρατηρούνται φαινόμενα επέκτασης της κατανομής πολλών γενεαλογικών γραμμών κατά μήκους του γεωγραφικού ορίου που δεν υφίσταται πλέον (Ronquist & Sanmartin, 2011).

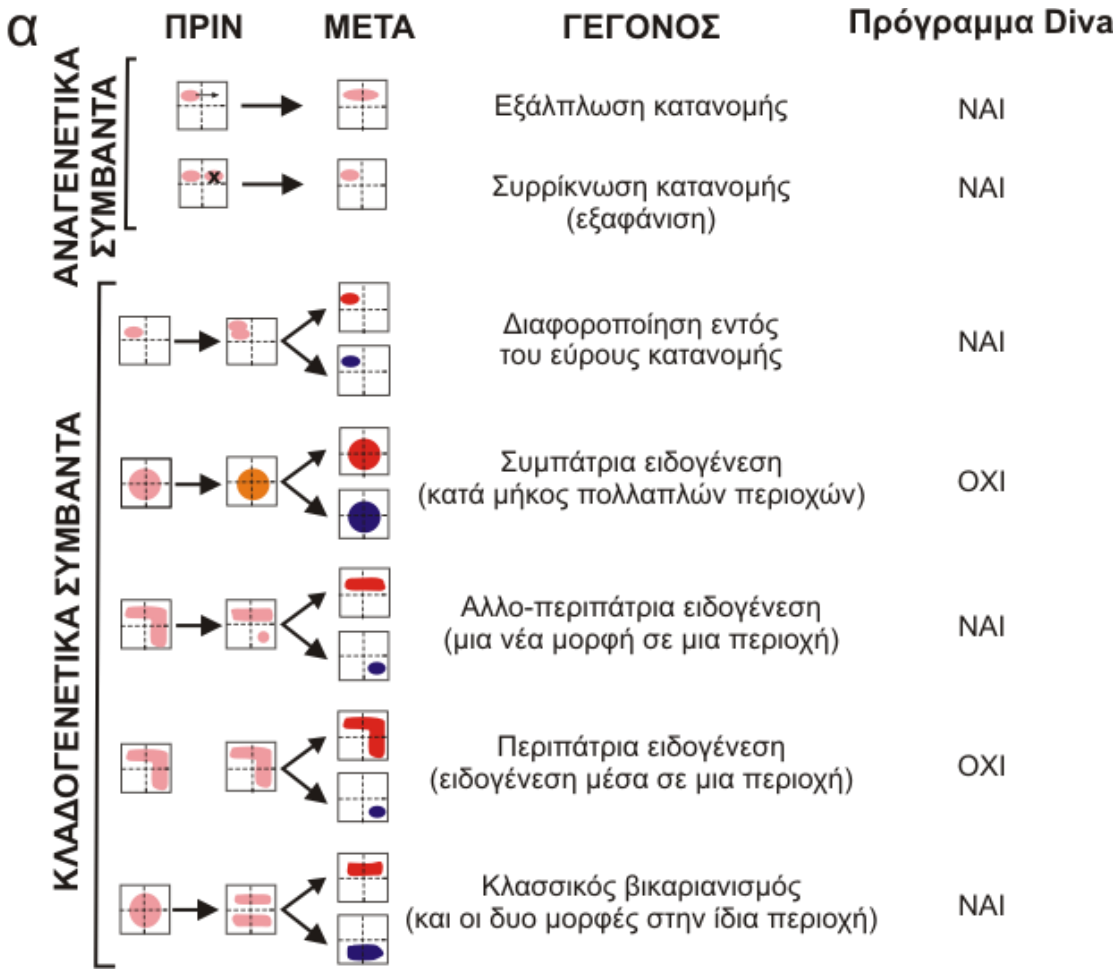
Στη συνέχεια θα περιγραφεί μόνο η ανάλυση διασποράς-βικαριανισμού (Dispersal-Vicariance Analysis-DIVA) καθώς είναι εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στη διατριβή. Η ανάλυση αυτή, ως προς την προηγούμενη κατηγοριοποίηση, ανήκει στα μοντέλα δικτύων και εφαρμόζει τη μέθοδο της φειδωλότητας (Εικόνα 2.5). Οι κατανομές των οργανισμών ορίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, έτσι μια συγκεκριμένη γενεαλογική γραμμή μπορεί να καταλαμβάνει μια ή περισσότερες περιοχές. Ειδογένεση μπορεί να συμβεί είτε με βικαριανιστικές διαδικασίες είτε με διαφοροποίηση εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής (όπως στην περίπτωση του μοντέλου του νησιού). Τέτοια κλαδογενετικά γεγονότα θεωρούνται μηδενικού κόστους (zero cost). Αντίθετα, μια γενεαλογική γραμμή μπορεί να επεκτείνει την κατανομή της καταλαμβάνοντας επιπλέον γεωγραφικές περιοχές ή να εξαφανιστούν κάποιοι οργανισμοί και έτσι η κατανομή να συρρικνωθεί (κόστος μιας μονάδας ανά περιοχή κατάληψης ή εξαφάνισης αντίστοιχα). Αυτά θεωρούνται αναγεννητικά γεγονότα (anagenetic events).

Η μέθοδος αυτή είναι πολύ δημοφιλής για την ανακατασκευή της βιογεωγραφικής ιστορίας των οργανισμών ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου αυτό δεν μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας στοιχεία από τη γεωλογική ιστορία της περιοχής μελέτης. Τα μειονεκτήματα της ανάλυσης είναι ότι δεν λαμβάνει υπόψη τις

εξαφανίσεις και επιπλέον ευνοεί τα βικαριανιστικά γεγονότα σε σχέση με τη διασπορά. Για να αποφύγει κανείς το τελευταίο μπορεί να περιορίσει τον αριθμό των περιοχών εξάπλωσης των οργανισμών π.χ. σε όχι περισσότερες από αυτές που περιλαμβάνει η σημερινή εξάπλωση της γενεαλογικής γραμμής που εξετάζεται (Ronquist & Sanmartin, 2011).



Εικόνα 2.4. Μοντέλα που χρησιμοποιούνται στη φυλογενετική βιογεωγραφία. (α) Μοντέλα εξάπλωσης (diffusion models). Τα β-δ είναι μοντέλα που χρησιμοποιούν διακριτές περιοχές και συγκεκριμένα υπάρχει το μοντέλο του νησιού (island models) (β), τα ιεραρχικά μοντέλα βικαριανισμού (hierarchical vicariance models- HVMs) (γ) και τα μοντέλα δικτύων (reticulate models) (δ). Από Ronquist & Sanmartin (2011).



Εικόνα 2.5. Σχηματική απεικόνιση πιθανών βιογεωγραφικών γεγονότων που μπορούν να οδηγήσουν σε κλαδογενετικά ή σε αναγενετικά συμβάντα. Επισημαίνονται αυτά που δύναται να λάβει υπόψιν μια ανάλυση διασποράς-βικαριανισμού με το πρόγραμμα DIVA.

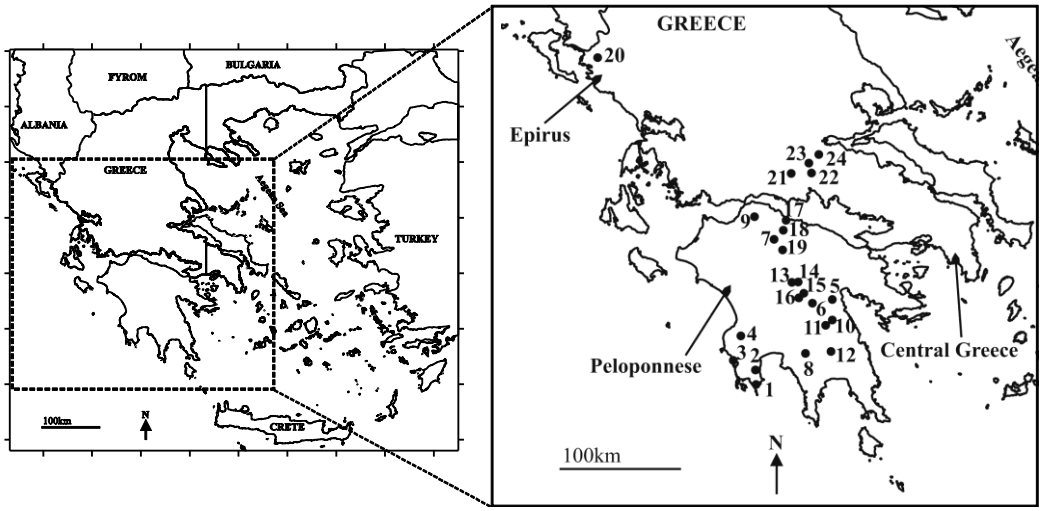
2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Πληθυσμοί μελέτης

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν 83 άτομα του γένους *Codringtonia* τα οποία αντιπροσωπεύουν όλα τα κατ' όνομα είδη του γένους (Subai, 2005). Ο προσδιορισμός των ειδών έγινε με βάση ανατομικά χαρακτηριστικά του γεννητικού συστήματος σε συνδυασμό με χαρακτηριστικά του κελύφους όπως αυτά περιγράφονται από τον Subai (2005). Στις φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξω-ομάδες, δύο επιπλέον άτομα τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά γένη. Οι εξω-ομάδες ορίζονται ως λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) οι οποίες πρέπει να σχετίζονται με την υπό εξέταση ομάδα αλλά να μην ανήκουν σε αυτή. Η χρήση εξω-ομάδας αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για να οριστεί η ρίζα του δέντρου. Συγκεκριμένα, περιελήφθη ένα άτομο του είδους *Levantina spiriplana* Kobelt, 1871 από το νησί Χάλκη και ένα άτομο του είδους *Assyriella naegelei* (Kobelt, 1901) από την Τουρκία. Τα γένη αυτά ανήκουν στην οικογένεια *Helicidae* (όπως και το *Codringtonia*) και επιλέχθηκαν λόγω του ότι θεωρούνται τα πιο συγγενικά γένη προς το *Codringtonia* (Hadjicharalambous, 1996; Subai, 2005). Το κάθε είδος *Codringtonia* αντιπροσωπευόταν με 1-5 πληθυσμούς και ο κάθε πληθυσμός με 1-13 άτομα. Αναλυτικά τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογένεση καθώς και πληροφορίες για τους σταθμούς δειγματοληψίας (Εικόνα 2.6) αναφέρονται στον Πίνακα 2.2.

2.2.2. Μοριακοί σημαντές

Οι μοριακοί σημαντές που χρησιμοποιήθηκαν είναι τρία μιτοχονδριακά γονίδια, το *16S rDNA*, η υπομονάδα I (*COI*) και η υπομονάδα II (*COII*) της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι από τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα (ιδιαίτερα το *COI* και το *16S rDNA*) στις μελέτες διερεύνησης φυλογενετικών σχέσεων (De Weerd, Piel & Gittenberger, 2004; De Weerd, Schneider & Gittenberger, 2005; Elejalde *και συν.*, 2005; Fiorentino *και συν.*, 2008; Goodacre, Thomaz & Davies, 2006; Holland & Cowie, 2007; Holland & Hadfield, 2004; Hyman, Ho & Jermiin, 2007; Pfenninger, Nowak & Magnin, 2007; Rundell, Holland & Cowie, 2004; Van Riel *και συν.*, 2005; Weaver, Anderson & Guralnick, 2006).



Εικόνα 2.6. Σταθμοί δειγματοληψίας των πληθυσμών *Codringtonia* που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογένεση.

Το γονίδιο *16S rDNA* είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα σε φυλογενετικές μελέτες ανεξάρτητα από ζωική ομάδα ή ταξινομική βαθμίδα, κυρίως γιατί φέρει κάποιες περιοχές που εξελίσσονται ταχύτατα αλλά και κάποιες άλλες που είναι αρκετά συντηρημένες επομένως εξυπηρετεί τη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ πρόσφατα διαχωρισμένων κλάδων αλλά μπορεί να επιλύσει και βαθιές φυλογενέσεις (Desalle, 1992; Desalle *και συν.*, 1987). Το *COI* επίσης αποτελεί έναν κοινό μιτοχονδριακό δείκτη που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες μοριακής φυλογένεσης/φυλογεωγραφίας. Πρόσφατα δείχθηκε ότι το *COI* μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο και στην ταξινόμηση/προσδιορισμό ειδών που δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα, μια τεχνική γνωστή ως DNA barcoding (Ratnasingham & Hebert, 2007) αν και λίγο αργότερα αμφισβητήθηκε το κατά πόσο μπορεί το mtDNA να συμβάλλει σε αυτόν τον τομέα (Galtier *και συν.*, 2009). Το *COII* αν και έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά σε φυλογενέσεις διάφορων οργανισμών (Piaggio & Spicer, 2001), έχει χρησιμοποιηθεί λιγότερο στην ομάδα των χερσαίων γαστερόποδων (Hugall *και συν.*, 2002).

Πίνακας 2.2. Είδη και πληθυσμοί που περιλαμβάνονται στη μελέτη, γεωγραφικά στοιχεία των περιοχών δειγματοληψίας, μέγεθος δείγματος (N) των πληθυσμών και αριθμοί καταχώρησης των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων GenBank. Οι κωδικοί χάρτη αναφέρονται στην Εικόνα 3.5.

Κωδικό στο χάρτη	Περιοχή δειγματοληψίας (N)	Περιφέρεια	Γεωγρ. πλάτος	Γεωγρ. μήκος	Συλλογή	Είδος	Κωδικός δείγματος	Αριθμός εισαγωγής *COI*/ *COII*/16S
1	Μονή Χρυσοκελαρίας (1)	A	36.79154	21.88558	30/11/08	*C. codringtonii*	CcHr1	JQ239920/ JQ240005/ JQ240089
2	Μαθιάς (1)	A	36.92928	21.88341	30/11/08	*C. codringtonii*	CcMath1	JQ239921/ JQ240006/ JQ240090
3	Ναυαρίνο (2)	A	36.95236	21.66138	30/11/08	*C. codringtonii*	CcNav1[a], CcNav2	JQ239922-23/JQ240007/ JQ240091-92
4	1,2 km πριν τη Ροδιά (4)	A	37.21260	21.73833	29/11/08	*C. codringtonii*	CcRod1, CcRod2, CcRod3, CcRod4	JQ239924-27/JQ240008-11/JQ240093-96
5	Αχλαδόκαμπος προς Άργος 5km (1)	A	37.517750	22.663422	20/1/08	*C. elisabethae*	CeAA7_1	JQ239928/JQ240012/ JQ240097
6	Στενό προς Τρίπολη 500m (5)	A	37.500121	22.462234	20/1/08	*C. elisabethae*	CeST6_1, CeST6_2, CeST6_3, CeST6_4, CeST6_5	JQ239929-33/ JQ240013-17/ JQ240098-102
7	Καλάβρυτα προς Λαγκοβούνι 6 km (1)	A	38.01726	22.07513	5/4/08	*C. eucineta*	Ceu_LAG_2	JQ239934/JQ240018/ JQ240103
8	Μυστράς (2)	A	37.069405	22.382069	7/5/08	*C. eucineta*	CeuMist1, CeuMist2	JQ239939-40/ JQ240019-20/ JQ240104-05
9	Παναχαϊκό, 1800m υψόμετρο (4)	A	38.213333	21.874722	8/5/08	*C. eucineta*	Ceu_PAN_1, Ceu_PAN_2, Ceu_PAN_3, Ceu_PAN_4	JQ239935-38/ JQ240021-24/ JQ240106-09
10	Άγιος Ιωάννης προς Μελιγού 1,5km πριν (13)	A	37.352893	22.654839	6/12/08	*C. gittenbergeri*	Cg_MelR1_1, Cg_MelR2_1, Cg_MelR3_1, Cg_MelR4_1, Cg_MelR4_2, Cg_MelR5_1, Cg_MelR5_2, Cg_MelR6_1[b], Cg_MelR6_2, Cg_MelR7_1, Cg_MelR7_2, Cg_MelR7_3, Cg_MelR7_4	JQ239941-53/ JQ240025-37/ JQ240110-21
11	Άγιος Πέτρος προς Μονή Μαλεβής (1)	A	37.29333	22.59135	6/12/08	*C. codringtonii*	Cc_Mal_1	JQ239954/ JQ240038/ JQ240122
12	Καλιθέα (2)	A	37.086059	22.641106	7/12/08	*C. codringtonii*	Cc_KalR2_2	JQ239955/ JQ240039/

								JQ240123
13	Μαίναλο (13)	Α	37.6565	22.2623	12/5/08	*C. helenae* και *C. intusplicata*	Ci_MEN_1, Ch_MEN_2, Ch_MEN_3, Ch_MEN_4, Ch_MEN_5, Ch_MEN_6, Ch_MEN_8, Ch_MEN_9, Ci_MEN_10, Ch_MEN_11, Ci_MEN_12, Ch_MEN_13, Ch_MEN_14	JQ239956-68/ JQ240040-52/ JQ240124-36
14	Τρίπολη προς Λεβίδι 2 km (5)	Α	37.664654	22.302933	12/5/08	*C. helenae*	Ch_LEV_1, Ch_LEV_2, Ch_LEV_3, Ch_LEV_4, Ch_LEV_5	JQ239969-73/ JQ240053-57/
15	Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km (3)	Α	37.520001	22.356834	20/1/08	*C. helenae*	ChTM4_1, ChTM4_2, ChTM4_3	JQ239974-76/ JQ240058-60/ JQ240142-44
16	Τρίπολη προς Μαίναλο 4km (1)	Α	37.535703	22.345848	20/1/08	*C. helenae*	ChTM5_1	JQ239977/ JQ240061/ JQ240145
17	Διακοπτό (2)	Α	38.18046	22.19436	5/4/08	*C. intusplicata*	Ci_DIA_1, Ci_DIA_2	JQ239978-79/ JQ240062-63/ JQ240146-47
18	Διακοπτό προς Καλάβρυτα (3)	Α	38.09946	22.17053	5/4/08	*C. intusplicata*	Ci_MSP_1, Ci_MSP_2, Ci_MSP_3	JQ239980-82/ JQ240064-66/ JQ240148-50
19	Πλανητέρο, Χελμός (3)	Α	37.933764	22.164917	Μη διαθέσιμο	*C. intusplicata*	CiPLAN1, CiPLAN2, CiPLAN3	JQ239983-85/ JQ240067-69/ JQ240151-53
20	Βρόσινας προς Ηγουμενίτσα 15km (3)	Β	39.58706	20.47621	7/6/08	*C. neocrassa*	Cn_IG_1, Cn_IG_2, Cn_IG_3	JQ239986-88/ JQ240070- 72/ JQ240154-56
21	Γκιώνα-Παλαιοβούνι (Μακρυλάκομα) (3)	Γ	38.629173	22.219849	4/7/08	*C. parnassia*	CpGio_1, CpGio_2, CpGio_3	JQ239989-91/ JQ240073-75/ JQ240157-59
22	Γραβιά προς Άμφισσα 27,5 km (9)	Γ	38.6492	22.4154	26/4/09	*C. parnassia*	CpGravR1, CpGravR2, CpGravR3, CpGravR4, CpGravR5_1, CpGravR5_2, CpGravR6_1, CpGravR6_2, CpGravR7	JQ239992-00/ JQ240076-84/ JQ240160-68
23	Σκαμνός, 1,2 km ανατολικά από Μπράλος προς Θερμοπύλες (1)	Γ	38.752941	22.453308	25/4/09	*C. parnassia*	CpSka_1	JQ240001/JQ240085/ JQ240169
24	Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km (1)	Γ	38.78489	22.58248	25/4/09	*C. parnassia*	CpThe_1	JQ240002/JQ240086/ JQ240170
-	Προφήτης Ηλίας 450m υψόμετρο (1)	Δ	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο	22/10/03	*Levantina spiriplana*	*Levantina spiriplana*	JQ240003/JQ240087/ JQ240171
-	Φρούριο Κοζάνη, 400m υψόμετρο (1)	Ε	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο	27/3/02	*Assyriella naegelei*	*Assyriella naegelei*	JQ240004/JQ240088/ JQ240172

[a] η αλληλουχία του *16S rRNA* δεν αποκτήθηκε, [b] η αλληλουχία του *COII* δεν αποκτήθηκε, Α: Πελοπόννησος, Β: Ήπειρος, Γ: Στερεά Ελλάδα, Δ: νήσος Χάλκη, Ε: Τουρκία

2.2.3. Εξαγωγή γενετικού υλικού, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR.

Η απομόνωση του συνολικού γενετικού υλικού έγινε από τον μυϊκό ιστό του πόδα (ένα τμήμα περίπου 0,5 mm^3) από άτομα τα οποία ήταν διατηρημένα σε 100% αιθανόλη ή είχαν ψυχθεί σε υγρό άζωτο και διατηρηθεί στην κατάψυξη (-20 ºC). Το πιο αποδοτικό πρωτόκολλο για την απομόνωση γενετικού υλικού από χερσαία μαλάκια που χρησιμοποιείται ευρύτατα σε μοριακές μελέτες, καθώς αποφεύγονται τα προβλήματα που δημιουργούνται στην PCR από τους πολυσακχαρίτες της βλέννας, είναι αυτό των Winnepenninckx et al. (1993) με CTAB 2x (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide). Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή του πρωτοκόλλου αυτού όπως περιγράφεται από τους Parmakelis et al. (2003). Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του γονιδίου *COI* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές L1490-Alb και H2198-Alb (Gittenberger, Piel & Groenenberg, 2004), ενώ για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του γονιδίου *COII* αρχικά χρησιμοποιήθηκαν καθολικοί εκκινητές (Hugall *και συν.*, 2002) και στη συνέχεια με βάση τις αλληλουχίες που λήφθηκαν σχεδιάστηκαν ειδικοί για το υπό μελέτη γένος εκκινητές. Τέλος, για τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου *16S rDNA* αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι καθολικοί εκκινητές LR N13398 και 16SBR LR J12887 (Simon *και συν.*, 1994), όμως εξ' αιτίας της χαμηλής ποιότητας των πρώτων αλληλουχιών που λήφθηκαν, κρίθηκε απαραίτητο να σχεδιαστούν και για αυτό το γονίδιο νέοι εκκινητές, ειδικοί για το γένος *Codringtonia*. Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μήκη των γονιδίων στόχων αναφέρονται στον Πίνακα 2.3.

Ο όγκος της κάθε αντίδρασης PCR ήταν 50 μL από τον οποίο 1-2 μL (ανάλογα με το γονίδιο και τον υπό μελέτη πληθυσμό) ήταν ο όγκος του DNA που χρησιμοποιήθηκε. Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων για το κάθε γονίδιο φαίνονται στον Πίνακα 2.4. Για τα περισσότερα άτομα οι αλληλουχίες λήφθηκαν με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και των δυο κλώνων του προϊόντος της PCR (σε περιορισμένο αριθμό ατόμων λήφθηκε η αλληλουχία του ενός μόνο κλώνου). Η αλληλούχιση του προϊόντος της PCR γινόταν άμεσα από το διάλυμα της PCR, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και στην PCR.

Πίνακας 2.3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων των γονιδίων *COI*, *COII* και 16S *rDNA* καθώς και το μήκος του στοχευόμενου προϊόντος σε ζεύγη νουκλεοτιδικών βάσεων.

Γονίδιο	**Όνομα εκκινητών**	**Αλληλουχία εκκινητών**	**Μήκος προϊόντος**
COI	L1490-Alb	5-ACTCAACGAATCATAAAGATATTGG-3	708 ζ.β.
	H2198-Alb	5-TATACTTCAGGATGACCAAAAAATCA-3	
COII	Snail_*COII*_R	5-AAATAATGCTATTTCATGAYCAYGC-3	580 ζ.β.
	Snail_*COII*_F	5-GCTCCGCAAATCTCTGARCAYTG-3	
	Cpar_*COII*_52F	5-GTATTGGTTKCAGTAGTGGGC-3	
	Cpar_*COII*_427R	5-TAACATCAGCWGACGTTGTCAC-3	
16S rDNA	16SAR LR N12887	5-CCGGTTTGAACTCAGATCACGT-3	511 ζ.β.
	16SBR LR J13398	5-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3	
	Cod_16S_87F	5-TGACTGTGCAAAGGTAGCAT-3	
	Cod_16S_483R	5-TTGAACTCAGATCACGTAGG-3	

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών γινόταν σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης μοντέλου PE-ABI 3740 ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συσκευή αυτή, προκειμένου να προσδιορίσει την αλληλουχία του προϊόντος της PCR, χρησιμοποιεί ειδικώς χρωματισμένα νουκλεοτίδια. Όλες οι αλληλουχίες που παράχθηκαν κατ' αυτόν τον τρόπο είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων GenBank με αριθμούς καταχώρησης JQ239920-JQ240172 (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.4. Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και συνθήκες των αντιδράσεων PCR για τα γονίδια *COI*, *COII* και *16S rDNA*. Η συγκέντρωση του $MgCl_2$ ήταν μεταξύ 2.5 και 3.5 mM ανάλογα με το γονίδιο. Ανάλογα με το υπό μελέτη γονίδιο και τον υπό μελέτη πληθυσμό μεταβαλλόταν και η θερμοκρασία υβριδοποίησης.

Αντιδραστήριο	**Συγκέντρωση**
Taq buffer	1X
$MgCl_2$	2,5-3,5 mM
dNTP's	0,2 mM
Εκκινητής A	0,4 μM
Εκκινητής B	0,4 μM
Taq πολυμεράση	5 μονάδες/μl
BSA	1 μg/μl

Στάδιο	**θερμοκρασία (°C)**	**Χρόνος**
Προ-επώαση	95	3'
Αποδιάταξη	94	15''
Υβριδοποίηση	*COI*: 40/45 *COII*: 42/45 *16S rRNA*: 42/45/48/50/52	1'
Επέκταση	72	1.5'
Άλλο στάδιο	72	10'
Κύκλοι	40	

2.2.4. Μεθοδολογία ανάλυσης

2.2.4.1. Διόρθωση και στοίχιση αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες που λήφθηκαν διορθώθηκαν και στοιχίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού CodonCode Aligner v. 2.06 (Genocodes Corporation). Στη συνέχεια με τη βοήθεια του διαδικτυακού εργαλείου BLAST στη βάση γενετικών δεδομένων NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ελέγχθηκε η αυθεντικότητα των αποκτηθέντων αλληλουχιών καθώς επίσης και η ομολογία τους με τα γονίδια στόχους. Ειδικά για τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (*COI* και *COII*) αφού μεταφράστηκαν σε αμινοξέα πραγματοποιήθηκε και ένας δεύτερος έλεγχος, ελέγχθηκε αφ' ενός η απουσία κωδικονίων λήξης μέσα στην αλληλουχία και αφ' ετέρου η ομολογία της πρωτεΐνης με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων. Προκειμένου να εκτιμηθεί οπτικά κατά πόσο τα δεδομένα εμφανίζουν κορεσμό υποκαταστάσεων έγινε γράφημα των μεταπτώσεων (Ts) και των μεταστροφών (Tv) σε συνάρτηση με τη γενετική απόσταση με τη χρήση του λογισμικού DAMBE (Xia & Xie, 2001). Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος του κορεσμού χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία του Xia (Xia, 2009) όπως εφαρμόζεται στο DAMBE.

Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε για το κάθε γονίδιο χωριστά. Αν ο αριθμός των μεταπτώσεων ή των μεταστροφών δεν αυξάνει γραμμικά με τη γενετική απόσταση, τότε υπάρχει ισχυρή ένδειξη για ομοπλασία στα δεδομένα. Ομοπλασία είναι η

κατάσταση όπου παρατηρείται ομοιότητα (π.χ. η ίδια νουκλεοτιδική βάση σε μία συγκεκριμένη θέση) στα τάξα που μελετώνται αλλά αυτό δεν οφείλεται στο ότι η κατάσταση αυτή (π.χ. αυτή η βάση), υπήρχε και στον κοινό τους πρόγονο και κληρονομήθηκε από τον κοινό πρόγονο στα τάξα αυτά, αλλά αποκτήθηκε από την κάθε γενεαλογική γραμμή ανεξάρτητα (Page & Holmes, 1998). Ο λόγος (R) των μεταπτώσεων προς τις μεταστροφές επίσης αποτελεί ένδειξη για τον βαθμό ομοπλασίας στα δεδομένα σε ότι αφορά τις μιτοχονδριακές αλληλουχίες. Είναι γνωστό, ότι στο mtDNA οι μεταπτώσεις συμβαίνουν με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τις μεταστροφές (Brown *και συν.*, 1982) έτσι στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης δύο αλληλουχιών, ο λόγος αυτός είναι υψηλός και μειώνεται με την αύξηση της γενετικής απόστασης.

2.2.4.2. Συνδυασμένη ή ανεξάρτητη ανάλυση;

Για να διαπιστωθεί αν τα δεδομένα από τα τρία μιτοχονδριακά γονίδια μπορούν να συνδυαστούν σε μια ενιαία ανάλυση πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη στατιστική δοκιμασία (partition-homogeneity test) σύμφωνα με όσα αναφέρονται από τους Farris et al. (1995) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PAUP* (Swofford, 2003) και η αξιοπιστία της δοκιμασίας εκτιμήθηκε στατιστικά με 1000 τυχαίες επαναλήψεις (repartitions).

2.2.4.3. Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

Η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για τα δεδομένα έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MODELTEST (Posada & Crandall, 1998) το οποίο χρησιμοποιεί τη δοκιμασία του λόγου των πιθανοτήτων (Likelihood Ratio Test-LRT) για να επιλέξει ανάμεσα σε 56 διαφορετικά μοντέλα. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα εκτός του ότι προτείνει το καταλληλότερο μοντέλο, υπολογίζει το ποσοστό των αμετάβλητων θέσεων (I: invariable) καθώς και την τιμή της παραμέτρου Γ (shape parameter). Η Γ κατανομή (gamma distribution), είναι αυτή που περιγράφει τον ρυθμό υποκατάστασης των νουκλεοτιδικών θέσεων μέσα στις αλληλουχίες. Το σχήμα της κατανομής αυτής καθορίζεται από την τιμή της παραμέτρου Γ.

2.2.4.4. Εκτίμηση αποστάσεων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Η εκτίμηση των αποστάσεων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με την εφαρμογή του διπαραμετρικού μοντέλου του Kimura (1980) (παρά το ότι δεν επιλέχθηκε αυτό ως καταλληλότερο από το Modeltest 3.7 βλ. αποτελέσματα) και ο λόγος ήταν για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης με αυτά άλλων δημοσιευμένων εργασιών. Τελικά υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις τόσο μεταξύ των ειδών (δια-ειδικά) όσο και εντός του κάθε είδους (ενδο-ειδικά), με τη χρήση του προγράμματος MEGA. Η αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο στο ενιαίο σύνολο δεδομένων (και στα τρία γονίδια συνολικά) όσο και για το κάθε γονίδιο χωριστά.

2.2.4.5. Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης και στατιστικός έλεγχος των φυλογενετικών δένδρων

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση Μέγιστης Φειδωλότητας (ΜΦ), Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ΜΠ) και Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ).

Η ανάλυση ΜΦ πραγματοποιήθηκε με το PAUP* (Swofford, 2003), έγιναν ευρετικές αναζητήσεις του πιο φειδωλού δέντρου δηλαδή του δέντρου εκείνου που προκύπτει με βάση τα δεδομένα με τον ελάχιστο αριθμό αλλαγών. Οι ψευδοεπαναλήψεις στην bootstrap δοκιμασία ήταν 1000 (Felsenstein, 1985).

Η ανάλυση της ΜΣ πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) κατά την οποία εφαρμόστηκε διαχωρισμός (partition) στο σύνολο δεδομένων με βάση τα τρία γονίδια, δηλαδή ορίστηκε εκ των προτέρων στο πρόγραμμα η θέση που αρχίζει και η θέση που τελειώνει το κάθε γονίδιο καθώς και το αν πρόκειται για γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη ή όχι. Για το κάθε γονίδιο εφαρμόστηκε το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που προτάθηκε από το Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) σύμφωνα με το κριτήριο του Akaike (Akaike Information Criterion, AIC) (Akaike, 1974). Το AIC είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που «αμείβει» το μοντέλο που ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα, ενώ παράλληλα επιβάλλει ποινές στις μη αναγκαίες παραμέτρους (Posada & Crandall 1998). Εάν θέσει κανείς ως L τη μέγιστη τιμή πιθανότητας για ένα συγκεκριμένο μοντέλο που χρησιμοποιεί n ανεξάρτητες παραμέτρους, τότε η τιμή του AIC=$-2\ln L+2n$. Τιμές μικρότερες του AIC υποδηλώνουν καλύτερα μοντέλα. Για το σκοπό αυτό, δηλαδή της σύγκρισης μοντέλων και της επιλογής του καταλληλότερου, οι Posada & Crandall (1998) δημιούργησαν το υπολογιστικό πρόγραμμα Modeltest που χρησιμοποιεί τις παραπάνω δοκιμασίες για να αποφανθεί ποιο μοντέλο νουκλεοτιδικής

υποκατάστασης (η επιλογή γίνεται μέσα από 56 μοντέλα) είναι καταλληλότερο για το χρησιμοποιούμενο σύνολο αλληλουχιών.

Οι τιμές των παραμέτρων των μοντέλων θεωρήθηκαν «άγνωστες» και υπολογίστηκαν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Τα τρία γονίδια θεωρήθηκαν «ασύνδετα» και έτσι ο υπολογισμός των παραμέτρων των μοντέλων έγινε για καθένα χωριστά. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 4 ανεξάρτητες αναλύσεις ταυτόχρονα, η κάθε μία από αυτές περιελάμβανε 8 αλυσίδες και ο αριθμός των γενεών (generations) ήταν 15 x 10^6 (συνολικά 4 x 15 x 10^6= 60 x 10^6 γενεές). Η μέση τυπική απόκλιση του διαχωρισμού των συχνοτήτων (the average standard deviation of split frequencies) των τεσσάρων αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε για να οριστεί το σημείο σταθεροποίησης των πιθανοτήτων (stationarity point of likelihoods) (εγχειρίδιο του προγράμματος MrBayes 3.1.2). Σύμφωνα με αυτό, η σταθερότητα επιτεύχθηκε πριν τις 3×10^6 γενεές. Κάθε 100 επαναλήψεις αποθηκευόταν ένα δέντρο, επομένως, η ΜΣ στηρίχθηκε τελικά σε $60\text{x}10^6$ γενεές (το άθροισμα των τεσσάρων αναλύσεων). Για καθεμία από αυτές χρησιμοποιήθηκαν 112.501 δέντρα ενώ 37.499 αγνοήθηκαν (περίοδος burn-in). Από το σύνολο των 450.004 δέντρων (112.501 x4 δηλαδή το άθροισμα των τεσσάρων αναλύσεων) κατασκευάστηκε ένα συναινετικό, το οποίο είναι το 50% πλειοψηφικής αποδοχής δέντρο. Η στήριξη των κλάδων αυτού αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τις εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities).

Η ανάλυση ΜΠ πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GARLI v.1.0 (Zwickl, 2006). Το πρόγραμμα αυτό υπολογίζει τη μέγιστη πιθανοφάνεια μιας συγκεκριμένης τοπολογίας χρησιμοποιώντας έναν γενετικό αλγόριθμο (Lewis, 1998) ώστε να αξιολογήσει αποδοτικά και εναλλακτικές τοπολογίες. Η πιο πιθανή τοπολογία του δέντρου προέκυψε κάνοντας 20 ανεξάρτητες αναλύσεις ξεκινώντας με τυχαία δέντρα. Με εξαίρεση τον αριθμό των αναλύσεων (ορίστηκε στις 20) και την εφαρμογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για το κάθε γονίδιο (χρησιμοποιήθηκε αυτό που προτάθηκε από το πρόγραμμα MODELTEST), όλες οι άλλες παράμετροι του προγράμματος αφέθηκαν στις προκαθορισμένες (default) τους τιμές. Οι ανεξάρτητες αυτές αναλύσεις τελικά συγκλίνουν όταν οι τιμές πιθανοφάνειας αυτών διαφέρουν λιγότερο από μια μονάδα. Το δέντρο με τη μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας θεωρείται το καλύτερο. Οι ψευδοεπαναλήψεις στην bootstrap δοκιμασία για αυτό το δέντρο ήταν 200. Στη συνέχεια, όπως προτείνεται στον ιστότοπο του προγράμματος (https://www.nescent.org/wg_garli/Advanced_topics#Using_SumTrees) χρησιμοποιήθηκε το SumTrees για την κατασκευή του 50% πλειοψηφικής αποδοχής

δέντρου. Η στήριξη των κλάδων του συναινετικού αυτού δέντρου απεικονίζεται για το καλύτερο δέντρο στο οποίο κατέληξε το πρόγραμμα.

2.2.4.6. Μοριακό ρολόι και εκτίμηση του χρόνου απόκλισης των κλάδων

Για να ελεγχθεί αν ισχύει το μοριακό ρολόι πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη στατιστική δοκιμασία (Likelihood Ratio Test-LRT), αν το αποτέλεσμα της δοκιμασία αυτής είναι θετικό (δηλαδή ισχύει το μοριακό ρολόι) τότε μπορούμε να μεταφράσουμε τη γενετική απόσταση (που υπολογίζουμε για τις αλληλουχίες) σε χρόνο απόκλισης των κλάδων δεδομένου ότι διαθέτουμε κάποιο ρυθμό μοριακής εξέλιξης του γονιδίου ή κάποιο παλαιογεωγραφικό γεγονός ή κάποιο χρονολογημένο απολίθωμα ή συνδυασμό αυτών. Ένας καλός τρόπος είναι να λάβουμε υπ' όψιν κάποιο παλαιογεωγραφικό γεγονός το οποίο συνέβη σε γνωστό (με σχετική ακρίβεια) χρόνο στην περιοχή μελέτης (π.χ. διαχωρισμός μιας ενιαίας έκτασης σε δύο περιοχές οι οποίες δεν επανενώθηκαν αργότερα). Στην εργασία αυτή όμως, η περιοχή μελέτης είναι πολύ δυναμική από γεωλογικής άποψης καθώς η Πελοπόννησος χωρίστηκε και επανενώθηκε με τη Στερεά Ελλάδα επαναλαμβανόμενα (βλ. παλαιογεωγραφικούς χάρτες από Parmakelis *et al.* (2006) και Poulakakis *et al.* (2005)). Αν τελικά, το αποτέλεσμα της δοκιμασίας LRT είναι αρνητικό (δηλαδή οι αλληλουχίες δεν ακολουθούν ένα αυστηρό μοριακό ρολόι) τότε η παρατηρούμενη γενετική απόσταση δεν μπορεί να αντιστοιχιστεί σε χρόνο απόκλισης των κλάδων. Σε αυτή την περίπτωση γίνεται μια διόρθωση του μοριακού ρολογιού. Για τον υπολογισμό του χρόνου απόκλισης των κλάδων τελικά, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BEAST version 1.5.3 (Drummond & Rambaut, 2007). Το πρόγραμμα αυτό εφαρμόζει τη μέθοδο Markov Chain Monte Carlo (MCMC) και ένα μοντέλο μη αυστηρού μοριακού ρολογιού για να σχετίσει την εξελικτική διαδικασία με τον χρόνο που μεσολάβησε.

Τα δεδομένα στην ανάλυση διαχωρίστηκαν με βάση το γονίδιο (*COI*, *COII* και *16S rDNA*) και για το καθένα εφαρμόστηκε ξεχωριστό μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Για μεγαλύτερη ακρίβεια εφαρμόστηκε ένα μη αυστηρό μοντέλο μοριακού ρολογιού που ακολουθεί την κανονική λογαριθμική κατανομή (lognormal distribution) (Drummond *και συν.*, 2006) επίσης σύμφωνα με όσα αναφέρονται από τους Drummond και Rambaut (2009) εφαρμόστηκε το μοντέλο ειδογένεσης κατά Yule. Το μοντέλο αυτό λαμβάνει υπ' όψιν του μόνο «δημιουργία» και «θανάτους» γενεαλογικών γραμμών αλλά θεωρεί ότι δεν υπάρχουν εξαφανίσεις. Όπως ήδη αναφέρθηκε ήταν δύσκολο να προσδιοριστεί ένα παλαιογεωγραφικό γεγονός στην περιοχή μελέτης ώστε να το χρησιμοποιηθεί στη χρονολόγηση του δέντρου, η

τελευταία λύση, επομένως, ήταν να χρησιμοποιηθούν (δημοσιευμένα) δεδομένα που αφορούν τον ρυθμό υποκατάστασης στο mtDNA των χερσαίων γαστεροπόδων. Όμως, οι ρυθμοί υποκατάστασης για τα μιτοχονδριακά γονίδια στα χερσαία γαστερόποδα, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία διέφεραν πάρα πολύ. Συγκεκριμένα, από 0,6% ως 12,9% ανά εκατομμύριο χρόνια για το *16S rDNA* (Chiba, 1999; Thomaz, Guiller & Clarke, 1996; Van Riel *και συν.*, 2005), ενώ για το *COI*, ο ρυθμός υποκατάστασης που αναφέρεται ποικίλει μεταξύ 2,8% και 13% ανά εκατομμύριο χρόνια (Van Riel *και συν.*, 2005), τέλος για το *COII* δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία (για τα χερσαία γαστερόποδα τουλάχιστον) (Parmakelis *και συν.*, 2013). Επομένως, το να επιλεγεί ένας (μοναδικός) ρυθμός υποκατάστασης ως σημείο αναφοράς (calibration point) αποδείχτηκε εξίσου δύσκολο.

Έτσι, η χρονολόγηση του δέντρου πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τέσσερα διαφορετικά σενάρια στα οποία δεχτήκαμε ότι ο ρυθμός υποκατάστασης του *COII* είναι ίσος με αυτόν για το *COI*. Τα σενάρια αυτά ήταν:

***Σενάριο 1*:** εξαιρετικά υψηλός ρυθμός υποκατάστασης (*16S rDNA*: 10%, *COI* και *COII*: 13%).

***Σενάριο 2*:** υψηλός ρυθμός υποκατάστασης (*16S rDNA*: 5%, *COI* και *COII*: 8%).

***Σενάριο 3*:** μέτριος ρυθμός υποκατάστασης (*16S rDNA*: 2,5%, *COI* και *COII*: 4%).

***Σενάριο 4*:** χαμηλός ρυθμός υποκατάστασης (*16S rDNA*: 1,6%, *COI* και *COII*: 2,5%).

Για το κάθε ένα σενάριο πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες αναλύσεις (σε διαφορετικούς επεξεργαστές) με $50x10^6$ επαναλήψεις ενώ οι παράμετροι αποθηκευόταν κάθε 3.500 επαναλήψεις. Οι δύο ανεξάρτητες αναλύσεις τελικά συνδυάζονται (το 10% των αποτελεσμάτων αγνοήθηκε ως περίοδος burn-in) με τη χρήση του προγράμματος LogCombiner v.1.5.3 (Drummond & Rambaut, 2009). Η αξιολόγηση της σύγκλισης των εκτιμώμενων παραμέτρων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Tracer v.1.5 (Drummond & Rambaut, 2009). Το δραστικό μέγεθος δείγματος (effective sample size-ESS) όλων των παραμέτρων ήταν πάνω από 200, το οποίο συχνά θεωρείται επαρκές επίπεδο δειγματοληψίας (Drummond & Rambaut, 2009). Από τα δέντρα που προέκυψαν καταλήξαμε σε ένα, αυτό με τη μεγαλύτερη αξιοπιστία των κλάδων (maximum posterior probabilities) με τη βοήθεια του προγράμματος TreeAnnotator v.1.5.3 (Drummond & Rambaut, 2009) και στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι ηλικίες και το 95% διάστημα της υψηλότερης πυκνότητας των εκ των υστέρων πιθανοτήτων για κάθε κόμβο.

2.2.4.7. Προτείνοντας βιογεωγραφικό σενάριο

Το τελευταίο ερώτημα που προσεγγίστηκε ήταν: ποια ήταν η αρχέγονη κατανομή του γένους; Προς απάντηση αυτού του ερωτήματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα RASP (μια πιο ενημερωμένη εκδοχή του προγράμματος S-DIVA v.2.0) (Yu, Harris & He, 2010) και πραγματοποιήθηκε τυπική Μπεϋζιανή ανάλυση διασποράς-βικαριανισμού (Ronquist, 1997), επιτρέποντας έτσι την αναπαράσταση (και τη βελτιστοποίηση) των αρχέγονων περιοχών εξάπλωσης και περιορίζοντας αυτές σε δύο. Η συγκεκριμένη ανάλυση βασίζεται στις μεθόδους που ανέπτυξαν δύο ερευνητικές ομάδες, οι Nylander et al. (2008) και οι Harris και Xiang (2009) οι οποίες εφαρμόζονται όταν υπάρχει αβεβαιότητα στη φυλογενετική εκτίμηση. Το δέντρο στο οποίο κατέληξε η ΜΣ τροποποιήθηκε έτσι ώστε κάθε κλάδος (βλ. αποτελέσματα) να αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο άκρο (συμπτυγμένο δέντρο-condensed tree). Η σημερινή γεωγραφική εξάπλωση του γένους υποδιαιρέθηκε σε 11 γειτνιάζουσες περιοχές (Πίνακας 2.5) οι οποίες πρακτικά αντιστοιχούν στα όρια των μεγάλων ορεινών όγκων της Πελοποννήσου και της Στερεάς Ελλάδας. Η πρώτη περιοχή, από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως Βόρειο-Δυτική Ελλάδα (A) και είναι η Ήπειρος, η Στερεά χωρίζεται σε τρεις περιοχές: δυτική Στερεά (B), κεντρική Στερεά (C) και ανατολική Στερεά (D). Στην Πελοπόννησο διακρίνονται επτά περιοχές: Βόρειο-δυτική (E), Βόρεια και κεντρική (F), Βόρειο-ανατολική (G), κεντρική (H), Νότια και κεντρική (I), Κεντρική και ανατολική (J), Νότιο-δυτική Πελοπόννησος (K). Ο κάθε κλάδος ανάλογα με το είδος που αντιπροσωπεύει, αντιστοιχίστηκε στην περιοχή στην οποία κατανέμεται σήμερα (Εικόνα 1.4 και Πίνακας 2.5). Το είδος *C. neocrassa* χρησιμοποιήθηκε ως εξω-ομάδα (βλ. αποτελέσματα).

Οι προγονικές περιοχές κατανομής περιορίστηκαν σε δύο, καθώς τα υπάρχοντα είδη *Codringtonia*, σήμερα συνήθως εξαπλώνονται σε δύο περιοχές (όπως αυτές ορίζονται στον Πίνακα 2.5). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 10.000 τυχαία δέντρα τα οποία προέκυψαν με το πρόγραμμα PAUP, αλλά και την τοπολογία του συμπτυγμένου δέντρου που προέκυψε από τη ΜΣ. Ακόμη, με το πρόγραμμα RASP και χρησιμοποιώντας το ίδιο σύνολο δεδομένων (δηλαδή τα τυχαία και το συμπτυγμένο δέντρο), πραγματοποιήθηκε μία Μπεϋζιανή MCMC προσέγγιση στην ανάλυση διασποράς-βικαριανισμού. Σε αυτή την ανάλυση, οι προγονικές κατανομές υποτέθηκε ότι περιελάμβαναν δύο ή όχι περισσότερες από πέντε περιοχές (παρατηρώντας τη σημερινή κατανομή (Εικόνα 1.4) των ειδών *Codringtonia*, παρατηρείται ότι ένα είδος μπορεί να κατανέμεται σε πέντε ή λιγότερες περιοχές έτσι όπως αυτές ορίστηκαν παραπάνω, έτσι ορίστηκε το πέντε στην ανάλυση).

Στην Μπεϋζιανή MCMC ανάλυση εφαρμόστηκαν τρία διαφορετικά σενάρια για την προγονική κατανομή της ρίζας του δέντρου: (1) η μηδενική υπόθεση: η προγονική μορφή των ειδών του δέντρου δεν κατανεμόταν σε καμία από τις προσδιορισμένες περιοχές, (2) η διευρυμένη υπόθεση: η προγονική μορφή των ειδών του δέντρου κατανεμόταν σε όλες τις περιοχές που ορίστηκαν, (3) η υπόθεση της εξω-ομάδας: η κατανομή του προγονικού είδους ήταν η ίδια με αυτή της εξω-ομάδας. Εφαρμόστηκε το μοντέλο των Jukes και Cantor (1969), οι επαναλήψεις ορίστηκαν στις 50.000 και ο αριθμός των αλυσίδων στις 10.

Πίνακας 2.5. Οι περιοχές κατανομής των ειδών *Codringtonia* όπως αυτές χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση διασποράς-βικαριανισμού.

Είδος	**Κατανομή ειδών**	**Γεωγραφική περιοχή**
C. helenae	HI	Κεντρική Πελοπόννησος (H), Νότιο-κεντρική Πελοπόννησος (I)
C. gittenbergeri/elisabethae	HJ	Κεντρική Πελοπόννησος (H), κεντρική-ανατολική Πελοπόννησος (J)
C. codringtonii	JK	Κεντρική-ανατολική Πελοπόννησος (J), Νότιο-δυτική Πελοπόννησος (K)
C. eucineta	BEHIK	Δυτική Στερεά (B), Βόρειο-δυτική Πελοπόννησος (E), Κεντρική Πελοπόννησος (H), Νότιο-κεντρική Πελοπόννησος (I), Νότιο-δυτική Πελοπόννησος (K)
C. intusplicata	CFG	Κεντρική Στερεά (C), Βόρειο-κεντρική Πελοπόννησος (F), Βόρειο-ανατολική Πελοπόννησος (G)
C. parnassia	BCD	Δυτική Στερεά (B), Κεντρική Στερεά (C), Ανατολική Στερεά (D)
C. neocrassa	A	Βόρειο-δυτική Ελλάδα (A)

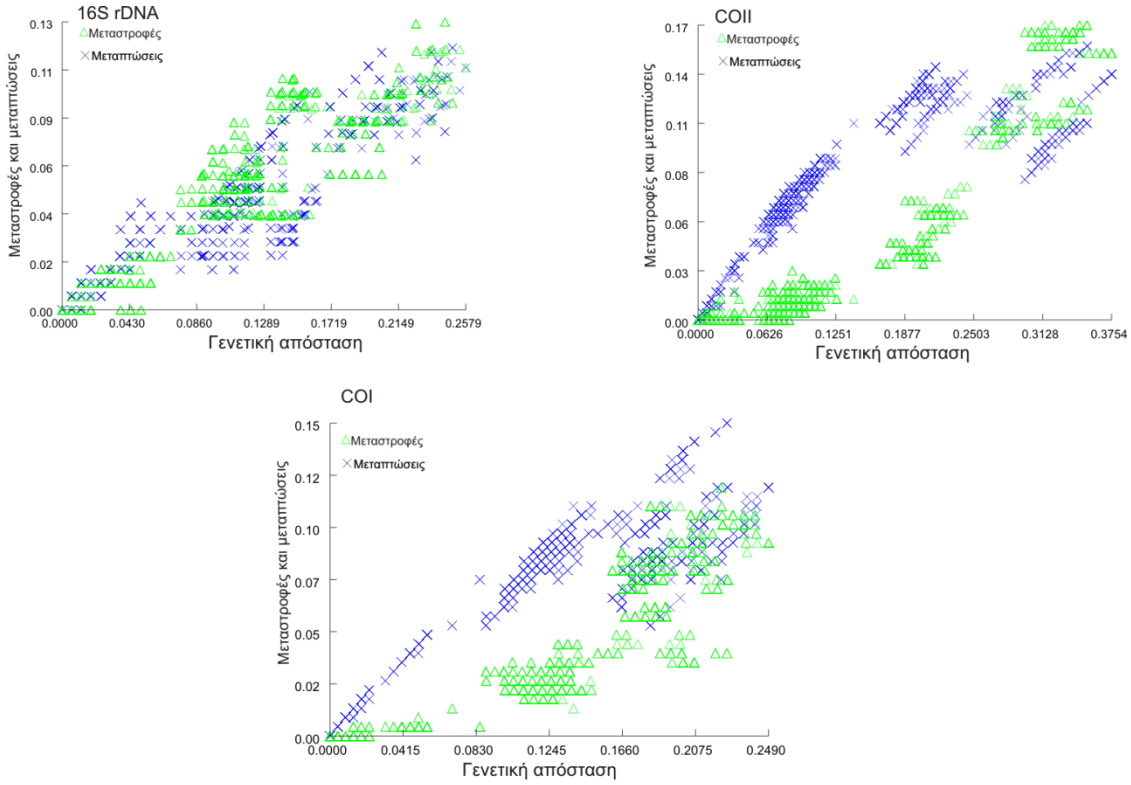
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1. Ανάλυση αλληλουχιών

Ο πολλαπλασιασμός των τμημάτων και των 3 γονιδίων ήταν επιτυχής σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, μόνο για ένα άτομο δεν καταφέραμε να έχουμε αλληλουχία για το *16S rDNA* και για ένα άλλο άτομο δεν μπορέσαμε να πολλαπλασιάσουμε το *COII* (Πίνακας 2.2). Ωστόσο, αυτά τα δύο άτομα συμπεριλήφθηκαν στην τελική ανάλυση ορίζοντας τις νουκλεοτιδικές αυτές θέσεις (470 και 558 για το *16S rDNA* και το *COII* αντίστοιχα) ως άγνωστες (missing data).

Για το τμήμα του γονιδίου *COI* αποκτήθηκαν αλληλουχίες από 83 άτομα *Codringtonia*. Το μήκος του προϊόντος ήταν 704 νουκλεοτίδια, από τα οποία 245 ήταν μεταβλητές θέσεις και 223 ήταν πληροφοριακές θέσεις (parsimony informative). Τμήμα του *COII* πολλαπλασιάστηκε σε 82 άτομα *Codringtonia*. Από τις 558 νουκλεοτιδικές θέσεις οι 254 ήταν μεταβλητές και οι 230 πληροφοριακές. Τέλος, για το *16S rDNA* προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες σε 82 άτομα. Το μήκος του προϊόντος είναι 470 χαρακτήρες (συμπεριλαμβανομένων των κενών) από τους οποίους 185 είναι μεταβλητές θέσεις και 156 πληροφοριακές. Κατά τη στοίχιση των αλληλουχιών κανένα τμήμα τους (σε κανένα από τα τρία γονίδια) δεν τέθηκε υπό αμφισβήτηση (alignment-ambiguous regions) οπότε κανένα τμήμα από τις αλληλουχίες που λήφθηκαν δεν αφαιρέθηκε από τις αναλύσεις που ακολούθησαν. Στο τμήμα του γονιδίου *16S rDNA* επτά νουκλεοτιδικές θέσεις κωδικοποιήθηκαν ως κενά (gaps) σε κάποιες αλληλουχίες. Από αυτά, τέσσερα ήταν μονά κενά (single gaps), και ένα περιελάμβανε τρία συνεχόμενα κενά.

Η ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε ότι οι υποκαταστάσεις αυξάνονται γραμμικά με τη γενετική απόσταση και στα τρία γονίδια (Εικόνα 2.7). Ωστόσο, φάνηκε να υπάρχει ελαφρά κορεσμός υποκαταστάσεων στις συγκρίσεις ενδο-ομάδας και εξω-ομάδας.



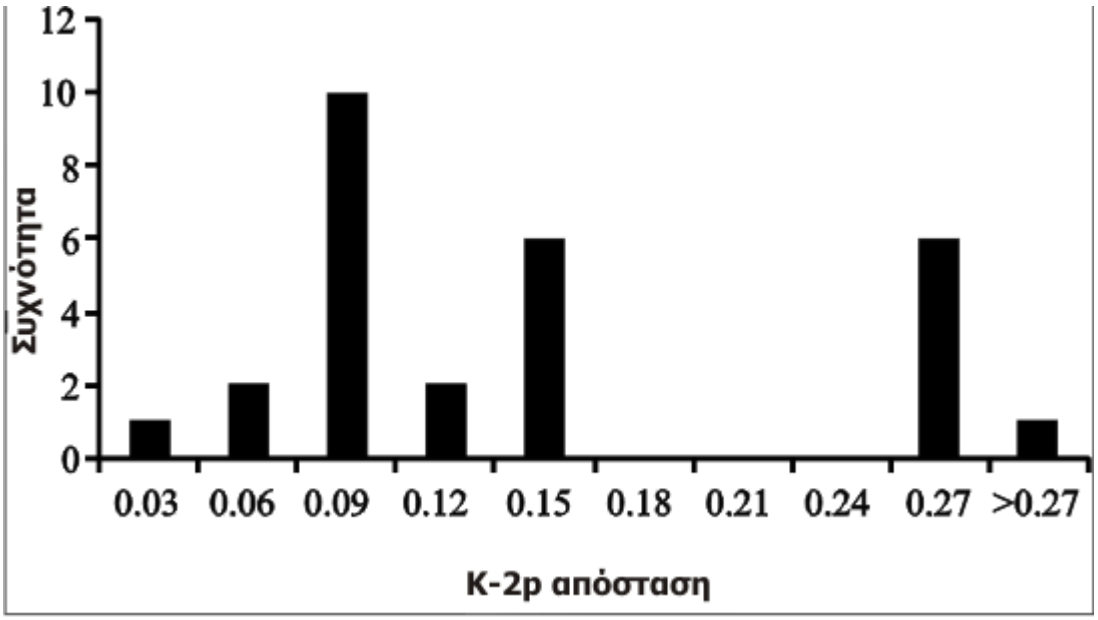
Εικόνα 2.7. Γραφική απεικόνιση των μεταστροφών και των μεταπτώσεων σε συνάρτηση με τη γενετική απόσταση.

Η μέση γενετική απόσταση εντός και μεταξύ των ειδών *Codringtonia* υπολογίστηκε με το μοντέλο K-2p στο ενοποιημένο σύνολο δεδομένων και τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 2.6. Για το ενοποιημένο σύνολο δεδομένων βρέθηκε ότι οι αλληλουχίες της ενδο-ομάδας διαφέρουν μεταξύ τους κατά μέσο όρο κατά 11,5%. Ακόμη, οι αλληλουχίες της ενδο-ομάδας διαφέρουν από αυτές της εξω-ομάδας κατά μέσο όρο κατά 26,3%. Τα (κατ' όνομα) είδη *Codringtonia* διαφέρουν μεταξύ τους από 0,8 ως 27,6%. Εντός των ειδών *Codringtonia* η μέση γενετική απόσταση ανάμεσα σε δύο μεμονωμένες αλληλουχίες κυμαίνεται μεταξύ 0,2 και 5,2%. Η μέγιστη γενετική απόσταση ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς του ίδιου είδους μπορεί να αγγίζει το 13,5%. Οι γενετικές αποστάσεις για το κάθε ένα από τα τρία γονίδια χωριστά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.7.

Το *COII* φαίνεται να έχει υψηλότερο ρυθμό διαφοροποίησης από το *COI* για το γένος *Codringtonia* ενώ το *16S rDNA* φαίνεται να έχει χαμηλότερο ρυθμό διαφοροποίησης από τα δύο προηγούμενα γονίδια. Ακόμη, και στα τρία γονίδια, οι γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στο *C. neocrassa* και τα υπόλοιπα είδη του γένους είναι στα ίδια επίπεδα με αυτές ανάμεσα στην εξω-ομάδα και τα είδη *Codringtonia.* Μάλιστα, αυτό είναι πιο έντονο στο γονίδιο *COII* όπου το *C. neocrassa* φαίνεται να διαφέρει περισσότερο από τα υπόλοιπα είδη του γένους από ότι τα είδη του γένους *Codringtonia* με αυτά της εξω-ομάδας (Πίνακας 2.7).

Πίνακας: 2.6. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών, όπως υπολογίστηκαν από το ενοποιημένο σύνολο δεδομένων και εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura (K2P).

Ενδο-ειδικά		Δια-ειδικά (net between group average)						
		1	2	3	4	5	6	7
0,022	1_*C. codringtonii*							
0,011	2_*C. elisabethae*	0,092						
0,052	3_*C. eucineta*	0,082	0,070					
0,002	4_*C. gittenbergeri*	0,104	0,008	0,077				
0,003	5_*C. helenae*	0,104	0,044	0,079	0,049			
0,034	6_*C. intusplicata*	0,098	0,072	0,070	0,075	0,085		
0,002	7_*C. neocrassa*	0,269	0,255	0,234	0,276	0,265	0,247	
0,040	8_*C. parnassia*	0,138	0,138	0,125	0,148	0,143	0,130	0,255



Εικόνα 2.8. Κατανομή των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ειδών *Codringtonia* όπως προέκυψαν από τον Πίνακα 2.6.

2.3.2. Φυλογενετικές αναλύσεις

Για τις φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το ενιαίο σύνολο δεδομένων το οποίο αποτελείται από τις αλληλουχίες (και των τριών γονιδίων) 83 ατόμων και άλλες δύο αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν σαν εξω-ομάδες. Οι στοιχισμένες αλληλουχίες περιελάμβαναν 1.732 θέσεις οι οποίες και αναλύθηκαν. Από αυτές τις θέσεις οι 684 ήταν μεταβλητές και οι 609 ήταν πληροφοριακές. Το καταλληλότερο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που επιλέχθηκε από το Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) ήταν το HKY+Γ (παράμετρος Γ= 0,1385), HKY+I+Γ (παράμετρος Γ= 1,0289, ποσοστό αμετάβλητων θέσεων= 0,4139) και TrN+Γ (παράμετρος Γ= 0,5573) για τα γονίδια *COI*, *COII* και *16S rDNA* αντίστοιχα.

Το φυλογενετικό δέντρο των ειδών *Codringtonia* όπως προέκυψε από την ανάλυση Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ) παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.9. Οι αναλύσεις Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ΜΠ) και Μέγιστης Φειδωλότητας (ΜΦ) κατέληξαν σε δέντρα ίδιας τοπολογίας με αυτό της Εικόνας 2.9 με τις μόνες διαφορές στη στατιστική στήριξη των κλάδων οι οποίες και παρατίθενται στο δέντρο της Εικόνας 2.9. Οι προαναφερόμενες αναλύσεις για κάθε γονίδιο χωριστά, κατέληξαν σε δέντρα στα οποία η μονοφυλετικότητα των κλάδων διατηρείται όπως φαίνεται στο δέντρο της Εικόνας 2.9 και στηρίζεται ισχυρά στατιστικά, αλλά οι σχέσεις μεταξύ των κλάδων λαμβάνουν χαμηλή στατιστική στήριξη, ως εκ τούτου τα δέντρα από το κάθε ένα γονίδιο χωριστά δεν παρατίθενται και παρατίθεται μόνο το ***πλήρως επιλυμένο*** δέντρο από το ***συνδυασμό και των 3 γονιδίων***.

Σε αυτό το δέντρο τα είδη *C. gittenbergeri* και *C. elisabethae* φαίνεται να σχηματίζουν μαζί μια πολύ ισχυρά στατιστικά στηριζόμενη μονοφυλετική ομάδα, κάτι που δεν ήταν αναμενόμενο με βάση τη συστηματική κατάταξη (Subai, 2005). Επιπλέον, το *C. elisabethae* εμφανίζεται παραφυλετικό σε σχέση με το *C. gittenbergeri*. Η μονοφυλετική αυτή ομάδα εμφανίζεται να είναι αδελφός κλάδος του διακριτού είδους *C. helenae*, μια σχέση που όμως δεν στηρίζεται τόσο ισχυρά (με την ανάλυση ΜΠ). Στη συνέχεια εμφανίζεται ο κλάδος που περιλαμβάνει το *C. codringtonii* και αμέσως μετά ο κλάδος που περιλαμβάνει το *C. eucineta*, όμως η σχέση του με τα προαναφερθέντα είδη *Codringtonia* (*C. codringtonii*, *C. helenae*, *C. elisabethae, C. gittenbergeri*) δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη. Αντίθετα, η σχέση του κλάδου που περιλαμβάνει το *C. intusplicata* με τον μεγαλύτερο κλάδο που περιγράφηκε παραπάνω (*C. codringtonii*, *C. helenae*, *C. elisabethae, C. gittenbergeri* και *C. eucineta)*, υποστηρίζεται ισχυρά από τις φυλογενετικές αναλύσεις.

Τέλος, τα είδη *C. parnassia* και *C. neocrassa* είναι τα τελευταία που διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα είδη του γένους. Σημειώνεται επίσης ότι, άτομα που συλλέχθηκαν από δύο περιοχές στις οποίες εξαπλώνεται το *C. gittenbergeri* (κωδικοί στον χάρτη 11, 12) ταξινομήθηκαν στο είδος *C. codringtonii* με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά ενώ και με βάση τα μοριακά δεδομένα ομαδοποιούνται στον κλάδο που περιλαμβάνει το είδος *C. codringtonii.*

2.3.2.1. Χρόνος απόκλισης των κλάδων

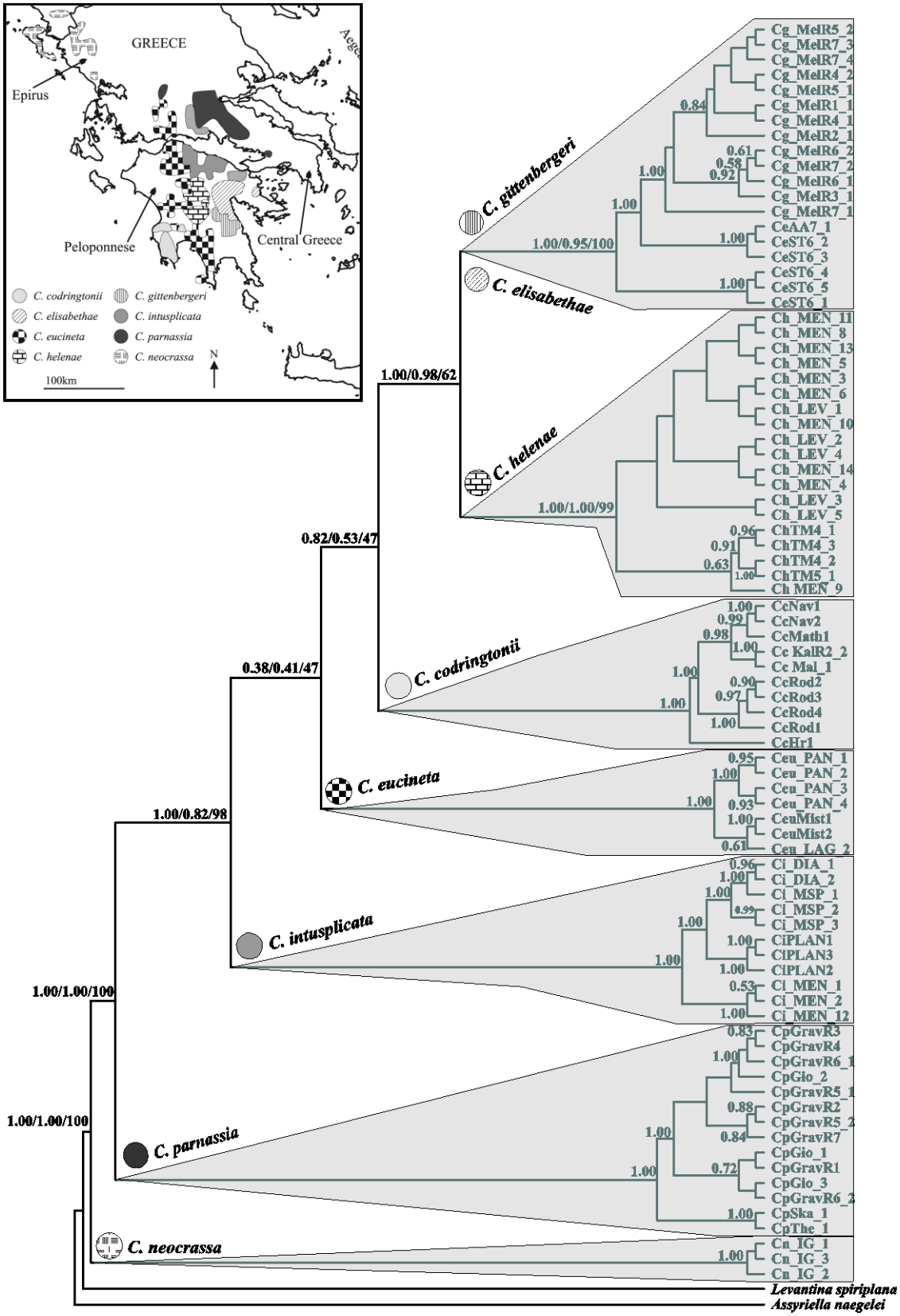
Για τον υπολογισμό του χρόνου απόκλισης των κλάδων εφαρμόστηκαν τέσσερα σενάρια και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.8. Από τα τέσσερα σενάρια που εφαρμόστηκαν, τα δύο που προϋπέθεταν εξαιρετικά υψηλό και υψηλό ρυθμό μοριακής εξέλιξης δεν φαίνονται πιθανά, εκτός και αν δεχτεί κανείς ότι η διαφοροποίηση ενός ολόκληρου γένους χερσαίων σαλιγκαριών ολοκληρώθηκε μέσα σε 1,47 ή 2,6 εκατ. χρόνια αντίστοιχα. Αντιθέτως, πολύ πιθανότερα φαίνονται τα σενάρια που δέχονται μέσο ή χαμηλό ρυθμό εξέλιξης. Αν εστιάσει κανείς στον χρόνο απόκλισης (Πίνακας 2.8) που υπολογίζεται για τον κόμβο G, όπου διχοτομείται ο κλάδος του είδους *C. parnassia*, εφαρμόζοντας το σενάριο του χαμηλού ρυθμού εξέλιξης (1,60-3,90 εκατ. χρόνια, αυτό φαίνεται να συμπίπτει με την ύπαρξη λίμνης στην περιοχή αυτή, η οποία χώριζε τους ανατολικούς από τους δυτικούς πληθυσμούς του είδους περίπου πριν από 3,5 εκατ. χρόνια (παρατιθέμενος χάρτης Εικόνας 2.10) ως εκ τούτου θεωρείται πιθανότερο το σενάριο του χαμηλού ρυθμού εξέλιξης. Στην Εικόνα 2.10 απεικονίζονται μόνο οι χρόνοι απόκλισης που υπολογίστηκαν με βάση το πιθανότερο εξελικτικό σενάριο. Οι επτά κύριοι κλάδοι του δέντρου που αντιστοιχούν και στα κατ' όνομα είδη, διαχωρίστηκαν στο χρονικό διάστημα 7,6 ως 1,58 εκατ. χρόνια δηλαδή τέλη Μειόκαινου προς Πλειστόκαινο. Τα είδη *Codringtonia* που κατανέμονται στην Πελοπόννησο διαφοροποιήθηκαν την περίοδο μεταξύ 3,4 ως 1,58 εκατ. χρόνια. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης που αφορούν το χρόνο διαφοροποίησης των ειδών αυτών στην Πελοπόννησο τοποθετούν τη δημιουργία των ειδών αυτών στην περίοδο Πλειόκαινο-Πλειστόκαινο.

Πίνακας: 2.7. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών, όπως υπολογίστηκαν για τα γονίδια *COI, COII* και *16S rDNA* και εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura. Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις ενώ πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση. Συντμήσεις: hel: *C. helenae*, int: *C. intusplicata*, cod: *C. codringtonii*, euc: *C. eucineta*, elis: *C. elisabethae*, neo: *C. neocrassa*, par: *C. parnassia*, out: *Asyriela* και *Levantina.*

Γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών για το γονίδιο *COI*										
Ενδοειδικά		**hel**	**int**	**cod**	**euc**	**elis**	**git**	**neo**	**par**	**out**
0,001	**hel**		0,093	0,095	0,077	0,053	0,061	0,215	0,131	0,171
0,035	**int**	0,111		0,095	0,073	0,078	0,078	0,201	0,111	0,132
0,026	**cod**	0,109	0,126		0,083	0,097	0,109	0,244	0,119	0,15
0,057	**euc**	0,106	0,119	0,125		0,078	0,083	0,197	0,118	0,142
0,012	**elis**	0,06	0,102	0,116	0,113		0,01	0,214	0,122	0,157
0,001	**git**	0,062	0,096	0,122	0,112	0,017		0,226	0,129	0,168
0,001	**neo**	0,215	0,218	0,257	0,226	0,22	0,227		0,211	0,143
0,039	**par**	0,151	0,148	0,151	0,166	0,147	0,149	0,23		0,132
0,124	**out**	0,233	0,211	0,225	0,233	0,231	0,231	0,205	0,214	

Γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών για το γονίδιο *COII*										
Ενδοειδικά		**hel**	**int**	**cod**	**euc**	**elis**	**git**	**neo**	**par**	**out**
0,003	**hel**		0,104	0,106	0,093	0,046	0,046	0,372	0,186	0,225
0,034	**int**	0,123		0,108	0,08	0,092	0,092	0,326	0,185	0,224
0,017	**cod**	0,116	0,133		0,071	0,093	0,099	0,352	0,174	0,235
0,056	**euc**	0,123	0,125	0,107		0,077	0,076	0,303	0,153	0,17
0,011	**elis**	0,053	0,114	0,107	0,111		0,005	0,354	0,193	0,219
0,003	**git**	0,049	0,11	0,109	0,105	0,012		0,359	0,196	0,219
0,005	**neo**	0,376	0,348	0,363	0,333	0,362	0,363		0,355	0,236
0,043	**par**	0,209	0,223	0,204	0,203	0,22	0,219	0,379		0,243
0,142	**out**	0,298	0,312	0,314	0,269	0,295	0,292	0,31	0,335	

Γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών για το γονίδιο *16S rDNA*										
Ενδοειδικά		**hel**	**int**	**cod**	**euc**	**elis**	**git**	**neo**	**par**	**out**
0,007	**hel**		0,043	0,118	0,061	0,025	0,029	0,246	0,115	0,218
0,030	**int**	0,061		0,095	0,049	0,034	0,041	0,25	0,099	0,214
0,019	**cod**	0,131	0,119		0,096	0,086	0,102	0,236	0,134	0,24
0,035	**euc**	0,082	0,081	0,122		0,048	0,066	0,225	0,104	0,192
0,009	**elis**	0,033	0,054	0,1	0,07		0,007	0,235	0,107	0,221
0,001	**git**	0,033	0,057	0,112	0,084	0,012		0,279	0,121	0,247
0,001	**neo**	0,25	0,266	0,246	0,242	0,24	0,28		0,227	0,171
0,039	**par**	0,138	0,134	0,163	0,141	0,132	0,141	0,247		0,211
0,082	**out**	0,262	0,27	0,291	0,25	0,267	0,288	0,213	0,272	



Εικόνα 2.9. Το 50% πλειοψηφικής αποδοχής δέντρο το οποίο προέκυψε από την ανάλυση Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ) πάνω στο ενοποιημένο σύνολο δεδομένων και για τα τρία γονίδια (εφαρμόζοντας διαφορετικό μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για το καθένα). Τα νούμερα στους κλάδους υποδεικνύουν τις εκ των υστέρων πιθανότητες για τη στατιστική στήριξη των κλάδων (στους κλάδους που δεν είναι κύριοι φαίνονται μόνο οι τιμές που είναι πάνω από 0,5). Στους κύριους κλάδους του δέντρου, φαίνεται ακόμη, η στατιστική στήριξη από τις αναλύσεις ΜΠ και ΜΦ με την εξής μορφή ΜΣ/ΜΠ/ΜΦ. Ο χάρτης που παρατίθεται δείχνει τα είδη *Codringtonia* που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.8. Εκτίμηση της ηλικίας των κόμβων του δέντρου εφαρμόζοντας τρεις διαφορετικούς ρυθμούς υποκατάστασης. Στην παρένθεση φαίνεται ο ρυθμός υποκατάστασης που εφαρμόστηκε στην ανάλυση για κάθε γονίδιο.

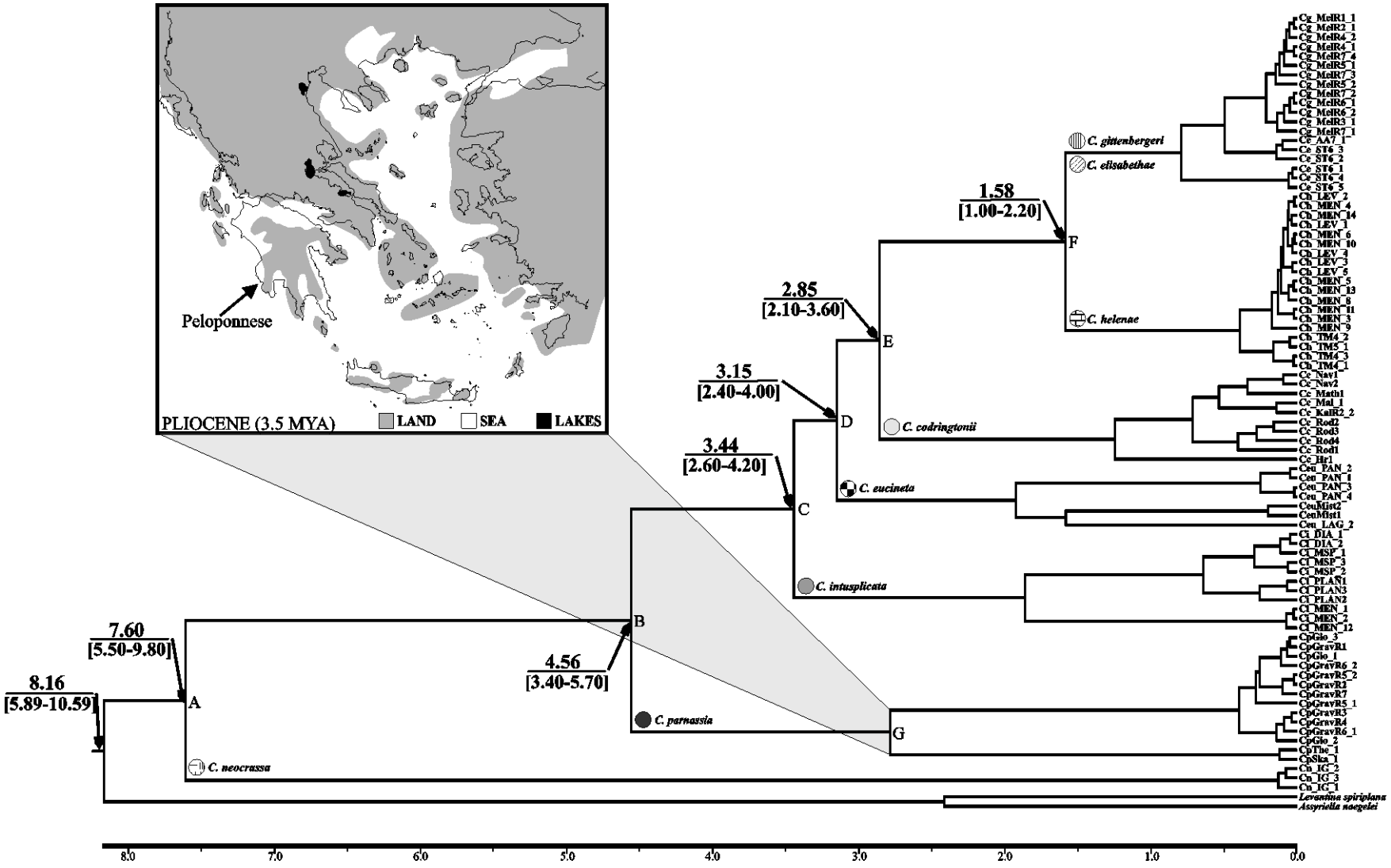
	Χαμηλός ρυθμός (*16S rRNA*: 1.6%, *COI*, *COII*: 2.5%)		**Μέσος ρυθμός** (*16S rRNA*: 2.5%, *COI*, *COII*: 4%)		**Υψηλός ρυθμός** (*16S rRNA*: 5%, *COI*, *COII*: 8%)	
Κόμβος	**Ηλικία κόμβου**	**HPD_95%**	**Ηλικία κόμβου**	**HPD_95%**	**Ηλικία κόμβου**	**HPD_95%**
Ρίζα	8,16	5,89-10,59	5,22	3,72-6,77	2,59	1,87-3,36
A	7,60	5,50-9,80	4,86	3,51-6,20	2,41	1,74-3,10
B	4,56	3,40-5,70	2,90	2,70-3,60	1,44	1,09-1,82
C	3,44	2,60-4,20	2,17	1,70-2,70	1,10	0,82-1,36
D	3,15	2,40-4,00	1,99	1,52-2,50	1,00	0,77-1,27
E	2,85	2,10-3,60	1,81	1,34-2,30	0,90	0,65-1,15
F	1,58	1,00-2,20	1,00	0,63-1,42	0,50	0,31-0,71
G	2,78	1,60-3,90	1,75	1,00-2,50	0,88	0,53-1,24

2.3.2.2. Βιογεωγραφικό σενάριο

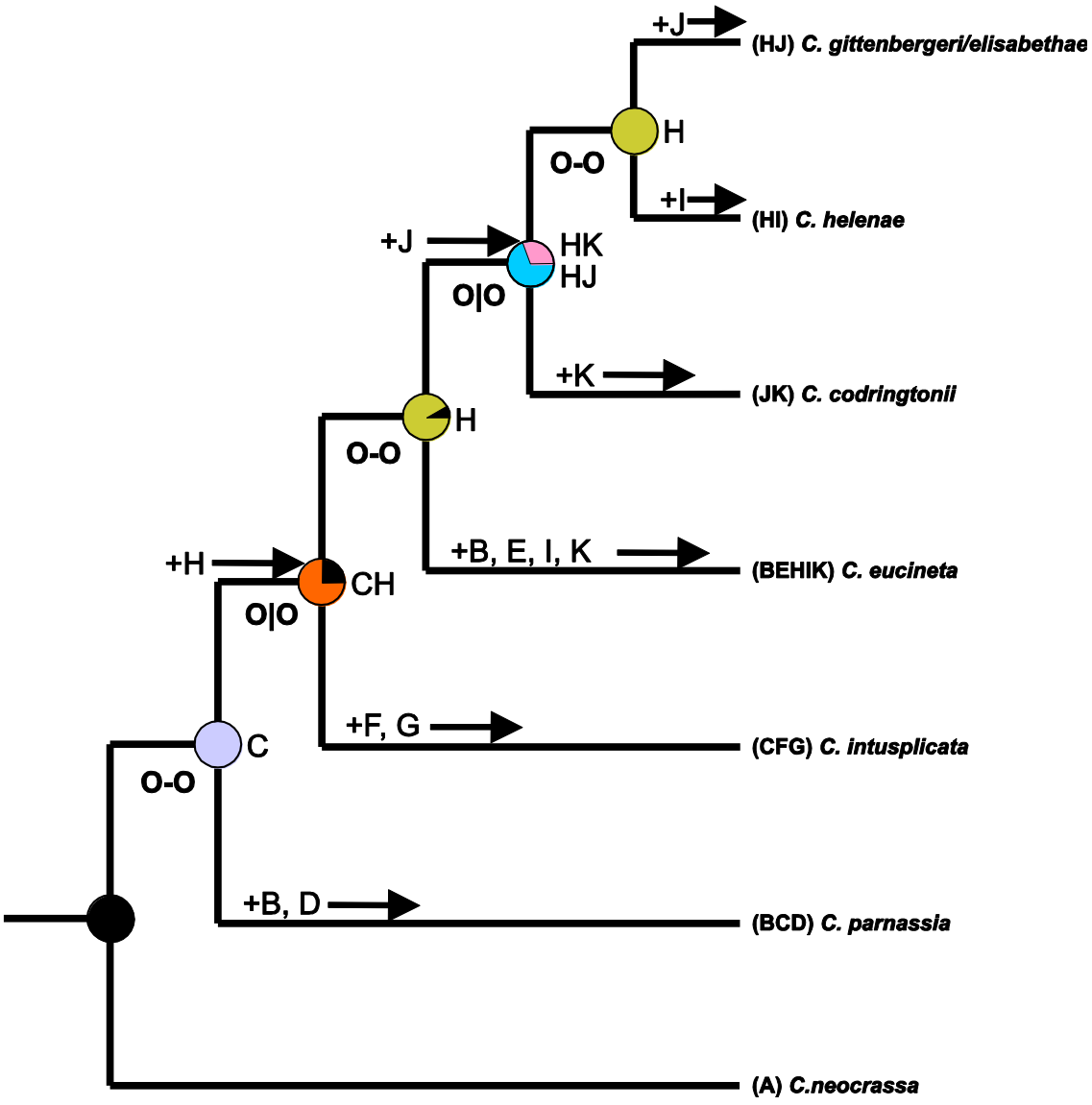
Όλες οι αναλύσεις που έγιναν κατέληξαν σε σχεδόν ταυτόσημα αποτελέσματα, με τις μόνες διαφορές να παρατηρούνται στη στατιστική στήριξη των αποτελεσμάτων. Το πιο πιθανό βιογεωγραφικό σενάριο είναι αυτό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.11.

Το βιογεωγραφικό σενάριο προέκυψε με τη χρήση του προγράμματος Bayes-S-DIVA και με τον εξής περιορισμό: οι περιοχές κατανομής για τον κάθε αρχέγονο κόμβο δεν είναι περισσότερες από δύο. Η παραδοχή αυτή δεν είναι τυχαία, έγινε παρατηρώντας ότι συνήθως οι σημερινές περιοχές κατανομής των αρτίγονων ειδών *Codringtonia* δεν είναι περισσότερες από δύο. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και αναλύσεις (Bayesian MCMC) όπου δεχτήκαμε ότι τα προγονικά είδη καταλάμβαναν περισσότερες περιοχές, ακόμα και τότε όμως τα αποτελέσματα ήταν ίδια με αυτά της Εικόνας 2.11 (παρέχονταν φυσικά και εναλλακτικές λύσεις) αλλά με μικρότερη στατιστική στήριξη. Στις περιπτώσεις που έγινε η παραδοχή ότι τα προγονικά είδη καταλάμβαναν περισσότερες (από δύο) περιοχές, καθεμία από αυτές τις γειτονικές περιοχές υποστηριζόταν με ένα μικρό ποσοστό ως η προγονική κατανομή και πολλαπλά φαινόμενα βικαριανισμού δεν ήταν εμφανή (ένα συχνό φαινόμενο όταν η ανάλυση πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπ' όψιν περισσότερες περιοχές προγονικής κατανομής).

Σύμφωνα με την ανάλυση (πρόγραμμα S-DIVA) ο πρόγονος όλων των ειδών *Codringtonia* είχε μια περιορισμένη κατανομή στη Στερεά Ελλάδα (C: 100%) και στη συνέχεια μέσα σε αυτή την περιοχή προέκυψαν δύο γενεαλογικές γραμμές (γεγονός διπλασιασμού-duplication event, δηλαδή δημιουργία δύο ειδών μέσα στην ίδια περιοχή), δημιουργώντας το *C. parnassia* και τον πρόγονο των υπολοίπων ειδών *Codringtonia*. Το *C. parnassia* επέκτεινε την κατανομή του στη Στερεά Ελλάδα, με διασπορά, τόσο δυτικά (B) όσο και ανατολικά (D), ενώ ο πρόγονος των άλλων πέντε ειδών πιθανά εποίκισε την Πελοπόννησο (H). Στην κεντρική Στερεά και την κεντρική Πελοπόννησο (C και H: 75,75%) γεγονότα βικαριανισμού είχαν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αφ' ενός του είδους *C. intusplicata* και αφ' ετέρου του προγόνου των ειδών *C. eucineta, C. codringtonii, C. gittenbergeri/elisabethae* και *C. helenae*. Στη συνέχεια, το *C. intusplicata* που δημιουργήθηκε στην κεντρική Στερεά επέκτεινε την εξάπλωσή του στη βόρεια-ανατολική (G) και βόρεια-κεντρική (F) Πελοπόννησο. Στην κεντρική Πελοπόννησο (H: 92,82%) εντοπίζεται ο κοινός πρόγονος των ειδών *C. eucineta*, *C. codringtonii*, *C. gittenbergeri/elisabethae* και *C. helenae*. Κάποιο γεγονός ειδογένεσης είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του είδους *C. eucineta* το οποίο επεκτάθηκε νότια (I, K) και βόρεια εποικώντας τη βόρειο-δυτική Πελοπόννησο (E) και τη δυτική Στερεά (B), ενώ ο κοινός πρόγονος των υπολοίπων ειδών (*C. codringtonii*, *C. gittenbergeri/elisabethae* και *C. helenae*) διατήρησε μια περιορισμένη κατανομή στην κεντρική (H) και κεντρική-ανατολική Πελοπόννησο (J). Η περιοχή αυτή (HJ: 66,53%) κληροδοτήθηκε στα είδη *C. condringtonii* και στον πρόγονο των ειδών *C. gittenbergeri/elisabethae* και *C. helenae*. Το *C. condringtonii* επέκτεινε την κατανομή του στη νότιο-δυτική Πελοπόννησο (K) αλλά οι πληθυσμοί του πιθανά εξαφανίστηκαν από τις ενδιάμεσες περιοχές (π.χ. νότια και κεντρική Πελοπόννησο). Στην κεντρική Πελοπόννησο (H: 100%) σχηματίζονται δύο είδη, το *C. helenae* που επεκτάθηκε στην κεντρική-ανατολική Πελοπόννησο (I) και το *C. gittenbergeri/elisabethae* που επεκτάθηκε στη νότιο-δυτική Πελοπόννησο (K). Τα τρία σενάρια (μηδενική υπόθεση, διευρυμένο, εξω-ομάδας) έδωσαν σχεδόν ταυτόσημα αποτελέσματα.



Εικόνα 2.10. Το βαθμονομημένο με βάση το χρόνο φυλογενετικό δέντρο για τα είδη *Codringtonia* όπου οι χρόνοι απόκλισης των κλάδων (για κάθε κύριο κόμβο) υπολογίστηκαν με το BEAST εφαρμόζοντας το πρώτο σενάριο αυτό με το μικρό εξελικτικό ρυθμό. Τα νούμερα στους κόμβους πάνω από την οριζόντια γραμμή είναι η μέση απόκλιση σε εκατομμύρια χρόνια. Οι αριθμοί (εκ. χρόνια) εντός παρένθεσης κάτω από την οριζόντια γραμμή είναι το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της εκ των υστέρων πυκνότητας (95% highest posterior density (HPD) intervals). Ο χάρτης που παρατίθεται είναι μια γεωγραφική αποτύπωση της περιοχής κατά το Πλειόκαινο και έχει σχεδιαστεί με βάση παλαιογεωγραφικά δεδομένα (λεπτομέρειες στην εργασία Parmakelis et al., 2006a).



Εικόνα 2.11. Το σενάριο διασποράς-βικαριανισμού για τα είδη *Codringtonia* όπως ανακατασκευάστηκε με το πρόγραμμα διασποράς-βικαριανισμού (S-DIVA). Ο μέγιστος αριθμός αρχέγονων περιοχών ορίστηκε σε δύο. Η φυλογένεση που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή της Εικόνας 3.9. Τα γραφήματα τύπου πίτας στους εσωτερικούς κόμβους αντιπροσωπεύουν τον συνδυασμό των πιθανοτήτων για κάθε πιθανή αρχέγονη περιοχή κατανομής (όπως επισημαίνονται με τα αντίστοιχα γράμματα) και υπολογίστηκαν με το S-DIVA. Η μερικώς ή πλήρως μαύρη πίτα υποδηλώνει ότι καμία από τις προσδιορισμένες περιοχές δεν είχε πιθανότητα μεγαλύτερη από 5%, επομένως οι πιθανότητες όλων των εναλλακτικών σεναρίων προστέθηκαν. Φαινόμενο βικαριανισμού: **O|O**, φαινόμενο διπλασιασμού: **O-O** (δημιουργία νέου είδους εντός της περιοχής), βέλος και σύμβολο (+): φαινόμενο διασποράς.

2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.4.1. Επίπεδα διαφοροποίησης, φυλογένεση και ζητήματα ταξινομικής

Τα επίπεδα μιτοχονδριακής διαφοροποίησης που παρατηρήθηκαν τόσο μεταξύ όσο και εντός των ειδών *Codringtonia* (Πίνακας 2.6 και Πίνακας 2.7) είναι ιδιαίτερα υψηλά αλλά εντός του εύρους τιμών που έχει καταγραφεί για άλλα γένη χερσαίων γαστερόποδων (Chiba, 1999; Goodacre & Wade, 2001; Johnson, O'Brien & Fitzpatrick, 2010; Parmakelis & Mylonas, 2004; Parmakelis *και συν.*, 2003; Thomaz *και συν.*, 1996; Watanabe & Chiba, 2001). Αν συγκρίνει κανείς τα επίπεδα διαφοροποίησης που καταγράφηκαν με αυτά που αναφέρονται για άλλα γένη βραχόβιων σαλιγκαριών στη Μεσόγειο, παρατηρεί ότι οι γενετικές αποστάσεις είναι μεγαλύτερες από αυτές του γένους *Marmorana* (Fiorentino *και συν.*, 2008) αλλά στα ίδια επίπεδα με αυτά για το *Iberus* (Elejalde *και συν.*, 2008). Αν παρατηρήσει κανείς την κατανομή των γενετικών αποστάσεων ανάμεσα στα είδη *Codringtonia* (Εικόνα 2.8) γίνεται φανερή η ύπαρξη ενός κενού. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη μεγάλη απόκλιση (ως προς τις αλληλουχίες των γονιδίων) ανάμεσα στο είδος που κατανέμεται στη βόρειο-δυτική Ελλάδα, το *C. neocrassa*, από τα υπόλοιπα είδη του γένους. Αυτό το κενό δεν μπορεί να οφείλεται σε ανεπαρκή δειγματοληψία, καθώς όλα τα είδη που αναφέρονται στην Ελλάδα (με εξαίρεση το *C. neocrassa*) αντιπροσωπεύονται από περισσότερους του ενός πληθυσμούς. Επιπλέον, για το είδος αυτό, έγιναν επανειλημμένες προσπάθειες να συλλεγχθούν άτομα και από άλλους πληθυσμούς από την περιοχή της Ηπείρου αλλά αυτό δεν ήταν δυνατό. Επομένως, δύο σενάρια-υποθέσεις μπορούν να διατυπωθούν για να εξηγήσουν τα υψηλά επίπεδα διαφοροποίησης του κλάδου του *C. neocrassa* από τα υπόλοιπα είδη *Codringtonia*. Η πρώτη υπόθεση, περιλαμβάνει την εξαφάνιση ειδών που παρεμβάλλονταν ανάμεσα στην περιοχή εξάπλωσης του *C. neocrassa* και αυτής των υπολοίπων ειδών *Codringtonia*, ενώ σύμφωνα με τη δεύτερη το *C. neocrassa* θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα ξεχωριστό γένος, σχετικά απομακρυσμένο από το γένος *Codringtonia*. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν δεδομένα για να στηρίξουν ή να απορρίψουν κανένα από τα δύο σενάρια και έτσι αυτό το ζήτημα μένει αναπάντητο. Παρ' όλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι πιο πιθανή θεωρείται η δεύτερη υπόθεση, αυτή που υποστηρίζει ότι το *C. neocrassa* είναι ένα, πιθανά εναπομείναν, είδος ενός διαφορετικού γένους, με περιορισμένη σημερινή κατανομή, το οποίο έχει μερικώς παρόμοια μορφολογικά και οικολογικά χαρακτηριστικά με το *Codringtonia.* Εξάλλου,

όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. κεφάλαιο 1), στην τελευταία αναθεώρηση του γένους ο Subai (2005) θεωρεί το *C. neocrassa* υπό-γένος του γένους *Codringtonia.*

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 2.9, υπάρχουν έξι διακριτοί φυλογενετικοί κλάδοι και ένας επιπλέον κλάδος στον οποίο περιλαμβάνεται ένα είδος η σχέση του οποίου με τα υπόλοιπα είδη του γένους είναι αμφισβητήσιμη. Η φυλογένεση αυτή, είναι μερικώς σύμφωνη με την τελευταία συστηματική αναθεώρηση του γένους (Subai, 2005). Έξι (*C. helenae, C. codringtonii, C. eucineta, C. intusplicata*, *C. parnassia* και *C. neocrassa*) από τα οκτώ κατ' όνομα είδη *Codringtonia* που αναφέρονται από τον Subai (2005) επιβεβαιώνονται και από τη μοριακή φυλογένεση, ενώ τα άλλα δύο είδη (*C. gittenbergeri* και *C. elisabethae*) σχηματίζουν έναν μονοφυλετικό κλάδο. Το γεγονός αυτό, μπορεί να αποδοθεί σε υβριδοποίηση, ωστόσο για κάτι τέτοιο δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία, αλλά ούτε και μπορεί να υποστηριχθεί με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα, ατελής διαχωρισμός γενεαλογικών γραμμών (Sauer & Hausdorf, 2010) μπορεί να είναι ένας ακόμα λόγος για αυτή την παραφυλετικότητα.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, κρίνεται απαραίτητη η συστηματική αναθεώρηση του γένους. Ένας ακόμα λόγος που συνηγορεί υπέρ της αναθεώρησης είναι και ο χαρακτηρισμός όλων των ειδών *Codringtonia* ως ευπαθή (IUCN, 2012; Legakis & Maragou, 2009). Επιπρόσθετα, οι ασυμφωνίες ανάμεσα στη μοριακή φυλογένεση και στη διάκριση των ειδών με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, υπογραμμίζουν την αμφισημία των χαρακτήρων αυτών, οι οποίοι είχαν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τη διάκριση των ειδών *Codringtonia.* Η περίπτωση του *C. gittenbergeri* το οποίο σχηματίζει μονοφυλετικό κλάδο με το *C. elisabethae* είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που υπογραμμίζει το γεγονός ότι ο προσδιορισμός των ειδών με βάση αποκλειστικά και μόνο μορφολογικά χαρακτηριστικά μπορεί να οδηγήσει σε παρερμηνείες (π.χ. (Parmakelis *και συν.*, 2005)). Είναι σημαντικό να περιγραφούν νέοι μορφολογικοί χαρακτήρες, που να είναι πιο αποτελεσματικοί στη διάκριση των ειδών του γένους αυτού.

Τέλος, το γεγονός ότι δύο άτομα που ανήκουν στο είδος *C. codringtonii* συλλέχθηκαν από την περιοχή εξάπλωσης του *C. gittenbergeri* μπορεί να αποδοθεί είτε στη μεταφορά τους από τον άνθρωπο είτε στο ότι το πρώτο είδος είχε ευρύτερη κατανομή από αυτή που θεωρήθηκε αρχικά. Πιθανότερη φαίνεται η δεύτερη εκδοχή καθώς αν είχε μεσολαβήσει μεταφορά από τον άνθρωπο, τότε η ανάμειξη των ειδών (ως προς τις περιοχές εξάπλωσης τους) θα ήταν πιο εκτεταμένη, περιλαμβάνοντας περισσότερα είδη και περισσότερες περιοχές.

2.4.2. Βιογεωγραφία και χρόνος διαφοροποίησης

Υπάρχουν δύο κύρια βιογεωγραφικά σενάρια που μπορούν να εξηγήσουν τη σημερινή κατανομή των ειδών *Codringtonia*. Σύμφωνα με το πρώτο, ο πρόγονος των ειδών κατανεμόταν στις περιοχές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, στη συνέχεια ακολούθησε μια σειρά από γεγονότα βικαριανισμού εντός αυτών των περιοχών, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν τα είδη *Codringtonia* που βλέπουμε σήμερα. Αυτό όμως το σενάριο, θα μπορούσε να είναι πιθανό κάτω από ιδανικές συνθήκες καθώς απορρίπτει ενδεχόμενα διασποράς ή διπλασιασμού. Το δεύτερο σενάριο υποστηρίζει ότι το προγονικό είδος κατανεμόταν κάπου εντός της περιοχής εξάπλωσης που καταλαμβάνουν τα είδη *Codringtonia* σήμερα, στη συνέχεια μέσα από μια σειρά συμβάντων διασποράς, επέκτεινε την κατανομή του. Κατά τη διάρκεια της επέκτασης αυτής, δημιουργήθηκαν τα είδη που υπάρχουν σήμερα μέσα από διαδικασίες διάσπασης. Η δεύτερη εκδοχή φαίνεται πιο πιθανή με βάση την ανάλυση διασποράς-βικαριανισμού που πραγματοποιήθηκε. Βέβαια, αν και τα φαινόμενα βικαριανισμού δεν μπορούν να απορριφθούν, φαίνεται να ήταν τοπικά περιορισμένα.

Επομένως, το πιο πιθανό σενάριο υποστηρίζει μια εξάπλωση του γένους από βορρά προς νότο και η Στερεά Ελλάδα (C) φαίνεται να ήταν η περιοχή εξάπλωσης του προγονικού είδους. Αυτό το βιογεωγραφικό σενάριο προϋποθέτει πολλά συμβάντα διασποράς (Εικόνα 2.11) καθώς και φαινόμενα διπλασιασμού (ειδογένεση) και βικαριανισμού. Σύμφωνα με το σενάριο αυτό συνολικά πρέπει να συνέβησαν: 13 φαινόμενα διασποράς, 2 βικαριανισμού και 3 διπλασιασμού ώστε να δημιουργηθούν τα είδη *Codringtonia* και να καταλάβουν τις σημερινές περιοχές εξάπλωσης τους. Το πρόβλημα που παραμένει, ωστόσο, είναι ποια ήταν τα ακριβή γεγονότα που προκάλεσαν τον διαχωρισμό των ειδών τόσο στην περιοχή της Στερεάς όσο και στην Πελοπόννησο. Το γένος αυτό διαφοροποιείται στην περιοχή για 4,5 εκ. χρόνια (Εικόνα 2.10), σύμφωνα με τον χρόνο απόκλισης των κλάδων που υπολογίστηκε με βάση τον πιο ευλογοφανή εξελικτικό ρυθμό (αν υποτεθεί ότι το *C. neocrassa* ανήκει σε άλλο γένος). Στην Εικόνα 2.10 φαίνεται ότι τα γεγονότα ειδογένεσης, στην Πελοπόννησο, συνέβησαν πριν 3,44 εκ. χρόνια περίπου, μια περίοδο που φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική για την περιοχή για δύο κυρίως λόγους: πρώτον, η Πελοπόννησος αποχωρίζεται από την κεντρική Ελλάδα και αρχίζει σταδιακά να μεγαλώνει σε έκταση (Εικόνα 2.10) και δεύτερον, η περίοδος αυτή συμπίπτει με τη χρονική περίοδο που επικράτησε το μεσογειακό κλίμα στην περιοχή, περίπου πριν από 3,2 εκ. χρόνια (Blondel & Aronson, 1999). Έτσι, οι διαδικασίες αυτές δημιούργησαν τις προϋποθέσεις ώστε η προγονική αυτή γενεαλογική γραμμή του

γένους *Codringtonia* να επεκταθεί γεωγραφικά, να διαφοροποιηθεί και τελικά να δημιουργηθούν νέα είδη.

Ένα ακόμα πρόβλημα, που σχετίζεται με το βιογεωγραφικό σενάριο που προτάθηκε, αφορά τη διασπορά του προγόνου από τη Στερεά στην Πελοπόννησο. Οι περιοχές που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία είναι η κεντρική Στερεά (C) και η κεντρική Πελοπόννησος (H) και η διασπορά φαίνεται να έγινε από την περιοχή C στην H. Το ενδιαφέρον είναι, ότι ανάμεσα στις περιοχές C και H, υπάρχει η περιοχή F (βόρεια-κεντρική Πελοπόννησος), στην οποία δεν επεκτάθηκε ο πρόγονος. Το ερώτημα που προκύπτει λοιπόν είναι γιατί. Μια πιθανή εκδοχή είναι ότι η περιοχή αυτή δεν υπήρχε την περίοδο εκείνη που έγινε η διασπορά από τη Στερεά στην Πελοπόννησο. Ο διαχωρισμός του κλάδου που περιλαμβάνει το *C. intusplicata* από τα υπόλοιπα είδη *Codringtonia* έγινε πριν περίπου 3,44 εκ. χρόνια (Εικόνα 2.10), την περίοδο αυτή, ένα μεγάλο μέρος της περιοχής F πιθανότατα καλυπτόταν με νερό (χάρτης Εικόνα 2.10). Δυστυχώς, τα παλαιογεωγραφικά δεδομένα για αυτό το τμήμα της Ελλάδας είναι πολύ περιορισμένα και έτσι δεν είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός των ιστορικών διαδικασιών που συνέβαλαν στη σημερινή κατανομή των ειδών *Codringtonia*. Θα μπορούσε επίσης να υποτεθεί ότι την ίδια περίοδο που γινόταν η διασπορά του γένους από τα βόρεια προς τα νότια, είναι πιθανόν τα είδη που ήταν πιο προσαρμοσμένα σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες να αναγκάζονταν να καταλαμβάνουν ολοένα και μεγαλύτερα υψόμετρα καθώς προχωρούσαν προς τα νότια. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι την περίοδο εκείνη (πριν από 3,5-2,5 εκ. χρόνια) η θερμοκρασία στη νότια μεσόγειο αυξήθηκε αλλά δεν υπήρξε αλλαγή στη βροχόπτωση με αποτέλεσμα το κλίμα να γίνει πιο ξηρό (Salzmann *και συν.*, 2008). Είναι επίσης πιθανό, αυτή η εξάπλωση προς τα νότια να προκάλεσε και μετατοπίσεις σε οικολογικούς θώκους, συμπεριλαμβανομένης της προσαρμογής των οργανισμών που βρέθηκαν σε χαμηλά υψόμετρα σε πιο ζεστά και ξηρά περιβάλλοντα. Σε αυτή την περίπτωση, τα είδη αυτά που προσαρμόστηκαν σε ξηρά περιβάλλοντα, αποκρίθηκαν διαφορετικά (συρρίκνωση ή επέκταση της κατανομής τους) σε σχέση με αυτά που ήταν κατανεμημένα πιο βόρεια (και ήταν πιο ανθεκτικά στο κρύο) κατά την αλλαγή του κλίματος κατά την τεταρτογενή περίοδο. Δυστυχώς όμως, όπως και στην περίπτωση των παλαιογεωγραφικών δεδομένων, λείπουν και εδώ από τη βιβλιογραφία δεδομένα για το παλαιοκλίμα της περιοχής αυτής και έτσι δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα παρά μόνο σε υποθέσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ- ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η άποψη μου είναι ότι το κάθε συγκεκριμένο σώμα αγωνίζεται να κυριαρχίσει πάνω σε ολόκληρο το σύμπαν και να εξαπλώσει τη δύναμη του-τη βούληση του για δύναμη- αντιδρώντας σε οτιδήποτε αντιστέκεται στην επέκταση του

Friedrich Nietzsche

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1.1. Στοιχεία μορφομετρίας

Η σύγκριση των ανατομικών χαρακτηριστικών των οργανισμών αποτέλεσε για αιώνες βασικό σημείο έρευνας στην επιστήμη της βιολογίας. Η συστηματική κατάταξη των οργανισμών και η κατανόηση της ποικιλομορφίας της ζωής στηριζόταν στη μελέτη της μορφολογίας των οργανισμών *(Adams, Rohlf & Slice, 2004)*. Στις αρχές του 20ου αιώνα, ωστόσο, η επιστήμη της βιολογίας κάνει τη μεγάλη μετάβαση, από την «περιγραφή» στην «ποσοτικοποίηση» έτσι και η μελέτη της μορφολογίας μεταβαίνει στην εποχή της ποσοτικοποίησης *(Bookstein, 1998)*. Η ανάπτυξη στατιστικών μεθόδων όπως ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient) *(Pearson, 1895)*, η ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance) *(Fisher, 1935)* και η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) *(Hotelling, 1933; Pearson, 1901)* συνέβαλαν καθοριστικά στην κατεύθυνση αυτή. Η μορφομετρία είναι η μελέτη της ποικιλομορφίας στο σχήμα των οργανισμών και η συσχέτιση της με άλλες παραμέτρους *(Bookstein, 1991)*. Παραδοσιακά, η μορφομετρία χρησιμοποιεί πολυμεταβλητές στατιστικές δοκιμασίες προκειμένου να περιγράψει πρότυπα διαφοροποίησης στο σχήμα μεταξύ διαφόρων ομάδων οργανισμών. Συνήθως μετρώνται γραμμικές αποστάσεις μεταξύ σταθερών σημείων, αναλογίες και γωνίες. Με τον τρόπο αυτόν, είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί η συμμεταβολή στις μορφολογικές μεταβλητές και να διαπιστωθούν πρότυπα διακύμανσης εντός και μεταξύ των δειγμάτων. Οι στατιστικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται συχνά στη μελέτη της μορφολογίας είναι η ανάλυση κανονικών μεταβλητών (Canonical Variates Analysis, CVA), η ανάλυση διάκρισης (Discriminant Function Analysis, DA) και η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA). Στη μελέτη αυτή, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε μόνο η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (και για αυτό περιγράφεται αναλυτικά μόνο αυτή η μέθοδος, βλ. παράρτημα), καθώς η μελέτη εστιάζεται περισσότερο στην εξέλιξη της μορφολογικής ποικιλότητας και όχι απλά στην περιγραφή της. Κεντρικό ερώτημα του κεφαλαίου αυτού είναι να διαπιστωθεί αν η δημιουργία ειδών που έλαβε χώρα σε ένα μικρό χρονικό διάστημα και σε σχετικά μικρή γεωγραφική περιοχή (βλ. κεφάλαιο 2), συνοδεύτηκε από αντίστοιχη μορφολογική διαφοροποίηση. Επίσης επιχειρείται να διαπιστωθεί η σχέση αυτής της μορφολογικής διαφοροποίησης με χωρικές και κλιματικές μεταβλητές.

3.1.2. Τα χερσαία γαστερόποδα στη μελέτη της μορφολογίας

Τα χερσαία γαστερόποδα αποτελούν πολύ καλή ομάδα, για τη μελέτη της εξέλιξης της μορφολογικής ποικιλότητας επειδή διαθέτουν πολύ μεγάλη πολυμορφικότητα στο σχήμα, στο μέγεθος, στο χρώμα και στην επιφάνεια του κελύφους τους, τόσο σε δια-ειδικό όσο και σε ενδο-ειδικό επίπεδο *(Goodfriend, 1986; Stankowski, 2011; Suvorov, 2002)*. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, πολλές μελέτες προσπάθησαν να ρίξουν φώς στα οικολογικά αίτια που βρίσκονται πίσω από αυτή την τεράστια ποικιλομορφία αλλά και στις συνέπειες της. Έτσι, αποκαλύφθηκαν κάποια ενδιαφέροντα πρότυπα που σχετίζονται με την ποικιλομορφία του κελύφους, όπως για παράδειγμα, ότι σε πολλά είδη χερσαίων γαστεροπόδων το μέγεθος του κελύφους είναι ένας από τους παράγοντες που σχετίζεται ισχυρά με την έκταση της περιοχής εξάπλωσης *(Pfenninger, 2004)*. Πιο συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι τα είδη χερσαίων γαστεροπόδων με μεγαλύτερο κέλυφος, τείνουν να καταλαμβάνουν ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές εξ' αιτίας του ότι έχουν μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς ενώ ταυτόχρονα, μπορεί να μεταφέρονται και μέσω παθητικής μεταφοράς *(Pfenninger, 2004)*. Φυσικά, υπάρχει και ο αντίλογος που υποστηρίζει ότι τα μικρότερου μεγέθους είδη εξαπλώνονται λόγω της μεγαλύτερης παθητικής μεταφοράς τους. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η ποικιλομορφία στο κέλυφος σχετίζεται με τον ανταγωνισμό για το ενδιαίτημα *(Chiba, 1996)*, την ετερογένεια των πόρων *(Parent & Crespi, 2009a)* καθώς και τις κλιματικές συνθήκες όπως είναι η θερμοκρασία και η υγρασία *(Goodfriend, 1986)*. Παρά το ότι πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση της κελυφικής ποικιλότητας με χωρικές μεταβλητές και περιβαλλοντικούς παράγοντες *(Alonso και συν., 2006; Cameron, Cook & Gao, 1996; Chiba, 1996)*, μόνο λίγες από αυτές διερευνούν παράλληλα και τις εξελικτικές διαδικασίες που οδήγησαν στα παρατηρούμενα πρότυπα *(Hausdorf, 2003; Johnson, 2011; Jordaens και συν., 2009; Kappes και συν., 2009; Okajima & Chiba, 2011; Teshima και συν., 2003)*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σε πολλά είδη χερσαίων σαλιγκαριών, έχει βρεθεί ότι η κελυφική ποικιλότητα σχετίζεται με το ενδιαίτημα και το κλίμα της περιοχής, ωστόσο έχει υποστηριχθεί ότι και το γενετικό υπόβαθρο παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του προτύπου κελυφικής ποικιλότητας που παρατηρείται *(Burla, 1984)*. Για την υποστήριξη της σημασίας που έχει το γενετικό υπόβαθρο υπάρχει και μια εκτενής μελέτη που αφορά τα χερσαία σαλιγκάρια της βόρειο-δυτικής Ευρώπης και υποστηρίζει ότι το γεωγραφικό πρότυπο που καταγράφεται για το μέγεθος του κελύφους,-το μέγεθος του κελύφους μειώνεται με την αύξηση του γεωγραφικού πλάτους-δεν είναι αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενης και

ανεξάρτητης εξέλιξης μεταξύ του μεγέθους του σώματος και του γεωγρ. πλάτους αλλά αποτέλεσμα του ότι κάποια μικρού μεγέθους ζώα επικρατούν σε μια περιοχή και κάποια μεγαλύτερου μεγέθους ζώα επικρατούν σε μια άλλη *(Hausdorf, 2003)*.

Όπως υποστηρίζεται, εμπειρικά από τους Garland, Bennett και Rezende (2005), είναι αναμενόμενο ότι τα είδη που είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους τείνουν να μοιάζουν περισσότερο από ότι είδη που είναι φυλογενετικά πιο απομακρυσμένα μεταξύ τους. Αν αυτό το σκεπτικό εφαρμοστεί και στα χερσαία γαστερόποδα, αναμένεται ότι τα είδη που είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους θα μοιράζονται και περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά στο κέλυφος τους (π.χ. μέγεθος, σχήμα κ.ά.) σε σχέση με τα πιο απομακρυσμένα είδη. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις κατά τις οποίες ταχεία εξέλιξη (rapid evolution) στα διάφορα βιολογικά χαρακτηριστικά οδήγησε, αρκετά συγγενικά μεταξύ τους είδη να διαφέρουν πολύ μορφολογικά. Υπάρχουν δύο τύποι ακτινωτής διάσπασης (radiation) η προσαρμοστική και η μη προσαρμοστική. Κατά την προσαρμοστική διάσπαση παρατηρείται ότι είδη που είναι στενοί συγγενείς, αναπτύσσουν διαφορετικά χαρακτηριστικά (μορφολογικά ή/και φυσιολογικά) εξ' αιτίας της χρήσης διαφορετικών πόρων του οικοσυστήματος. Αντίθετα, η μη προσαρμοστική διάσπαση, οδηγεί σε διαφοροποίηση χωρίς να υπάρχει κάποια αντίστοιχη οικολογική εξειδίκευση (Schluter, 2006).

Επομένως, από τα όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα γίνεται σαφές ότι είναι ιδιαιτέρως σημαντικό κάθε φορά που διεξάγεται μία συγκριτική μελέτη να λαμβάνονται υπ' όψιν και οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που μελετώνται (βλ. επίσης κεφάλαιο πρώτο). Μόνο με αυτόν τον τρόπο μπορεί κανείς να αποφανθεί αν η παρατηρούμενη ποικιλότητα σε έναν ή περισσότερους χαρακτήρες είναι προσαρμογή ή απλά αποτέλεσμα του ότι τα είδη συνδέονται ιεραρχικά μεταξύ τους μέσω των φυλογενετικών τους σχέσεων (Garland *και συν.*, 2005). Επίσης, ιδιαιτέρως σημαντικό είναι να λαμβάνεται υπ' όψιν και το γεγονός ότι η ενδο-ειδική ποικιλότητα δεν μπορεί να θεωρείται αμελητέα, καθώς στην πραγματικότητα, η παρατηρούμενη ποικιλότητα σε οποιοδήποτε χαρακτήρα μπορεί να υποδιαιρεθεί σε ενδο-ειδική και δια-ειδική ποικιλότητα, και η συνεισφορά του κάθε μέρους στη διαμόρφωση της συνολικής ποικιλότητας είναι απαραίτητο να προσμετρείται κάθε φορά (Stevens, Pavoine & Baguette, 2010).

3.1.3. Στόχοι και ερωτήματα

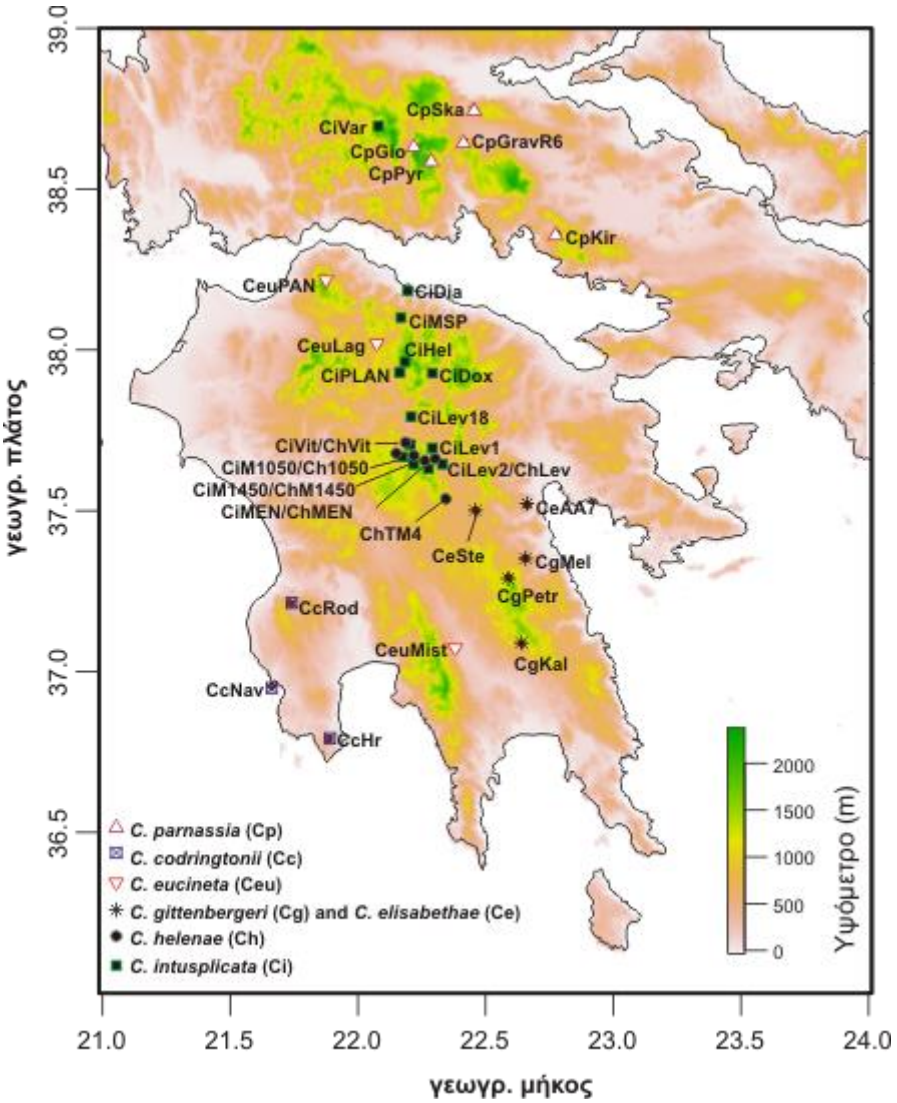
Σε αυτή τη μελέτη, γίνεται διερεύνηση του τρόπου εξέλιξης της μορφολογίας του κελύφους στο χώρο και στο χρόνο, μέσα σε ένα φυλογενετικό πλαίσιο. Το γένος *Codringtonia* προσφέρεται για μια τέτοια μελέτη καθώς μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και σε μικρή γεωγραφική περιοχή σχηματίστηκαν έξι φυλογενετικοί κλάδοι, που αντιστοιχούν σε επτά κατ' όνομα είδη (βλ. επίσης κεφάλαιο 2). Πιο συγκεκριμένα, τα ερωτήματα που τίθενται προς απάντηση είναι τα εξής:

i. Τα είδη *Codringtonia* καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις στο «μορφολογικό χώρο»;
ii. Πώς η ενδο-ειδική κελυφική ποικιλότητα επηρεάζει τη συνολική κελυφική ποικιλότητα που καταγράφεται στα είδη του γένους;
iii. Η παρατηρούμενη κελυφική ποικιλότητα σχετίζεται με χωρικές μεταβλητές ή με χαρακτηριστικά του κλίματος (σύγχρονο ή παρελθοντικό);
iv. Σε ποιο βαθμό οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών επηρεάζουν την κελυφική διαφοροποίηση των ειδών *Codringtonia*;

3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Πληθυσμοί της μελέτης

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν όλα τα κατ' όνομα είδη (Subai, 2005) του γένους *Codringtonia* (εξαιρείται το *C. neocrassa* για τους λόγους που αναφέρονται στα κεφάλαια 1 και 2) και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο επίπεδα, σε επίπεδο είδους και σε επίπεδο πληθυσμού. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 394 ενήλικα άτομα *Codringtonia* που αντιστοιχούν σε 35 πληθυσμούς (Πίνακας 3.1). Τα άτομα αυτά συλλέχθηκαν από το πεδίο σε σταθμούς δειγματοληψίας (Εικόνα 3.1) που καθορίστηκαν με βάση τα όσα αναφέρονται από τον Subai (2005). Τα άτομα στη συνέχεια ταξινομήθηκαν σε είδη με βάση χαρακτήρες του κελύφους και του αναπαραγωγικού συστήματος όπως ακριβώς περιγράφονται από τον προαναφερθέντα συγγραφέα. Ωστόσο, παρά τις εκτενείς δειγματοληψίες, για κάποια από τα είδη δεν ήταν δυνατό να συλλεχθεί επαρκής αριθμός ατόμων, σε αυτές τις περιπτώσεις προχωρήσαμε σε δανεισμό ατόμων *Codringtonia* από Ευρωπαϊκά μουσεία. Οι 19 από τους 35 πληθυσμούς (3 πληθυσμοί ανά είδος, με εξαίρεση το *C. intusplicata* για το οποίο χρησιμοποιήθηκαν 4 πληθυσμοί ανά είδος) αντιπροσωπεύονται και στο φυλογενετικό δέντρο του γένους *Codringtonia* (Kotsakiozi *και συν.*, 2012b) και ως εκ τούτου αυτοί οι πληθυσμοί (Πίνακας 3.1) χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις στις οποίες λαμβάνονται υπ' όψιν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών (των πληθυσμών στην προκειμένη περίπτωση), ενώ οι πληθυσμοί που δεν αντιπροσωπεύονται στο φυλογενετικό δέντρο χρησιμοποιήθηκαν μόνο στο πρώτο μέρος των αναλύσεων (κλασική στατιστική προσέγγιση).



Εικόνα 3.1. Οι σταθμοί δειγματοληψίας των πληθυσμών *Codringtonia* που περιλαμβάνονται στη μελέτη.

3.2.2. Μετρήσεις στο κέλυφος

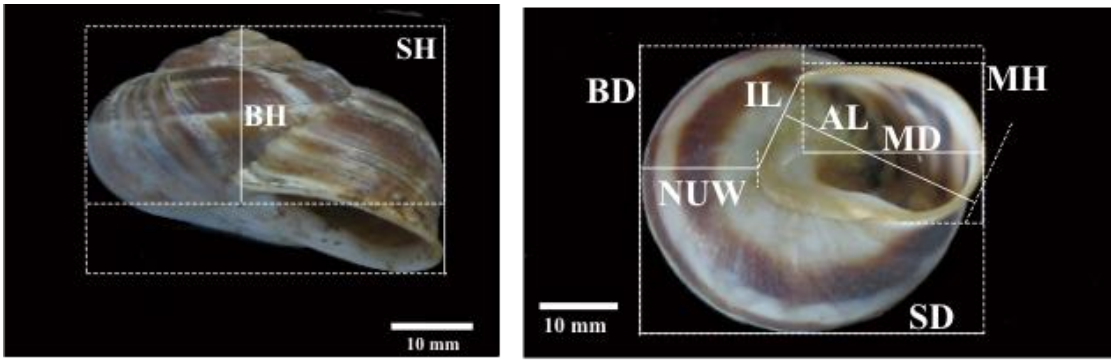
Όλα τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη τοποθετήθηκαν σε χιλιοστομετρικό χαρτί και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (η μηχανή ήταν τοποθετημένη σε τρίποδα και βρισκόταν κάθετα σε σχέση με το κέλυφος). Στη συνέχεια λήφθηκαν 9 μετρήσεις στο κέλυφος (Εικόνα 3.2) με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ (διαθέσιμο από τον ιστότοπο: http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html). Οι κελυφικές μετρήσεις επιλέχθηκαν με βάση τις μελέτες μορφολογίας κελύφους σε χερσαία σαλιγκάρια αυτής της μορφής (Fiorentino *και συν.*, 2013; Fiorentino *και συν.*, 2008; Teshima *και συν.*, 2003) και επιλέχθηκαν έτσι ώστε να εκφράζουν:

(i) **το μέγεθος και το σχήμα του σώματος** και αυτές περιλαμβάνουν, το ύψος του κελύφους (BH και SH), τη μεγάλη διάμετρο του κελύφους (SD), τη μικρή διάμετρο του κελύφους (BD) και τη διάμετρο χωρίς τον ομφαλό και το στόμα (NUW).

(ii) **το μέγεθος και το σχήμα του ανοίγματος** όπως αυτό ορίζεται από το ύψος του ανοίγματος (MH), το πλάτος του ανοίγματος (MD), το μήκος του εσωτερικού χείλους (IL) και το μέγιστο μήκος του ανοίγματος (AL).

(iii) επειδή οι παραπάνω μετρήσεις αποτελούν αποστάσεις μεταξύ σταθερών σημείων στο κέλυφος, **για μια καλύτερη εκτίμηση του σχήματος** του σώματος και του ανοίγματος, ανεξάρτητα από τις απόλυτες τιμές των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκαν, ο δείκτης σπειρών (spire index-SI) (SH/SD) και στο εξής θα αναφέρεται ως SH/SD και το πλάτος του ανοίγματος προς το ύψος του ανοίγματος (MD/MH) που θα αναφέρεται ως MD/MH.

Για όλες τις μετρήσεις που λήφθηκαν υπολογίστηκε ο λογάριθμος και αυτό το τροποποιημένο σύνολο δεδομένων τελικά χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις που ακολουθούν. Ο μετασχηματισμός αυτός κρίθηκε απαραίτητος αφενός για να πληρούνται οι προϋποθέσεις των παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών (κανονικότητα) και αφ' ετέρου για να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις της αλλομετρίας στο σύνολο των δεδομένων. Για τις δύο αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν (MD/MH και SH/SD) δεν πραγματοποιήθηκε λογαρίθμηση καθώς οι τιμές τους δεν αποκλίνουν σημαντικά από την κανονική κατανομή. Η χρήση των αναλογιών αυτών κρίθηκε απαραίτητη καθώς όπως αναφέρεται από τους Chiba και Kaustuv *(2011)* ο δείκτης σπειρών (SH/SD) παίζει σπουδαίο λειτουργικό ρόλο στην επιλογή του μικροενδιαιτήματος (βλ. 3.4. Συζήτηση).



Εικόνα 3.2. Οι 9 μετρήσεις που λήφθηκαν από τα κελύφη των ειδών *Codringtonia*. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τα σημεία όπου αρχίζει και τελειώνει η μέτρηση (συνεχείς γραμμές) για την κάθε μεταβλητή. Συντμήσεις: BH: ύψος κελύφους από την πρωτοκόγχη ως τον ομφαλό, SH: ύψος κελύφους από την πρωτοκόγχη ως κατώτερο σημείο, SD: μεγάλη διάμετρος του κελύφους, BD: μικρή διάμετρος του κελύφους, MH: ύψος στόματος, MD: πλάτος στόματος, NUW: διάμετρος χωρίς τον ομφαλό και το στόμα, IL: μήκος εσωτερικού χείλους, AL: μήκος ανοίγματος στο στόμα.

Πίνακας 3.1. Τα είδη και οι πληθυσμοί που περιλαμβάνονται στη μελέτη. Για τον κάθε σταθμό δειγματοληψίας παρέχεται πληροφορία για το υψόμετρο (ΥΨ), το γεωγρ. πλάτος (ΓΠ) και μήκος (ΓΜ). Για τον κάθε πληθυσμό φαίνεται ο μέσος όρος για την κάθε μέτρηση καθώς και ο αριθμός των ατόμων (N) που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις. Οι συντμήσεις στις μετρήσεις που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στην εικόνα 3.2. Οι πληθυσμοί εκείνοι που αντιπροσωπεύονται και στο φυλογενετικό δέντρο και χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις που λαμβάνεται υπ' όψιν η φυλογένεση υποδεικνύονται με αστερίσκο (*). Συντμήσεις: n/a: δεν είναι διαθέσιμο.

Είδος	Πληθυσμός	Κωδικός	N	ΥΨ	ΓΠ	ΓΜ	SD	BD	MH	MD	AL	IL	NUW	BH	SH	SH/SD	MD/MH
C. codringtonii																	
	Χρυσοκελαριά*	CcHr	7	343	36,98	21,93	4,59	3,83	2,19	2,44	2,63	1,50	1,51	2,33	3,07	0,67	1,12
	Ναυαρίνο*	CcNav	8	53	36,95	21,66	4,84	3,96	2,23	2,68	2,69	1,66	1,55	2,55	3,49	0,72	1,21
	Ροδιά*	CcRod	14	436	37,21	21,74	5,42	4,32	2,27	2,93	3,04	1,61	1,93	2,86	3,67	0,68	1,30
C. eucineta																	
	Λαγοβούνι*	CeuLag	36	774	38,01	22,07	4,47	3,60	1,85	2,32	2,45	1,18	1,55	2,02	2,64	0,59	1,27
	Μυστράς*	CeuMist	6	272	37,07	22,38	4,20	3,42	1,71	2,21	2,30	1,16	1,56	1,75	2,34	0,56	1,30
	Παναχαϊκό*	CeuPAN	5	1725	38,21	21,87	3,89	3,32	1,92	2,00	2,29	1,19	1,41	1,95	2,36	0,61	1,05
C. gittenbergeri_elisabethae																	
	Άγιος Πέτρος	CgPetr	4	1077	37,29	22,59	4,95	4,02	2,23	2,67	2,80	1,43	1,79	2,52	3,22	0,65	1,20
	Αχλαδόκαμπος*	CeAA7	10	292	37,52	22,66	5,06	4,07	2,07	2,72	2,85	1,43	1,74	2,36	3,05	0,60	1,32
	Καλλιθέα	CgKal	5	675	37,09	22,64	4,40	3,64	2,02	2,18	2,22	1,37	1,56	2,12	2,83	0,64	1,08

	Ορεινή Μελιγού*	CgMel	9	648	37,35	22,65	4,48	3,72	1,96	2,37	2,49	1,22	1,58	2,10	2,78	0,62	1,22
	Στενό*	CeSte	15	779	37,50	22,46	4,15	3,35	1,59	2,19	2,21	1,14	1,52	1,93	2,44	0,59	1,39
C. helenae																	
	Λεβίδι προς Βυτίνα	ChVit	4	850	37,70	22,20	4,74	3,79	1,79	2,50	2,54	1,18	1,74	2,10	2,65	0,56	1,40
	Μαίναλο 1050m	CheM1050	8	1053	37,66	22,19	4,64	3,65	1,99	2,47	2,33	1,20	1,70	1,85	2,47	0,54	1,28
	Μαίναλο 1450m	CheM1450	7	1455	37,66	22,22	4,65	3,72	2,11	2,31	2,42	1,27	1,70	2,01	2,67	0,58	1,12
	Μαίναλο 1633m*	ChMEN	27	1633	37,66	22,26	4,29	3,43	1,68	2,23	2,12	1,18	1,56	1,86	2,48	0,58	1,38
	Τρίπολη προς Λεβίδι 2km*	Ch_Lev	45	815	37,66	22,30	4,45	3,68	1,76	2,25	2,31	1,34	1,66	2,17	2,95	0,67	1,29
	Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km*	ChTM4	16	857	37,54	22,35	4,50	3,69	1,87	2,28	2,41	1,31	1,66	2,29	3,00	0,67	1,22
C. intusplicata																	
	Διακοπτό*	CiDia	17	54	38,18	22,19	3,69	3,00	1,50	1,92	1,88	0,90	1,36	1,61	2,10	0,57	1,30
	Διακοπτό-Καλάβρυτα*	CiMSP	14	963	38,10	22,17	3,84	3,09	1,40	2,05	1,93	0,95	1,44	1,56	2,09	0,54	1,47
	Χελμός	CiHel	4	1905	37,97	22,18	3,69	3,04	1,35	1,97	1,85	0,70	1,38	1,49	2,05	0,56	1,46
	Λίμνη Δόξα	CiDox	10	892	37,93	22,29	4,27	3,40	1,66	2,37	2,29	1,04	1,55	1,88	2,48	0,58	1,43
	Λεβίδι προς Βυτίνα	CiVit	7	850	37,70	22,20	4,65	3,73	1,64	2,58	2,36	1,18	1,75	2,00	2,71	0,58	1,58
	Λεβίδι (18 km before)	CiLev18	10	581	37,79	22,21	4,23	3,44	1,69	2,28	2,30	1,05	1,55	1,85	2,54	0,60	1,36

	Λεβίδι (1 km before)	CiLev1	8	842	37,69	22,29	4,27	3,51	1,58	2,21	2,16	1,17	1,58	1,89	2,47	0,58	1,41
	Μαίναλο 1050m	CiM1050	16	1053	37,66	22,19	4,45	3,55	1,65	2,29	2,16	1,09	1,62	1,81	2,39	0,54	1,43
	Μαίναλο 1450m	CiM1450	5	1455	37,66	22,22	4,53	3,58	1,59	2,30	2,24	1,15	1,68	1,86	2,55	0,56	1,45
	Μαίναλο 1633m*	CiMEN	3	1633	37,66	22,26	4,22	3,38	1,53	2,19	1,79	1,02	1,59	1,69	2,38	0,56	1,54
	Πλανητέρο*	CiPLAN	19	702	37,93	22,16	4,13	3,32	1,54	2,22	2,14	0,93	1,53	1,64	2,16	0,52	1,45
	Τρίπολη προς Λεβίδι 2 km	CiLev2	9	815	37,66	22,30	4,36	3,63	1,60	2,23	2,13	1,20	1,68	2,12	2,86	0,65	1,40
	Κόρακας (Βαρδούσια Όρη)	CiVar	5	n.a.	n.a.	n.a.	3,53	2,86	1,54	1,76	1,22	0,96	1,51	1,39	1,77	0,50	1,14
C. parnassia																	
	Γκιώνα FC11181	CpPyr	8	1558	38,58	22,28	4,22	3,41	1,80	2,25	2,32	1,29	1,50	2,16	2,61	0,62	1,25
	Γκιώνα FC11175*	CpGio	11	1415	38,63	22,22	3,38	2,83	1,30	1,76	1,65	1,06	1,25	1,80	2,28	0,67	1,35
	Γραβιά*	CpGravR	12	575	38,65	22,42	3,99	3,34	1,69	2,14	2,07	1,16	1,45	1,97	2,55	0,64	1,27
	Κιριάκι	CpKir	3	882	38,36	22,78	3,94	3,47	1,94	2,27	2,15	1,23	1,22	2,11	2,66	0,68	1,18
	Σκαμνός*	CpSka	7	872	38,75	22,45	3,77	3,12	1,56	1,97	2,01	1,06	1,37	1,89	2,48	0,66	1,27

3.2.3. Κλιματικά χαρακτηριστικά

Τα κλιματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν τις θέσεις δειγματοληψίας και αντλήθηκαν από τον ιστότοπο WorldClim (http://www.worldclim.org/; *(Hijmans και συν., 2005)*). Για τη μελέτη της επίδρασης του κλίματος χρησιμοποιήθηκαν οι δύο τύποι δεδομένων: (α) χαρακτηριστικά του σύγχρονου κλίματος (ανάλυση 30 arc-s) και (β) κλιματικά χαρακτηριστικά του παρελθόντος και συγκεκριμένα για το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου (Last Glacial Maximum-LGM, περίπου πριν από 21.000 χρόνια, ανάλυση 2.5 arc-min). Χρησιμοποιήθηκαν τα κλιματικά δεδομένα της περιόδου αυτής (ενώ διαθέσιμα ήταν και για 120.000 χρόνια πριν) καθώς από την προκαταρκτική ανάλυση που έγινε, οι κλιματικές συνθήκες 21.000 χρόνια πριν διαφέρουν από το σύγχρονο κλίμα. Οι κλιματικές συνθήκες κατά την τελευταία μεσοπαγετώδη περίοδο (περίπου 120.000 χρόνια πριν) ήταν παρόμοιες με αυτές του σύγχρονου κλίματος στη δυτική Μεσογειακή λεκάνη (Bardají *και συν.*, 2009) και για τον λόγο αυτό δεν λαμβάνονται υπ' όψιν στη μελέτη. Για την απόκτηση των κλιματικών δεδομένων που αφορούν την τελευταία παγετώδη περίοδο, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από δύο διαφορετικά μαθηματικά μοντέλα (http://www.worldclim.org/; (Hijmans *και συν.*, 2005)), το Community Climate System Model (CCSM) και το Model for Interdisciplinary Research on Climate (MIROC). Από τη βάση δεδομένων WorldClim αντλήθηκαν 19 κλιματικές μεταβλητές (Πίνακας 3.2). Επειδή τα κλιματικά δεδομένα σχετίζονται μεταξύ τους και αυτό επηρεάζει τις αναλύσεις που θα ακολουθήσουν, οπότε, προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός των συσχετιζόμενων κλιματικών χαρακτηριστικών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) πάνω στον πίνακα συσχετίσεων του Pearson για τις κλιματικές μεταβλητές. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χωριστά για καθένα από τα τρία σύνολα κλιματικών δεδομένων (σύγχρονο κλίμα και δύο (MIROC και CCSM) σύνολα δεδομένων για το παρελθοντικό κλίμα). Έτσι, οι 19 κλιματικές μεταβλητές που υπήρχαν αρχικά σε καθένα από τα τρία σύνολα δεδομένων μειώθηκαν σε τρεις σύνθετες μεταβλητές του κλίματος για το κάθε σύνολο δεδομένων (Πίνακας 3.3). Πιο αναλυτικά, από εδώ και στο εξής, θα αναφέρονται ως CC1, CC2 και CC3 οι μεταβλητές για το σύγχρονο κλίμα, LGM_M1, LGM_M2 και LGM_M3 οι τρεις μεταβλητές για το παρελθοντικό κλίμα από το μοντέλο MIROC και LGM_C1, LGM_C2 και LGM_C3 οι τρεις μεταβλητές του παρελθοντικού κλίματος από το μοντέλο CCSM. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τρεις σύνθετες μεταβλητές που προέκυψαν ερμηνεύουν συνολικά περισσότερο από το 97% της μεταβλητότητας των 19 αρχικών κλιματικών

μεταβλητών (Πίνακας 3.3). Έτσι αυτές οι τρεις συνιστώσες αντικατέστησαν τις 19 αρχικές κλιματικές μεταβλητές και στις αναλύσεις που θα ακολουθήσουν θα χρησιμοποιούνται αυτές οι σύνθετες κλιματικές μεταβλητές.

3.2.4. Μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών

Όλες οι μετρήσεις που λήφθηκαν (και οι δύο δείκτες) είναι σημαντικά σχετιζόμενες μεταξύ τους, και τον λόγο αυτόν πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) (βλ. παράρτημα για περισσότερες πληροφορίες της μεθόδου) πάνω στον πίνακα συσχετίσεων του Pearson (περιεχόταν οι μετασχηματισμένες μεταβλητές δηλαδή ο λογάριθμος των αρχικών μετρήσεων). Από την ανάλυση αυτή (PCA) επιλέχθηκαν οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1, PC2, PC3) σαν σύνθετες εκφράσεις της μορφολογίας του κελύφους και από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως SH1, SH2 και SH3 και χρησιμοποιηθούν στις αναλύσεις που θα ακολουθήσουν.

Από την PCA γενικά μπορεί να γίνει εμφανής κάποιος διαχωρισμός (ή και μη διαχωρισμός) μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων αλλά αυτό είναι οπτικό (και επομένως υποκειμενικό), προκειμένου λοιπόν να αξιολογηθεί η ύπαρξη ή μη, πραγματικού διαχωρισμού μεταξύ των ειδών με βάση τη συνολική μορφολογία του κελύφους, πραγματοποιήθηκε μια μη παραμετρική πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (non-parametric permutational multivariate analysis of variance, PerMANOVA *(Anderson, 2006)*), χρησιμοποιώντας τις τιμές (scores) που προέκυψαν για τους τρεις πρώτους άξονες της PCA σαν εξαρτημένες μεταβλητές και τα είδη σαν ανεξάρτητες μεταβλητές. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις (PerMANOVA) τόσο για όλους μαζί τους άξονες (SH1, SH2 και SH3) όσο και για τον καθένα χωριστά. Η ανάλυση PerMANOVA επιλέχθηκε γιατί δεν βασίζεται σε αυστηρές παραδοχές που είναι δύσκολο να πληρούνται όταν εξετάζονται δείγματα διαφορετικού μεγέθους. Η PerMANOVA είναι παρόμοια με την κλασική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), μόνο που αυτή μπορεί να χρησιμοποιήσει οποιοδήποτε μέτρο εκτίμησης της απόστασης ανάμεσα στα δείγματα για να υπολογίσει το άθροισμα των τετραγώνων *(Anderson, 2006)*. Στην ανάλυση αυτή δημιουργείται μια κατανομή των τιμών «ψευδό-F», η οποία προκύπτει με τυχαία αναδιάταξη μεταξύ των ειδών (γενικά των blocks) των πραγματικών δεδομένων (μετρήσεων).

Πίνακας 3.2. Οι 19 κλιματικές μεταβλητές (μέγιστο και ελάχιστο για την καθεμία) για το σύγχρονο και το παρελθοντικό κλίμα (μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου) που αντλήθηκαν από τον ιστότοπο WorldClim (http://www.worldclim.org/). Τα δεδομένα για το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου προέκυψαν από δύο μοντέλα το Community Climate System Model (CCSM) και το Model for Interdisciplinary Research on Climate (MIROC).

Κλιματικά χαρακτηριστικά	Σύγχρονο κλίμα		LGM (MIROC)		LGM (CCSM)	
	min	max	min	max	min	max
BIO1 = Μέση ετήσια θερμοκρασία	7,6	16,6	3,3	15,0	3,4	14,8
BIO2 = Μέσο ημερήσιο θερμοκρασιακό εύρος (μέση μηνιαία (μέγιστη - ελάχιστη θερμοκρασία))	7,9	11,2	7,1	11,0	6,6	11,9
BIO3 = Ισοθερμικότητα (BIO2/BIO7) (* 100)	3,5	3,9	3,4	3,9	3,3	4,0
BIO4 = εποχικότητα θερμοκρασίας (SD *100)	514,9	666,1	499,7	670,6	498,5	672,9
BIO5 = Μέγιστη θερμοκρασία θερμότερου μήνα	23,5	31,7	19,0	28,8	19,2	29,8
BIO6 = ελάχιστη θερμοκρασία ψυχρότερου μήνα	-4,1	6,1	-8,1	5,5	-8,2	5,5
BIO7 = εύρος ετήσιας θερμοκρασίας (BIO5-BIO6)	21,9	29,8	20,5	29,8	20,0	31,1
BIO8 = Μέση θερμοκρασία υγρότερου τριμήνου	1,6	11,4	-2,5	10,4	-2,4	10,2
BIO9 = Μέση θερμοκρασία ξηρότερου τριμήνου	15,7	24,3	11,1	21,2	11,2	21,0
BIO10 = Μέση θερμοκρασία θερμότερου τριμήνου	15,7	24,3	11,4	21,6	11,4	21,3
BIO11 = Μέση θερμοκρασία ψυχρότερου τριμήνου	0	9,8	-4,1	9,0	-4,0	8,7
BIO12 = ετήσιες κατακρημνίσεις	671	1012	854,0	119,0	393,0	662,0
BIO13 = κατακρημνίσεις υγρότερου μήνα	119	159	143,0	188,0	75,0	102,0
BIO14 = κατακρημνίσεις ξηρότερου μήνα	5	24	2,0	29,0	1,0	17,0
BIO15 = εποχικότητα κατακρημνίσεων (συντελεστής μεταβλητότητας, Coefficient of Variation)	48	76	48,0	79,0	48,0	80,0
BIO16 = κατακρημνίσεις υγρότερου τριμήνου	313	434	363,0	515,0	201,0	279,0
BIO17 = κατακρημνίσεις ξηρότερου τριμήνου	20	92	14,0	109,0	6,0	64,0
BIO18 = κατακρημνίσεις θερμότερου τριμήνου	24	94	28,0	117,0	12,0	68,0
BIO19 = κατακρημνίσεις ψυχρότερου τριμήνου	299	423	33,0	150,0	34,0	148,0

Πίνακας 3.3. Οι τιμές βαρύτητας (loading) για κάθε μια κλιματική μεταβλητή σε κάθε έναν από τους τρεις πρώτους άξονες της ανάλυσης PCA για το σύγχρονο κλίμα (CC1, CC2 και CC3) καθώς και του μεγίστου της τελευταίας παγετώδους περιόδου (LGM) όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο Community Climate System Model (LGM_C1, LGM_C2, LGM_C3) και το μοντέλο Model for Interdisciplinary Research on Climate (LGM_M1, LGM_M2, LGM_M3)). Το ποσοστό της ποικιλότητας που ερμηνεύεται από τον κάθε άξονα δίνεται σε παρένθεση. Με έντονους χαρακτήρες υποδεικνύονται οι τιμές βαρύτητας που είναι μεγαλύτερες από 0,5.

	CC1 (65,85%)	CC2 (24,49%)	CC3 (7,65%)	LGM_M1 (66,76%)	LGM_M2 (22,49%)	LGM_M3 (9,34%)	LGM_C1 (71,46%)	LGM_C2 (20,41%)	LGM_C3 (5,28%)
BIO1	**0,99**	0,07	0,02	**0,99**	0,14	0,04	**0,94**	-0,28	-0,18
BIO2	-0,13	**0,78**	**-0,61**	-0,35	**0,72**	**-0,59**	-0,45	**-0,86**	0,25
BIO3	**0,61**	0,07	**-0,77**	0,16	0,21	**-0,95**	-0,04	**-0,79**	**0,55**
BIO4	**-0,62**	**0,77**	-0,01	**-0,63**	**0,75**	0,04	**-0,71**	**-0,66**	-0,08
BIO5	**0,88**	0,44	-0,11	**0,82**	**0,55**	-0,09	**0,66**	**-0,74**	-0,11
BIO6	**0,98**	-0,14	0,07	**0,99**	-0,09	0,08	**0,98**	0,01	-0,15
BIO7	-0,45	**0,85**	-0,26	**-0,55**	**0,80**	-0,24	**-0,60**	**-0,79**	0,08
BIO8	**0,99**	-0,06	0,02	**1,00**	-0,04	0,01	**0,98**	-0,11	-0,11
BIO9	**0,97**	0,19	-0,02	**0,96**	0,27	0,01	**0,89**	-0,42	-0,16
BIO10	**0,97**	0,22	0,01	**0,95**	0,28	0,06	**0,88**	-0,42	-0,21
BIO11	**0,99**	-0,05	0,02	**1,00**	0,00	0,03	**0,97**	-0,15	-0,14
BIO12	**-0,90**	-0,40	-0,09	**-0,91**	-0,38	-0,06	**-0,96**	-0,05	-0,20
BIO13	-0,42	**-0,85**	-0,27	-0,44	**-0,80**	-0,37	**-0,93**	0,07	-0,03
BIO14	**-0,97**	0,21	0,02	**-0,98**	0,18	0,09	**-0,97**	-0,10	-0,17
BIO15	**0,74**	**-0,63**	-0,14	**0,77**	**-0,59**	-0,22	**0,83**	0,48	0,27
BIO16	-0,47	**-0,85**	-0,22	-0,44	**-0,84**	-0,29	**-0,92**	0,21	-0,01
BIO17	**-0,94**	0,32	0,04	**-0,94**	0,30	0,13	**-0,93**	-0,25	-0,27
BIO18	**-0,92**	0,19	0,22	**-0,88**	0,17	0,37	**-0,87**	-0,15	-0,46
BIO19	**-0,72**	-0,49	-0,43	**0,99**	0,14	0,04	**0,94**	-0,28	-0,18

Από την ανάλυση PerMANOVA προκύπτουν κάποιες τιμές «ψευδό-F», οι τιμές αυτές συγκρίνονται με το άνω άκρο (upper tail) της κατανομής των τυχαίων τιμών που περιγράφηκε προηγουμένως. Αν η παρατηρούμενη τιμή ψευδό-F είναι μεγαλύτερη από τις τιμές που αντιστοιχούν στο 5% της κατανομής των τιμών ψευδό-F, τότε η μηδενική υπόθεση (null hypotheses, H_0) απορρίπτεται. Στη συγκεκριμένη ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν οι Ευκλείδειες αποστάσεις και υπολογίστηκαν οι τιμές p (p-values) πραγματοποιώντας 10.000 επαναλήψεις. Αν το αποτέλεσμα της PerMANOVA είναι στατιστικά σημαντικό, τότε πραγματοποιείται μετά-ανάλυση (post hoc έλεγχος κατά ζεύγη) ώστε να διαπιστωθεί ποια ακριβώς είδη είναι αυτά που διαφέρουν μεταξύ τους. Στις αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκε η διόρθωση που προτείνεται από τον Holm *(1979)* για να αποφευχθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, κάτι που μπορεί να συμβεί στους επαναλαμβανόμενους κατά ζεύγη ελέγχους.

3.2.5. Αναλύσεις λαμβάνοντας υπ' όψιν τη φυλογένεση

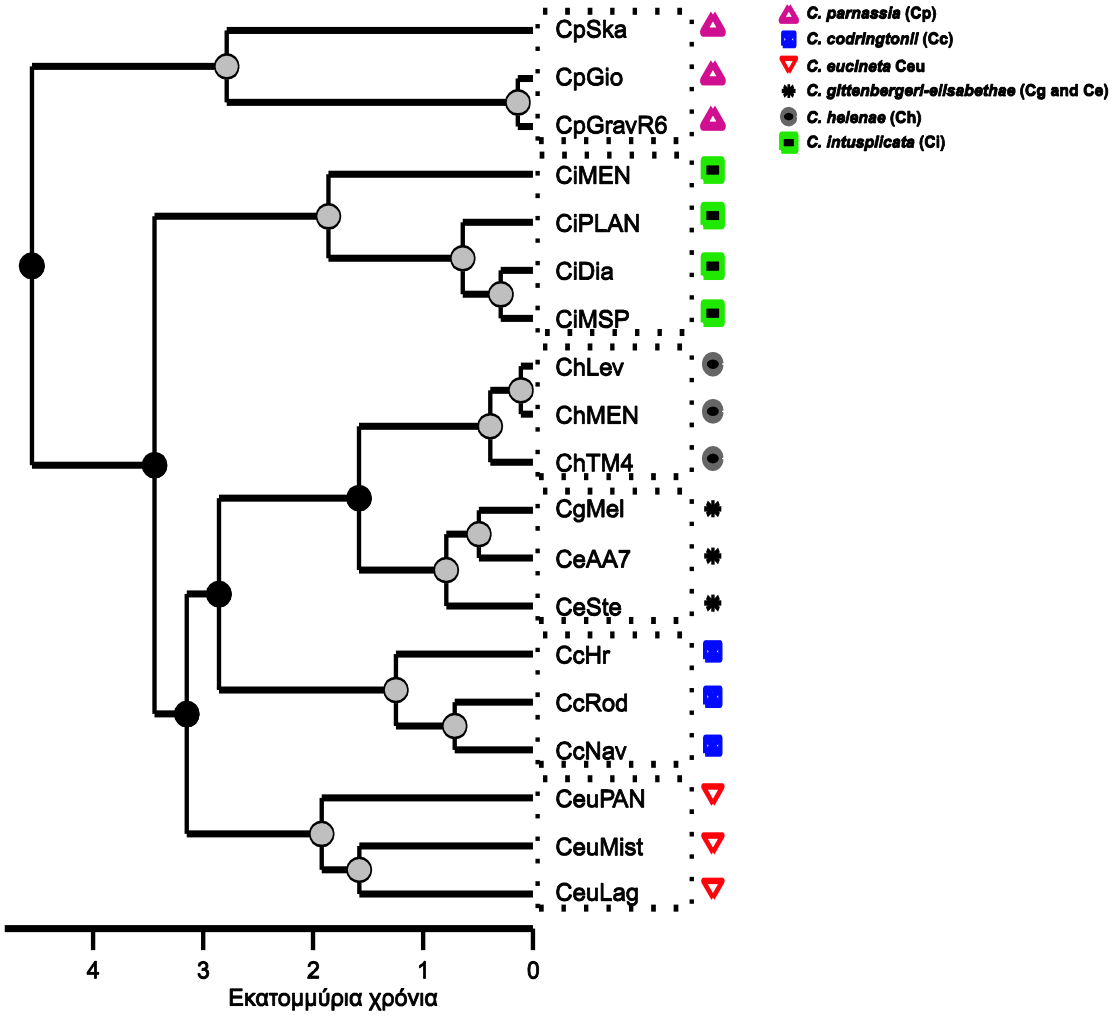
Σε αυτή την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το χρονολογημένο φυλογενετικό δέντρο του γένους *Codringtonia* (Kotsakiozi *και συν.*, 2012b), αφού πρώτα αφαιρέθηκαν οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε πληθυσμούς για τους οποίους δεν υπήρχαν μορφολογικά δεδομένα. Τελικά, στο μέρος αυτό χρησιμοποιήθηκαν 19 πληθυσμοί με 5-45 άτομα ο καθένας (Πίνακας 3.3 και Εικόνα 3.3).

3.2.5.1. Δια-ειδική και ενδο-ειδική κελυφική ποικιλότητα

Η συνολική μορφολογική ποικιλότητα στο κέλυφος είναι αποτέλεσμα δύο παραγόντων: της ποικιλότητας μεταξύ των ειδών και της ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών του ίδιου είδους. Για να εκτιμηθεί η συμμετοχή του καθενός από τους δύο αυτούς παράγοντες στη συνολική κελυφική ποικιλότητα δεν θα μπορούσε να εφαρμοστεί κάποια στατιστική δοκιμασία όπως είναι η ANOVA με εγκιβωτισμένο (nested) σχεδιασμό (βλ. (Ricklefs, 2012)) γιατί το σύνολο των δεδομένων αυτής της μελέτης δεν είναι εξισορροπημένο σε επίπεδο πληθυσμού π.χ. δεν υπάρχει ο ίδιος αριθμός πληθυσμών ανά είδος καθώς επίσης διαφέρει κατά πολύ και ο αριθμός των ατόμων ανά πληθυσμό. Για τους λόγους αυτούς εφαρμόστηκε μια στατιστική δοκιμασία που προτάθηκε από τους Stevens *και συν.* (2010) και στην οποία η κελυφική ποικιλότητα υποδιαιρείται (partition) κατά μήκος του φυλογενετικού δέντρου μετρώντας τη σχετική συνεισφορά των ενδο-ειδικών κόμβων (κόμβος του φυλογενετικού δέντρου από τον οποίο προκύπτουν διαφορετικοί πληθυσμοί του ίδιου

είδους και υποδεικνύονται με γκρι χρώμα στην Εικόνα 3.3) και των δια-ειδικών κόμβων (κόμβος του φυλογενετικού δέντρου από τον οποίο προκύπτουν διαφορετικά είδη και υποδεικνύονται με μαύρο χρώμα στην Εικόνα 3.3), στη συνολική κελυφική ποικιλότητα. Γίνεται σαφές ότι οι δια-ειδικοί κόμβοι βρίσκονται πιο βαθιά στο φυλογενετικό δέντρο ενώ οι ενδο-ειδικοί κόμβοι βρίσκονται προς τα άκρα του φυλογενετικού δέντρου (Εικόνα 3.3) καθώς συνήθως σχετίζονται με πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα. Η συνεισφορά ενός εσωτερικού κόμβου στην παρατηρούμενη ποικιλότητα ενός χαρακτήρα είναι ίση με την ποικιλότητα που παρατηρείται μεταξύ των κλάδων που προκύπτουν από αυτόν τον κόμβο επί το ποσοστό (ή την αναλογία) των ειδών που συνδέονται με αυτόν τον κόμβο. Για να μετρηθεί η συνολική κελυφική ποικιλότητα αλλά και συνεισφορά των ενδο-ειδικων και των δια-ειδικών κόμβων χρησιμοποιήθηκε η τετραγωνική εντροπία του Rao (Rao' s quadratic entropy, QE) ((Rao, 1982), βλ. επίσης (Stevens *και συν.*, 2010)). Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος για την κάθε μεταβλητή και τον κάθε πληθυσμό. Αρχικά εφαρμόστηκε η μεθοδολογία που προτείνεται από τη Stevens *και συν.* (2010), με την οποία η συνεισφορά του κάθε κόμβου στην κελυφική ποικιλότητα παρέχει και μια γραφική απεικόνιση της ποικιλότητας που παρατηρείται στα διάφορα επίπεδα (π.χ. επίπεδο είδους, επίπεδο πληθυσμού κλπ) κατά μήκος τους φυλογενετικού δέντρου. Στη συνέχεια, στόχος ήταν να ελεγχθεί η συνεισφορά των πληθυσμών στη συνολική κελυφική ποικιλότητα. Για να γίνει αυτό, αρχικά αθροίστηκε η ποικιλότητα που σχετίζεται με τους δια-ειδικούς κόμβους για όλα τα είδη (π.χ. η παρατηρούμενη δια-ειδική ποικιλότητα). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τυχαίες αναδιατάξεις (προσομοιώσεις) των παρατηρούμενων τιμών για τον κάθε ένα υπό μελέτη χαρακτήρα μεταξύ των άκρων του φυλογενετικού δέντρου (αυτό σημαίνει ότι οι τιμές για αυτόν τον χαρακτήρα που μελετάται αλλάζουν εντελώς τυχαία μεταξύ των ειδών και όχι ακολουθώντας κάποιο πρότυπο). Η μηδενική υπόθεση αυτής της δοκιμασίας είναι ότι η **ποικιλότητα** που παρατηρείται για ένα χαρακτήρα **μεταξύ των ειδών** που προέκυψαν από ένα κόμβο (δια-ειδικός κόμβος) είναι **ίση με την ποικιλότητα** που παρατηρείται για τον χαρακτήρα αυτόν **μεταξύ των πληθυσμών** που προέκυψαν από ένα κόμβο (ενδο-ειδικός κόμβος). Οι τυχαίες αναδιατάξεις, για τις οποίες έγινε λόγος παραπάνω, επαναλήφθηκαν 1.000 φορές. Για κάθε αναδιάταξη, υπολογιζόταν εκ νέου η ενδο-ειδική ποικιλότητα και στη συνέχεια συγκρινόταν η παρατηρούμενη (δηλαδή η πραγματική) ενδο-ειδική ποικιλότητα με τις τιμές της ενδο-ειδικής ποικιλότητας που προέκυπταν από τις αναδιατάξεις (από τις προσομοιώσεις). Αν λιγότερο από το 5% των τιμών που

προέκυπταν από τις προσομοιώσεις ήταν χαμηλότερο ή ίσο με την παρατηρούμενη τιμή τότε αυτό σημαίνει ότι η ενδο-ειδική ποικιλότητα είναι χαμηλότερη από αυτό που αναμένεται αν ήταν εντελώς τυχαία. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για καθεμία από τις σύνθετες μεταβλητές SH1, SH2 και SH3 ανεξάρτητα και για όλες μαζί συνολικά, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν όλες οι «διαστάσεις» της κελυφικής ποικιλότητας μεταβάλλονται εξίσου κατά μήκος της φυλογένεσης. Για αυτή τη συγκεκριμένη ανάλυση, επειδή η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε δεν λαμβάνει υπ' όψιν τα μήκη των κλάδων παρά μόνο την τοπολογία του δέντρου (Stevens *και συν.*, 2010), χρησιμοποιήθηκαν και οι 35 πληθυσμοί για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα τα κελυφικά χαρακτηριστικά τους. Σχεδιάστηκε δηλαδή, ένα μεγαλύτερο φυλογενετικό δέντρο τοποθετώντας τεχνητά τον κάθε επιπλέον πληθυσμό στον κλάδο του είδους στον οποίο ανήκει (στο πρωτότυπο φυλογενετικό δέντρο υπάρχουν μόνο 19 από τους 35 πληθυσμούς, οι οποίοι ωστόσο αντιπροσωπεύουν όλα τα είδη).



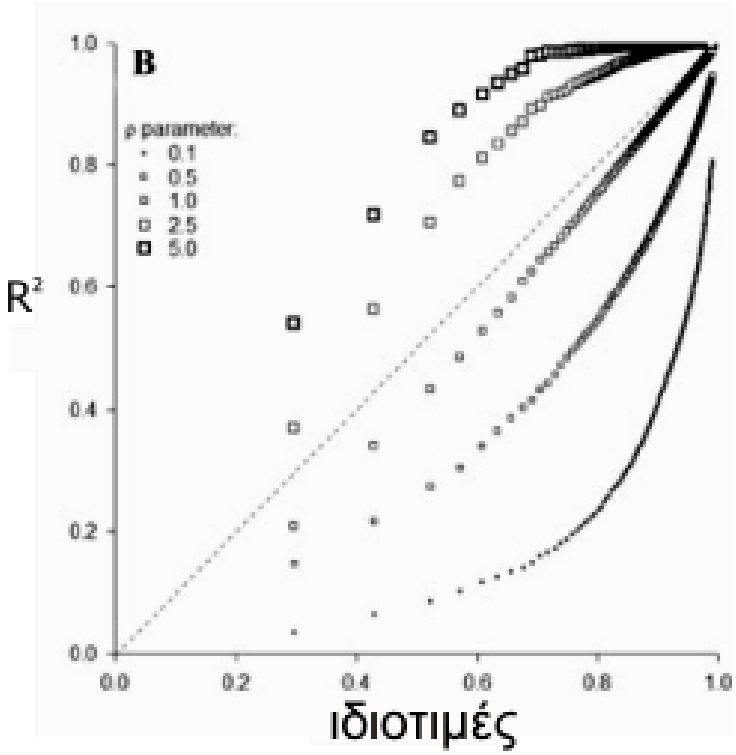
Εικόνα 3.3. Το χρονολογημένο φυλογενετικό δέντρο των ειδών του γένους *Codringtonia* στο οποίο απεικονίζονται οι 19 πληθυσμοί για τους οποίους υπάρχουν τόσο μορφολογικά δεδομένα του κελύφους όσο και μοριακά δεδομένα με βάση τα οποία κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο. Οι 19 πληθυσμοί αντιστοιχούν σε 6 κλάδους (ή είδη) τα οποία δηλώνονται με διαφορετικά χρώματα στα άκρα του δέντρου. Επίσης διακρίνονται με μαύρο χρωματισμό οι δια-ειδικοί κόμβοι από τους οποίους προκύπτουν τα διαφορετικά είδη και με γκρι χρωματισμό οι ενδο-ειδικοί κόμβοι οι οποίοι σχετίζονται με πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα και από τους οποίους προκύπτουν οι διαφορετικοί πληθυσμοί. Οι κωδικοί στα άκρα του δέντρου αντιστοιχούν στον Πίνακα 3.1.

3.2.5.2. Έλεγχος για την ύπαρξη φυλογενετικού σήματος και πρότυπα διαφοροποίησης των χαρακτήρων

Για τον προσδιορισμό της ύπαρξης καθώς και της ποσοτικοποίησης του φυλογενετικού σήματος για καθεμία από τις σύνθετες μεταβλητές SH1, SH2 και SH3 υπολογίστηκε η παράμετρος K σύμφωνα με όσα αναφέρονται από τους Blomberg *και συν.* (2003). Η παράμετρος αυτή ουσιαστικά συγκρίνει τα παρατηρούμενα με τα αναμενόμενα επίπεδα φυλογενετικού σήματος για μια συνεχή μεταβλητή, υποθέτοντας ότι τα χαρακτηριστικά που εξετάζονται εξελίσσονται ακολουθώντας το μοντέλο της κίνησης Brown (Brownian mode of evolution). Αν η τιμή K είναι

μεγαλύτερη από τη μονάδα τότε τα είδη (γενικά οι ομάδες που συγκρίνονται π.χ. είδη, πληθυσμοί κλπ) που είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους, έχουν και μεγαλύτερες ομοιότητες στον χαρακτήρα που εξετάζεται από ότι αναμένεται με βάση την εξέλιξη κάτω από το μοντέλο της κίνησης κατά Brown. Αντίθετα αν η τιμή του K είναι μικρότερη από τη μονάδα τότε τα είδη που είναι πιο συγγενικά, είναι λιγότερο όμοια μεταξύ τους από ότι αναμένεται. Για τον υπολογισμό της τιμής K χρησιμοποιείται η μέση τιμή για κάθε χαρακτήρα-μεταβλητή για κάθε έναν πληθυσμό. Επίσης εφαρμόστηκε η διαδικασία τυχαιοποίησης (randomization procedure) όπως προτάθηκε από τους Blomberg *και συν.* (2003) για να διαπιστωθεί εάν οι μεταβλητές που μετρήθηκαν δείχνουν κάποια στατιστικά σημαντική τάση να είναι πιο όμοιες στα συγγενικά είδη/πληθυσμούς. Τέλος, η εκτίμηση της τιμής K έγινε λαμβάνοντας υπ' όψιν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται από τον Ives *και συν.* (2007) και αυτό γιατί μερικές φορές η ενδο-πληθυσμιακή ποικιλότητα σε έναν χαρακτήρα επηρεάζει τις αναλύσεις που εξετάζουν τη φυλογενετική εξάρτηση (Hardy & Pavoine, 2012). Για να είναι πιο ολοκληρωμένες, και να υπάρχει μια πιο σφαιρική άποψη για τις αναλύσεις που αφορούν το «φυλογενετικό σήμα», εφαρμόστηκε επίσης η προσέγγιση της αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (phylogenetic signal-representation, PSR) που προτάθηκε από τον Diniz-Filho *και συν.* (2012). Η νέα αυτή μέθοδος προέρχεται από μία παλαιότερα δημοσιευμένη μέθοδο του Diniz-Filho *και συν.* (1998) που ονομάζεται ανάλυση παλινδρόμησης φυλογενετικών ιδιοδιανυσμάτων (Phylogenetic Eigenvector Regression, PVR). Στη μέθοδο αυτή, αρχικά κατασκευάζεται ένας πίνακας φυλογενετικών αποστάσεων και από αυτόν τον πίνακα εξάγονται τα ιδιοδιανύσματα (eigenvectors). Στη συνέχεια τα ιδιοδιανύσματα αυτά χρησιμοποιούνται για να εκτιμηθεί η δια-ειδική ποικιλότητα. Όπως είναι γνωστό, τα ιδιοδιανύσματα σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 90° (είναι δηλαδή ορθογώνια), έτσι το καθένα απεικονίζει ένα συγκεκριμένο μέρος των εξελικτικών σχέσεων των γενεαλογικών γραμμών που μελετώνται. Για παράδειγμα, τα πρώτα ιδιοδιανύσματα, που είναι αυτά που έχουν και τις μεγαλύτερες ιδιοτιμές (eigenvalues), αντιπροσωπεύουν τις μεγάλες φυλογενετικές αποστάσεις (συνήθως αντιπροσωπεύουν την απόσταση των κυρίων κλάδων του φυλογενετικού δέντρου, που βρίσκονται πιο κοντά στη ρίζα του). Σταδιακά, τα επόμενα ιδιοδιανύσματα, θα έχουν ολοένα και μικρότερες ιδιοτιμές, και θα σχετίζονται με ολοένα και πιο μικρές φυλογενετικές αποστάσεις (για παράδειγμα τις πιο πρόσφατες διαφοροποιήσεις όπως είναι αυτές σε επίπεδο πληθυσμών). Στη μέθοδο της αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (PSR), τα ιδιοδιανύσματα (τα

οποία θα μπορούσαν να θεωρηθούν, κατά μία έννοια, εκτίμηση των φυλογενετικών αποστάσεων) προστίθενται το ένα μετά το άλλο σε μια σειρά από γραμμικά μοντέλα και υπολογίζεται η τιμή R^2 για καθένα από αυτά.



Εικόνα 3.4. Παράδειγμα της μορφής που έχει η γραφική παράσταση που προκύπτει από την ανάλυση PSR. Η στικτή γραμμή αντιπροσωπεύει την εξέλιξη σύμφωνα με το μοντέλο της κίνησης Brown. Γραφικές παραστάσεις που βρίσκονται κάτω από τη στικτή γραμμή υποδεικνύουν ότι το μεγαλύτερο μέρος της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας διαμορφώθηκε στα πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα. Αντίθετα γραφικές παραστάσεις που βρίσκονται πάνω από τη στικτή γραμμή υποδεικνύουν ότι το μεγαλύτερο μέρος της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας διαμορφώθηκε στα αρχικά κλαδογενετικά συμβάντα. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Diniz-Filho *και συν.* (1998).

Στη συνέχεια, κατασκευάζεται μία γραφική παράσταση (όπως αυτή της Εικόνας 4), στον οριζόντιο άξονα της οποίας βρίσκονται οι ιδιοτιμές των ιδιοδιανυσμάτων και στον κατακόρυφο άξονα οι τιμές R^2 που αντιστοιχούν σε καθένα ιδιοδιάνυσμα.

Ο Diniz-Filho *και συν.* (2012) χρησιμοποιώντας τόσο εμπειρικά δεδομένα όσο και προσομοιώσεις, έδειξαν ότι αν δεχτεί κανείς ότι η εξέλιξη ενός χαρακτήρα ακολουθεί το μοντέλο της κίνησης Brown τότε αναμένεται να υπάρχει γραμμική σχέση στην παραπάνω γραφική παράσταση. Αν όμως η γραφική παράσταση (η καμπύλη) που σχηματίζεται βρίσκεται πάνω από τη γραμμή που αναμένεται με βάση το μοντέλο της κίνησης Brown (στικτή γραμμή στην εικόνα 3.4) τότε αυτό δείχνει ότι η διαδικασία έλαβε χώρα στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των υπό μελέτη ομάδων (π.χ. των ειδών), με άλλα λόγια μια γραφική παράσταση πάνω από τη στικτή

γραμμή σημαίνει ότι οι πρώτοι (οι πιο παλιοί) κλάδοι του φυλογενετικού δέντρου τείνουν να διαφέρουν περισσότερο μεταξύ τους από ότι αναμένεται με βάση τη φυλογένεση τους. Με αντίστοιχο σκεπτικό, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι μια γραφική παράσταση που βρίσκεται κάτω από τη στικτή γραμμή δείχνει πρόσφατο πρότυπο διαφοροποίησης, δηλαδή οι κλάδοι τείνουν να διαφοροποιούνται έντονα ο ένας από τον άλλο προς τα άκρα του φυλογενετικού δέντρου (πρόσφατη διαφοροποίηση). Σαν μέτρο της απόκλισης από αυτό που αναμένεται με βάση την κίνηση Brown, οι συγγραφείς προτείνουν να χρησιμοποιείται η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve, από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως AUC) που οριοθετείται από τη στικτή γραμμή των 45° και τις αθροιστικές τιμές του R^2. Έτσι, αρνητικές τιμές AUC, σχετίζονται με χαρακτηριστικά που εξελίσσονται πιο αργά από ότι αναμένεται ενώ οι θετικές τιμές δείχνουν ότι τα χαρακτηριστικά εξελίσσονται πιο γρήγορα από ότι αναμένεται με βάση το μοντέλο της κίνησης Brown. Επίσης, οι συγγραφείς έδειξαν ότι οι τιμές AUC που προκύπτουν από τα γραφήματα PSR (Εικόνα 4) σχετίζονται ισχυρά με τις τιμές K από τη δοκιμασία Blomberg, που περιγράφηκε παραπάνω. Το πλεονέκτημα της μεθόδου PSR (Diniz Filho *και συν.*, 2012) βρίσκεται καθαρά στον τρόπο απεικόνισης των αποτελεσμάτων. Η μέθοδος PSR παράγει γραφήματα με τα οποία οπτικοποιούνται καλύτερα οι όποιες αποκλίσεις από το μοντέλο της κίνησης Brown και φαίνεται με πολύ άμεσο τρόπο το αν ο ρυθμός εξέλιξης ενός χαρακτήρα είναι πιο γρήγορος ή πιο αργός από ότι αναμένεται κατά μήκος της φυλογένεσης. Με τον τρόπο αυτό, είναι πολύ πιο εύκολο να προσδιοριστεί το πρότυπο διαφοροποίησης του υπό μελέτη χαρακτήρα. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία του Diniz-Filho *και συν.* (2012) και οι τιμές AUC που λήφθηκαν από τη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δύο υποθέσεων: (α) αν η εξέλιξη του υπό μελέτη χαρακτήρα αποκλίνει σημαντικά από αυτό που αναμένεται με βάση το μοντέλο της κίνησης Brown και (β) αν η εξέλιξη του υπό μελέτη χαρακτήρα αποκλίνει σημαντικά από αυτό που αναμένεται με βάση το μηδενικό μοντέλο π.χ. ότι δεν υπάρχει καθόλου φυλογενετικό σήμα. Για τον έλεγχο της πρώτης υπόθεσης πραγματοποιήθηκε σύγκριση των παρατηρούμενων τιμών AUC με ένα σύνολο 1.000 τιμών AUC που δημιουργήθηκαν από προσομοίωση χαρακτήρων που εξελίσσονται με βάση το μοντέλο της κίνησης Brown κατά μήκος της φυλογένεσης. Για τον έλεγχο της δεύτερης υπόθεσης πραγματοποιήθηκε σύγκριση των παρατηρούμενων τιμών AUC με ένα σύνολο 1.000 τυχαίων τιμών AUC που αφορούν τα υπό μελέτη χαρακτηριστικά των ειδών.

Για να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε το φυλογενετικό δέντρο με τους 19 πληθυσμούς για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα μορφολογικά δεδομένα (Εικόνα 3.3). Με βάση αυτό κατασκευάστηκε ένας πίνακας αποστάσεων και πάνω σε αυτόν τον πίνακα πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυρίων συντεταγμένων (principal coordinate analysis, PCoA). Από αυτή την ανάλυση λήφθηκαν τα ιδιοδιανύσματα για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (PSR).

3.2.5.3. Κελυφική ποικιλότητα: η σχετική συνεισφορά του χώρου, του κλίματος και της φυλογένεσης

Σε αυτό το μέρος ελέγχθηκε αρχικά αν υπάρχει κάποια σχέση (δηλαδή αν παρατηρείται κάποιο πρότυπο) μεταξύ των κελυφικών μετρήσεων (συγκεκριμένα του SH1, SH2 και SH3) και των χωρικών μεταβλητών (γεωγραφικό πλάτος και μήκος) λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία PGLS (Phylogenetic Generalized Least Squares), που είναι μία δοκιμασία ελαχίστων τετραγώνων λαμβάνοντας υπ' όψιν τις φυλογενετικές σχέσεις (Garland & Ives, 2000), ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει φυλογενετική εξάρτηση μεταξύ των κελυφικών μετρήσεων (SH1, SH2 και SH3) και των χωρικών μεταβλητών. Η δοκιμασία PGLS θεωρείται ισάξια (Blomberg *και συν.*, 2003) με την ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο των ανεξάρτητων αντιθέσεων (Phylogenetic Indepedent Contrasts) (Felsenstein, 1985). Πιο αναλυτικά, η δοκιμασία PGLS (Garland & Ives, 2000) υποθέτει ότι οι αποκλίσεις που εμφανίζονται μεταξύ των ειδών είναι φυλογενετικά σχετιζόμενες και υπολογίζει την παράμετρο λ η οποία δείχνει τον βαθμό της φυλογενετικής εξάρτησης στα δεδομένα (η παράμετρος λ υπολογίζεται αυτόματα μαζί με άλλες παραμέτρους του μοντέλου με βάση τη μέγιστη πιθανοφάνεια). Η παράμετρος λ παίρνει τιμές από 0 ως 1. Εάν η τιμή του λ είναι μηδέν τότε το πρότυπο διαφοροποίησης είναι ανεξάρτητο από τη φυλογένεση (δηλαδή παρέχει αντίστοιχα αποτελέσματα με την κλασική δοκιμασία ελαχίστων τετραγώνων) ενώ αν η τιμή του λ είναι ίση με τη μονάδα τότε το πρότυπο διαφοροποίησης είναι σύμφωνο με το μοντέλο της κίνησης Brown. Αφού υπολογιστεί η τιμή λ, πραγματοποιείται η κατάλληλη στατιστική δοκιμασία για να διαπιστωθεί αν η τιμή λ που λήφθηκε από τις μετρήσεις διαφέρει σημαντικά από το μηδέν ή από τη μονάδα.

Στο δεύτερο μέρος της ανάλυσης, ποσοτικοποιήθηκε η σχετική συνεισφορά (α) του κλίματος, (β) του χώρου και (γ) της φυλογένεσης, στη δημιουργία της παρατηρούμενης κελυφικής ποικιλότητας. Για τον σκοπό αυτόν, χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση κατάτμησης της παρατηρούμενης ποικιλότητας (variance-partitioning framework) (Legendre & Legendre, 1998). Με απλά λόγια, στην ανάλυση αυτή υπάρχουν τρεις σύνθετες μεταβλητές του κελύφους (SH1, SH2 και SH3) και τρία σύνολα δεδομένων (α) κλιματικά χαρακτηριστικά, (β) χωρικές μεταβλητές (για τη συγκεκριμένη ανάλυση οι τιμές για το γεωγραφικό πλάτος και μήκος δεν χρησιμοποιήθηκαν αυτούσιες αλλά τροποποιήθηκαν κατάλληλα, βλ. παρακάτω) και (γ) η φυλογένεση που προσπαθούν (το καθένα χωριστά ή συνδυασμός αυτών) να ερμηνεύσουν την ποικιλότητα που παρατηρείται σε καθένα από τα SH1, SH2 και SH3. Η κατάτμηση της ποικιλότητας έχει σαν αποτέλεσμα, η παρατηρούμενη ποικιλότητα σε καθένα από τα SH1, SH2 και SH3 να διαιρείται σε μέρη, το καθένα από τα οποία μπορεί να ερμηνευθεί από τα κλιματικά χαρακτηριστικά, τις χωρικές μεταβλητές, τη φυλογένεση ή συνδυασμό τους. Φυσικά, από μια τέτοια ανάλυση μπορεί να προκύψει και ότι ένα μέρος της παρατηρούμενης ποικιλότητας, στις μεταβλητές που εξετάζονται, δεν μπορεί να ερμηνευτεί από κανένα από τους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν (κλιματικά χαρακτηριστικά, χωρικές μεταβλητές, φυλογένεση).

Η ανάλυση περιλαμβάνει δύο στάδια: 1) κατασκευάζεται ένα μοντέλο τέτοιο ώστε η κελυφική ποικιλότητα να αποτελεί «συνάρτηση» των κλιματικών χαρακτηριστικών, του χώρου ή της φυλογένεσης ανεξάρτητα (συνολικά δηλαδή κατασκευάζονται τρία μοντέλα, ένα για τις κλιματικές συνθήκες, ένα για τον χώρο και ένα για τη φυλογένεση) και 2) γίνεται συνδυασμός αυτών των τριών μοντέλων μεταξύ τους. Η κατάτμηση της ποικιλότητας, βασίστηκε στη γραμμική παλινδρόμηση και χρησιμοποιήθηκαν οι προσαρμοσμένες τιμές R^2 (adjusted R^2) (Legendre & Legendre, 1998). Πιο αναλυτικά η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Επίδραση κλίματος

Για την εκτίμηση της επίδρασης του κλίματος χρησιμοποιήθηκαν οι σύνθετες μεταβλητές που προέκυψαν από την ανάλυση κυρίων συνιστωσών (βλ. παράγραφο 3.2.3) τόσο για το σύγχρονο κλίμα (CC1, CC2 και CC3), όσο και για αυτό του παρελθόντος (ειδικά για το κλίμα του παρελθόντος, η ανάλυση έγινε δύο φορές, μία για τις τιμές που λήφθηκαν από το ένα μοντέλο δηλαδή τις LGM_M1, LGM_M2 και LGM_M3 και μία για τις τιμές που λήφθηκαν από το άλλο μοντέλο δηλαδή τις LGM_C1, LGM_C2 και LGM_C3). Επίσης πραγματοποιήθηκε μία πιλοτική ανάλυση προκειμένου να

ανιχνευτεί τυχόν συγγραμικότητα (collinearity) μεταξύ των τιμών για το σύγχρονο και αυτών για το παρελθοντικό κλίμα. Για να γίνει αυτό, υπολογίστηκαν οι τιμές του παράγοντα πληθωριστικής διακύμανσης (Variance Inflation Factor, VIF) και στη συνέχεια η μεταβλητή με την υψηλότερη τιμή VIF αφαιρούταν από την ανάλυση και η διαδικασία επαναλαμβανόταν έως ότου όλες οι τιμές VIF να είναι μικρότερες από μία προκαθορισμένη τιμή (threshold). Η τιμή αυτή στη συγκεκριμένη περίπτωση ορίστηκε να είναι το 10 (Neter, Wasserman & Kutner, 1990). Η ανάλυση αυτή οδήγησε στην αφαίρεση (από τις μετέπειτα αναλύσεις) της μεταβλητής LGM_C1 και της LGM_M1 καθώς ήταν ισχυρά σχετιζόμενες με την CC1 (r=0,99 και r=0,94 για την LGM_C1 και την LGM_M1 αντίστοιχα). Αυτή η ισχυρή συσχέτιση σημαίνει ότι οι κλιματικές συνθήκες του παρελθόντος (για αυτή τη διάσταση) δεν μπορούν να διακριθούν από αυτές του σύγχρονου κλίματος. Για όλες τις άλλες διαστάσεις του κλίματος, οι τιμές VIF που λήφθηκαν ήταν μικρότερες ή ίσες του 5,1 που σημαίνει ότι οι κλιματικές συνθήκες του παρελθόντος είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητες από αυτές του σύγχρονου κλίματος.

Επίδραση του χώρου

Για να εκτιμηθεί η επίδραση του «χώρου», δεν χρησιμοποιήθηκαν αυτούσιες οι χωρικές μεταβλητές (γεωγρ. πλάτος και μήκος) αλλά ένας μετασχηματισμός αυτών σύμφωνα με όσα αναφέρονται από τους Borcard *και συν.* (2004), η μέθοδος των Κυρίων Συντεταγμένων Πινάκων Γειτνίασης (Principal Coordinates of Neighbor Matrices, PCNM). Σε αδρές γραμμές, η μέθοδος PCNM βασίζεται στη φασματική κατάτμηση της περιοχής μελέτης σε μια σειρά από ιδιοδιανύσματα το καθένα από τα οποία αντιπροσωπεύει μια χωρική κλίμακα. Τα ιδιοδιανύσματα αυτά προέρχονται από ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) που εφαρμόζεται στον πίνακα αποστάσεων που κατασκευάζεται με βάση το γεωγραφικό πλάτος και μήκος των σταθμών δειγματοληψίας (βλ. επίσης (Borcard & Legendre, 2002) για περισσότερες λεπτομέρειες της μεθόδου). Τέλος, πρέπει να διευκρινιστεί ότι ιδιοδιανύσματα με μεγαλύτερες τιμές αντιπροσωπεύουν πρότυπα μεγαλύτερης γεωγραφικής κλίμακας (π.χ. κάποιο πρότυπο που αφορά διαφοροποίηση στον άξονα βορρά-νότο) ενώ ιδιοδιανύσματα με μικρότερες τιμές αντιπροσωπεύουν πρότυπα μικρότερης γεωγραφικής κλίμακας.

Επίδραση της φυλογένεσης

Για να εκτιμηθεί η επίδραση της φυλογένεσης χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ιδιοδιανύσματα που χρησιμοποιήθηκαν και στη μέθοδο PSR (βλ. παράγραφο 3.2.5.2). Συνολικά λοιπόν υπήρχαν 8 πιθανά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου του μηδενικού (γενικά υπάρχουν 2^X μοντέλα, όπου χ οι μεταβλητές που εξετάζονται ως προς την ικανότητα τους να ερμηνεύσουν ένα πρότυπο):

1-μηδενικό μοντέλο (κανένας παράγοντας δεν ερμηνεύει την ποικιλότητα),

2-κλίμα (δηλαδή η παρατηρούμενη ποικιλότητα ερμηνεύεται από τις διαφορές των κλιματικών μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν),

3- χώρος (δηλαδή η παρατηρούμενη ποικιλότητα ερμηνεύεται από τις διαφορές των χωρικών μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν),

4-φυλογένεση (η παρατηρούμενη ποικιλότητα ερμηνεύεται από τις φυλογενετικές σχέσεις), φυσικά υπάρχουν και συνδυασμοί αυτών των παραγόντων

5- κλίμα και χώρος,

6-κλίμα και φυλογένεση,

7-φυλογένεση και χώρος,

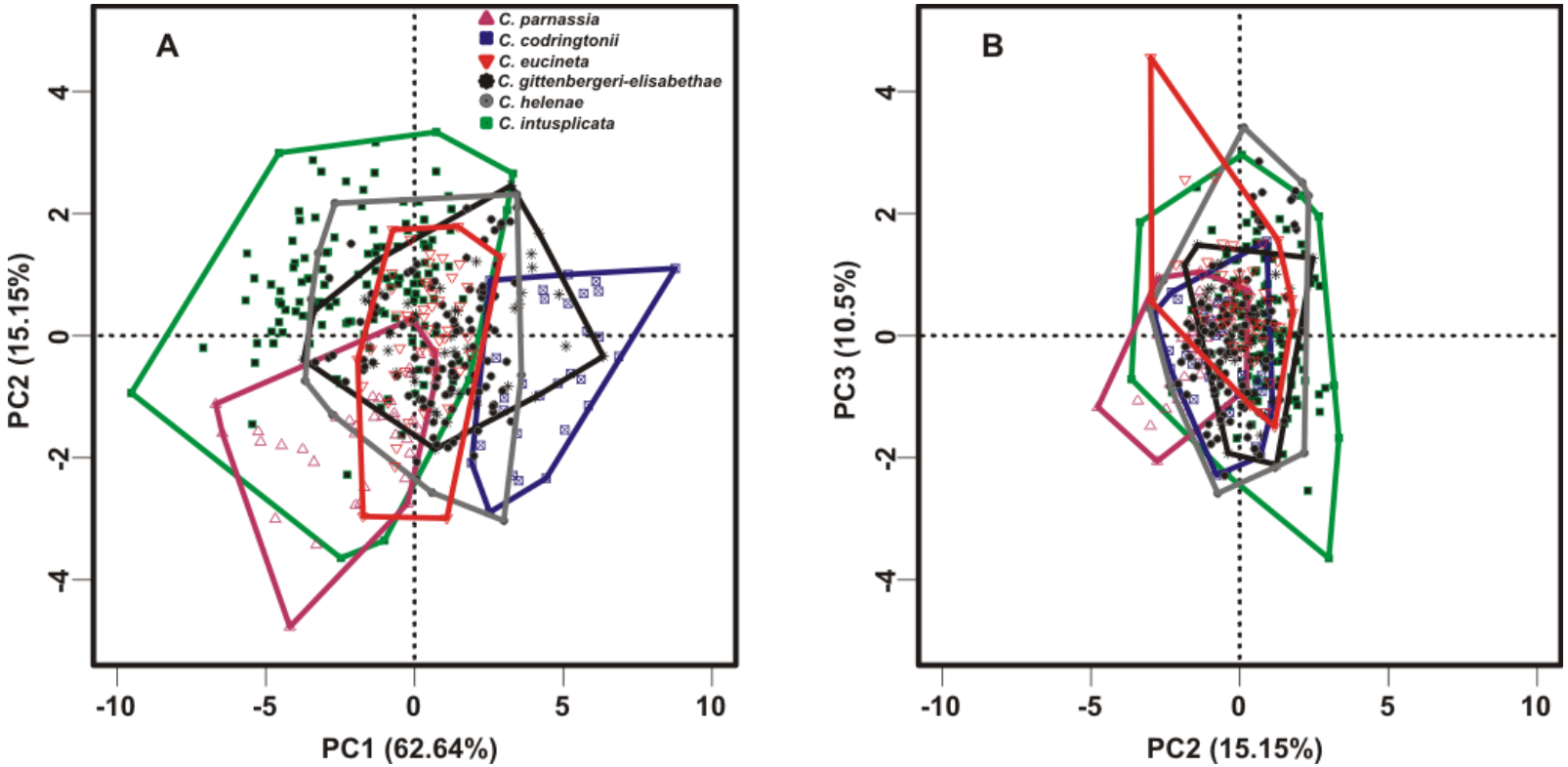
8- κλίμα, χώρος και φυλογένεση.

Τα 8 αυτά μοντέλα εφαρμόστηκαν σε καθεμία από τις σύνθετες κελυφικές μεταβλητές (SH1, SH2 και SH3) και υπολογίστηκε η τιμή για το κριτήριο του Akaike (AICc), διορθωμένη για δείγματα μικρού μεγέθους Sugiura (1978), για το καθένα από αυτά τα μοντέλα. Οι τιμές AICc χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστούν οι τιμές βαρύτητας του Akaike για το κάθε μοντέλο (Akaike weights, wi).

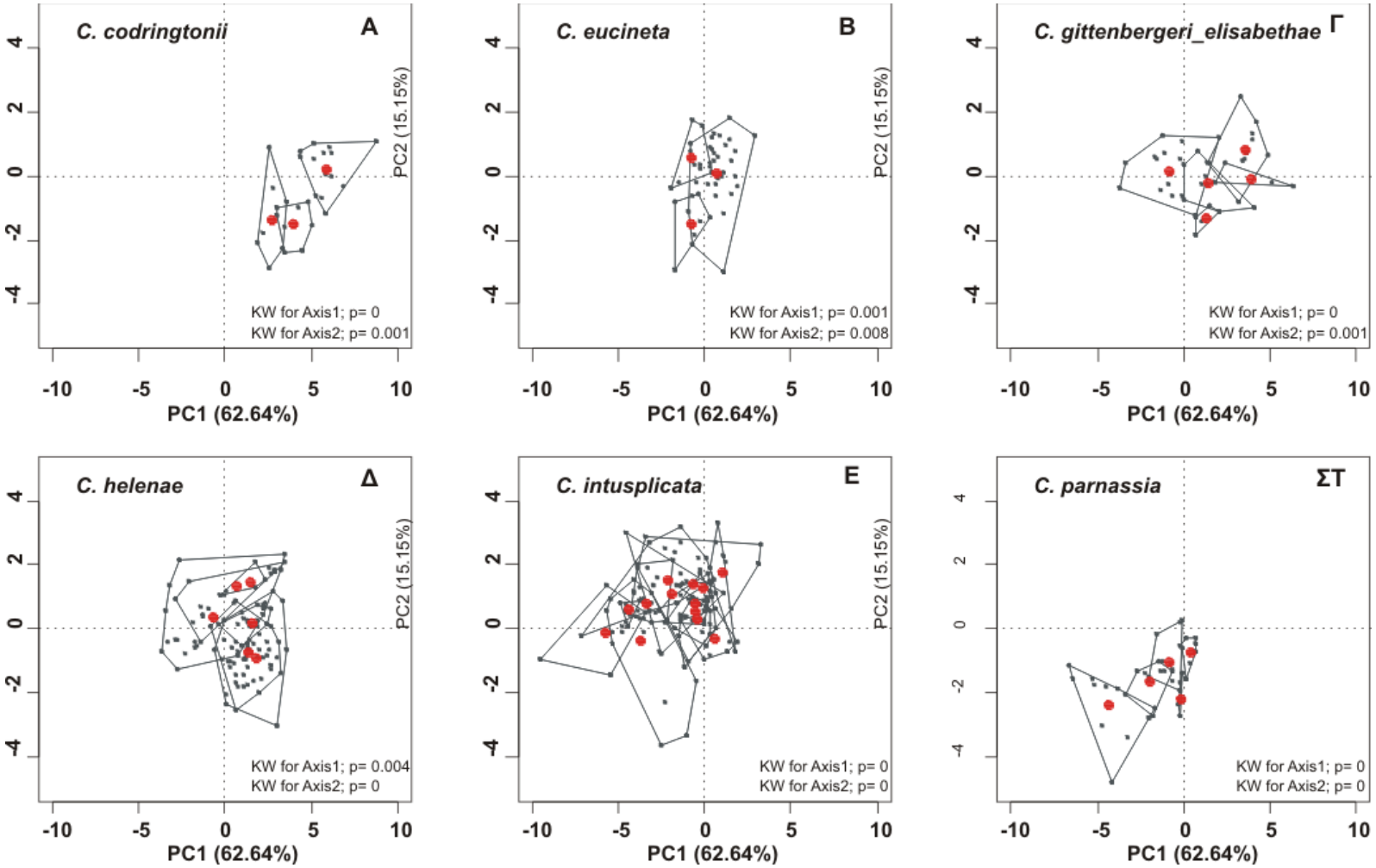
3.2.6. Λογισμικό για τις στατιστικές δοκιμασίες

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο προγραμματιστικό περιβάλλον R *(R Development Core Team, 2011)*. Οι τροποποιήσεις στο φυλογενετικό δέντρο έγιναν με τη χρήση του πακέτου "APE" (Paradis, Claude & Strimmer, 2004). Η δοκιμασία K του Blomberg πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου «phytools» (Revell, 2012). Για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το πακέτο «MuMIn» (Barton, 2013). Με τη χρήση του πακέτου «vegan» (Oksanen *και συν.*, 2007) πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις PerMANOVA, PCNM και η ανάλυση κατάτμησης ποικιλότητας (variance partitioning). Τέλος, οι αναλύσεις PVR και PSR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του πακέτου «PVR» (Santos *και συν.*, 2012).

3.3.1. Μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών



Εικόνα 3.5. Γραφήματα από την ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) για τους τρεις πρώτους άξονες (A: μεταξύ των αξόνων PC1 και PC2, B: μεταξύ των αξόνων PC2 και PC3) οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το 88,2% της συνολικής κελυφικής ποικιλότητας των ειδών *Codringtonia* που μελετήθηκαν. Τα πολύγωνα προσδιορίζουν τον μορφολογικό χώρο που καταλαμβάνεται από το κάθε είδος.



Εικόνα 3.6. Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών του ίδιου είδους, για όλα τα είδη *Codringtonia*. Στα γραφήματα εικονίζονται οι δύο πρώτοι άξονες της ανάλυσης PCA. Με κόκκινο κύκλο δηλώνεται το κεντροειδές για τον κάθε πληθυσμό και με πολύγωνο οριοθετείται ο μορφολογικός χώρος για τον κάθε πληθυσμό.

Στην εικόνα 3.5 φαίνεται το γράφημα που προέκυψε από την ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) για όλα τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Ο πρώτος άξονας (PC1 που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως SH1) ερμηνεύει το 62,64% της συνολικής κελυφικής ποικιλότητας, ενώ ο δεύτερος (PC2 που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως SH2) και ο τρίτος άξονας (PC3 που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως SH3) το 15,15% και 10,4% αντίστοιχα. Καθένας από τους υπόλοιπους άξονες ερμηνεύει λιγότερο από 4% της συνολικής κελυφικής ποικιλότητας και έτσι δεν λαμβάνονται υπ' όψιν στις μετέπειτα αναλύσεις. Συνολικά, με τους τρεις πρώτους άξονες ερμηνεύεται το 88,2% της συνολικής κελυφικής ποικιλότητας. Σύμφωνα με τη συνεισφορά που έχει η καθεμία από τις πρωταρχικές μεταβλητές στον κάθε έναν από τους άξονες SH1, SH2 και SH3 (Πίνακας 3.4) μπορεί να εκτιμηθεί τι αντιπροσωπεύει ο κάθε ένας από τους άξονες. Στον καθορισμό του πρώτου άξονα συμμετέχουν όλες οι αρχικές κελυφικές μετρήσεις, αλλά με μεγαλύτερη βαρύτητα (0,924 και 0,958) συμμετέχουν οι δύο διάμετροι του κελύφους (SD και BD), ακολουθούν το ύψος του κελύφους (BH και SH με την ίδια βαρύτητα περίπου 0,89) και οι μετρήσεις του ανοίγματος (MH, MD και AL με βαρύτητα 0,82-0,85), σε μικρότερο βαθμό συμμετέχουν οι μετρήσεις IL και NUW (0,759 και 0,74). Για τον λόγο αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι ο πρώτος άξονας (**SH1**) αντιπροσωπεύει το **συνολικό μέγεθος του κελύφους**. Έτσι, **τα είδη τα άτομα των οποίων είναι μικρότερα με μέγεθος βρίσκονται προς τα αριστερά τους γραφήματος της PCA, ενώ αυτά που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος προς τα δεξιά** (Εικόνα 3.5). Στον καθορισμό του δεύτερου άξονα (**SH2**) σημαντικά συμμετέχει κυρίως η αναλογία που εκφράζει το **σχήμα του κελύφους** (0,788) και στον καθορισμό του τρίτου άξονα (**SH3**) σημαντικά συμμετέχει μόνο η αναλογία που εκφράζει **το σχήμα του ανοίγματος** (0,759). Ως εκ τούτου οι σύνθετες μεταβλητές (ή οι άξονες) SH2 και SH3 αντιπροσωπεύουν το σχήμα του κελύφους και το σχήμα του ανοίγματος αντίστοιχα. Επομένως, τα **είδη** με άτομα το **κέλυφος** των οποίων είναι **πιο κωνικό βρίσκονται προς το κάτω μέρος** του άξονα SH2 **ενώ αυτά με πιο πεπλατυσμένο κέλυφος προς το πάνω** μέρος του SH2 (Εικόνα 3.5). Τέλος, είδη τα άτομα των οποίων διαθέτουν πιο **στρογγυλό σχήμα ανοίγματος βρίσκονται προς το κάτω μέρος του SH3 ενώ αυτά με πιο ελλειψοειδές άνοιγμα προς το πάνω** μέρος του SH3 (Εικόνα 3.5).

Με την ανάλυση αυτή (PCA) φαίνεται ότι μόνο κάποια από τα είδη μπορούν να διακριθούν καλά μεταξύ τους όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.5, όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες μετά-ανάλυσης post hoc

χρησιμοποιώντας την ανάλυση PerMANOVA. Πιο αναλυτικά, ως προς τον άξονα SH1 διακρίνονται καλά το *C. codringtonii*, το *C. intusplicata* και το *C. parnassia* από όλα τα υπόλοιπα είδη. Ως προς τον άξονα SH2 διακρίνονται καλά το *C. intusplicata* και το *C. parnassia* από όλα τα υπόλοιπα είδη και ως προς τον άξονα SH3 διακρίνεται καλά το *C. eucineta* από όλα τα υπόλοιπα είδη εκτός του κλάδου *C. gittenbergeri-elisabethae*. Συνολικά, λαμβάνοντας υπ' όψιν και τους τρεις άξονες μαζί (Πίνακας 3.5), διακρίνονται καλά το *C. codringtonii*, το *C. intusplicata* και το *C. parnassia* από όλα τα υπόλοιπα είδη (αλλά όχι το *C. codringtonii* από τον κλάδο *C. gittenbergeri-elisabethae*).

Επίσης, η ανάλυση PCA για τους πληθυσμούς (του ίδιου είδους) έδειξε (Εικόνα 3.6) να υπάρχει αρκετά μεγάλη ποικιλομορφία στους κελυφικούς χαρακτήρες ακόμη και εντός των ειδών και μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις οι πληθυσμοί ενός είδους ξεχωρίζουν πλήρως μεταξύ τους (βλ. Εικόνα 3.6.Α, 3.6.Β, 3.6.ΣΤ).

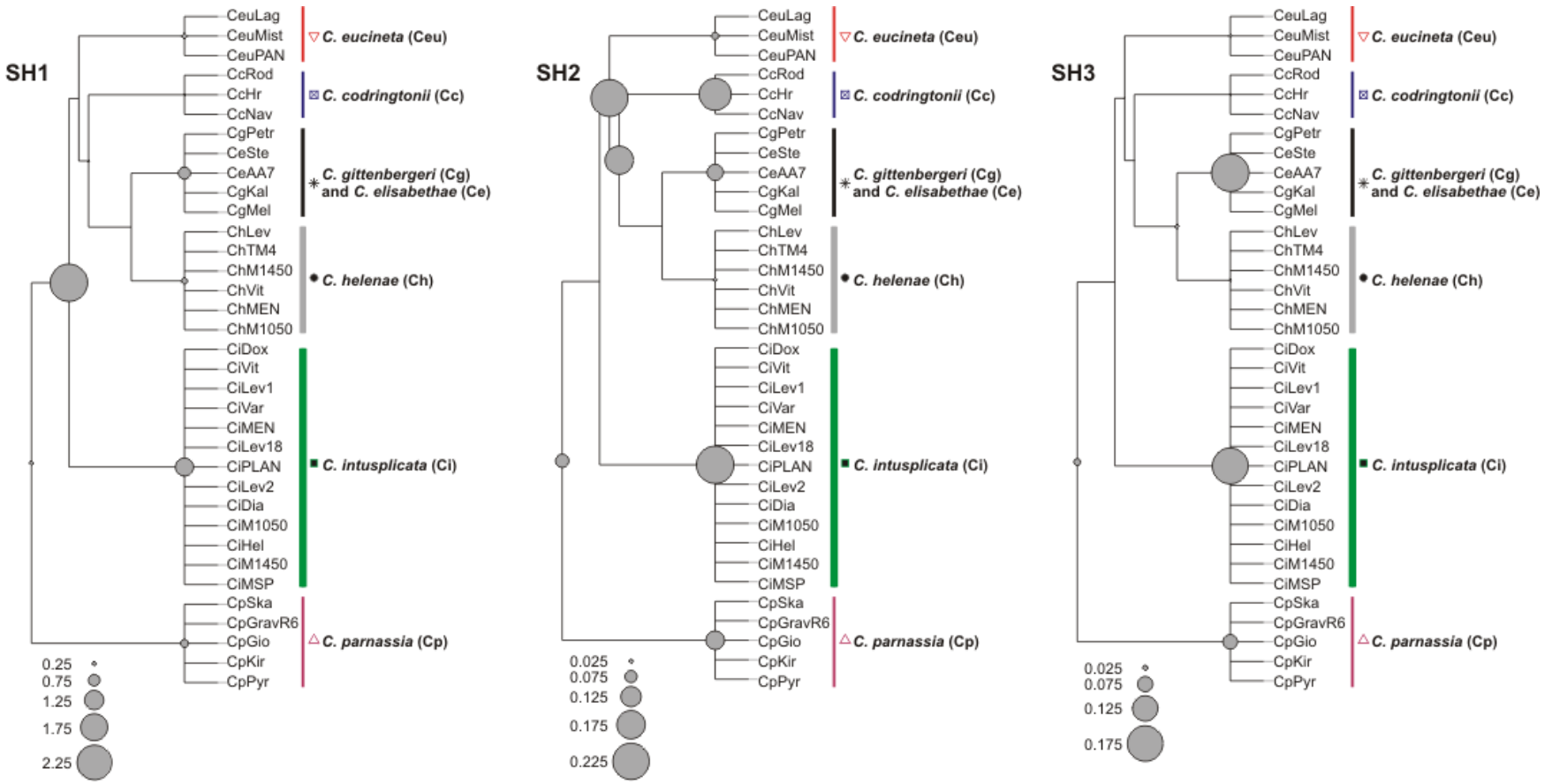
Πίνακας 3.4. Η συνεισφορά (loadings) καθεμίας από τις πρωταρχικές κελυφικές μεταβλητές στους τρεις πρώτους άξονες SH1, SH2 και SH3 της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA). Το ποσοστό της ποικιλότητας που ερμηνεύεται από καθέναν από τους άξονες δίνεται σε παρένθεση. Τιμές μεγαλύτερες από 0,5 σημειώνονται με έντονους χαρακτήρες.

	SH1 (62,64%)	SH2 (15,15%)	SH3 (10,4%)
SD	**0,924**	0,341	0,017
BD	**0,958**	0,173	0,022
MH	**0,852**	-0,108	0,477
MD	**0,823**	0,418	-0,162
AL	**0,829**	0,183	0,066
IL	**0,759**	-0,200	-0,055
NUW	**0,740**	0,423	0,015
BH	**0,899**	-0,296	-0,209
SH	**0,897**	-0,302	-0,282
SH/SD	0,399	**-0,788**	-0,427
MD/MH	-0,364	**0,531**	**-0,759**

.

Πίνακας 3.5. Οι τιμές p (p-values) όπως προέκυψαν από την κατά ζεύγη μετά-ανάλυση post hoc της PerMANOVA. Οι τιμές έχουν διορθωθεί για πολλαπλές δοκιμασίες (multiple tests), χρησιμοποιώντας τη διόρθωση του Holm (1979). Οι δοκιμασίες εφαρμόστηκαν για καθέναν από τους τρεις πρώτους άξονας SH1, SH2 και SH3 χωριστά αλλά και όλους μαζί συνολικά. Οι περιπτώσεις στις οποίες υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά υποδεικνύονται με έντονους χαρακτήρες.

Συνολικά		*C. codringtonii*	*C. eucineta*	*C. gittenbergeri-elisabethae*	*C. helenae*	*C. intusplicata*
	C. eucineta	**0,010**				
	C. gittenbergeri-elisabethae	0,304	1,000			
	C. helenae	**0,001**	1,000	0,985		
	C. intusplicata	**0,001**	**0,003**	**0,001**	**0,003**	
	C. parnassia	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**
SH1		*C. codringtonii*	*C. eucineta*	*C. gittenbergeri-elisabethae*	*C. helenae*	*C. intusplicata*
	C. eucineta	**0,001**				
	C. gittenbergeri-elisabethae	**0,001**	0,117			
	C. helenae	**0,001**	1,000	1,000		
	C. intusplicata	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	
	C. parnassia	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	1,000
SH2		*C. codringtonii*	*C. eucineta*	*C. gittenbergeri-elisabethae*	*C. helenae*	*C. intusplicata*
	C. eucineta	0,318				
	C. gittenbergeri-elisabethae	0,136	1,000			
	C. helenae	0,922	1,000	1,000		
	C. intusplicata	**0,001**	**0,009**	**0,004**	**0,001**	
	C. parnassia	**0,016**	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**
SH3		*C. codringtonii*	*C. eucineta*	*C. gittenbergeri-elisabethae*	*C. helenae*	*C. intusplicata*
	C. eucineta	**0,001**				
	C. gittenbergeri-elisabethae	0,19	0,235			
	C. helenae	1,000	**0,009**	1,000		
	C. intusplicata	0,607	**0,016**	1,000	1,000	
	C. parnassia	1,000	**0,001**	1,000	1,000	1,000



Εικόνα 3.7. Κατάτμηση της κελυφικής ποικιλότητας για καθένα από τα χαρακτηριστικά SH1, SH2 και SH3 κατά μήκος της φυλογένεσης για τα είδη *Codringtonia*. Οι κύκλοι στους κόμβους δείχνουν τη συνεισφορά του κάθε κόμβου στη συνολική κελυφική ποικιλότητα. Η κλίμακα δίνεται στο κάτω μέρος της εικόνας.

3.3.2. Σχετική συμβολή της δια-ειδικής και ενδο-ειδικής ποικιλότητας στη συνολική μορφολογία του κελύφους

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση κατάτμησης της μορφολογικής ποικιλότητας σε ποικιλότητα εντός του είδους (μεταξύ των πληθυσμών) και σε ποικιλότητα μεταξύ των ειδών φαίνονται στην Εικόνα 3.7 και τον πίνακα 3.6. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι οι πληθυσμοί ευθύνονται για περισσότερο από το 50% της παρατηρούμενης ποικιλότητας είτε εξεταστούν όλες οι μεταβλητές μαζί είτε καθεμία χωριστά (Πίνακας 3.6). Ωστόσο, οι δοκιμασίες ανακατανομής (permutations tests) έδειξαν ότι, μόνο για τη μεταβλητή SH3, η παρατηρούμενη ποικιλότητα δεν είναι (στατιστικά) σημαντικά διαφορετική (Πίνακας 3.6) από την τυχαία κατανομή των χαρακτηριστικών μεταξύ των κόμβων του δέντρου. Το παραπάνω υποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη ποικιλότητα μεταξύ των πληθυσμών δεν είναι διαφορετική από την ποικιλότητα μεταξύ των ειδών. Αντίθετα, για τις σύνθετες μεταβλητές SH1 και SH2 και για την περίπτωση που λαμβάνονται υπ' όψιν όλες οι μεταβλητές μαζί (Πίνακας 3.6), η ποικιλότητα σε επίπεδο πληθυσμού είναι μικρότερη από αυτή που αναμένεται αν ήταν τυχαία, γεγονός που σημαίνει ότι η ποικιλότητα σε επίπεδο πληθυσμού είναι μικρότερη από την ποικιλότητα που παρατηρείται μεταξύ των ειδών.

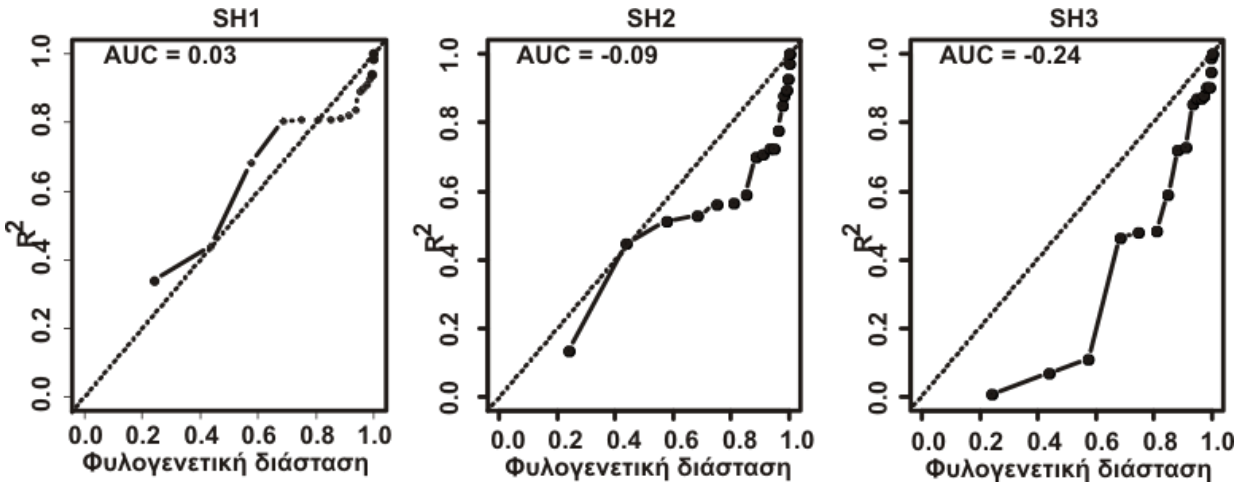
3.3.3. Φυλογενετικό σήμα και πρότυπα διαφοροποίησης

Η δοκιμασία K έδωσε τιμές μικρότερες της μονάδας για όλες τις μεταβλητές (SH1=0,475, SH2=0,351 και SH3=0,484) που σημαίνει ότι, σε όλες τις περιπτώσεις, τα είδη ή καλύτερα οι πληθυσμοί που μελετώνται είναι λιγότερο όμοιοι μεταξύ τους από ότι αναμένεται. Επιπλέον, μόνο για τη μεταβλητή SH1 φαίνεται, σύμφωνα με τη δοκιμασία τυχαιοποίησης που πραγματοποιήθηκε, να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές ενδείξεις (p=0,022) για την ύπαρξη φυλογενετικού σήματος. Η ανάλυση κυρίων συντεταγμένων (PCoA) που πραγματοποιήθηκε πάνω στον πίνακα αποστάσεων που προέκυψε από το χρονολογημένο φυλογενετικό δέντρο έδωσε 18 ιδιοδιανύσματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (PSR) που ακολούθησε. Το κάθε ιδιοδιάνυσμα αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο πρότυπο σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών, με τα πρώτα ιδιοδιανύσματα σχετίζονται με μεγαλύτερες φυλογενετικές αποστάσεις και τα τελευταία ιδιοδιανύσματα με μικρότερες. Σύμφωνα με το παραπάνω μπορεί να υποστηριχθεί ότι ο οριζόντιος άξονας στα γραφήματα της Εικόνας 3.8,

αντιπροσωπεύει τη «φυλογενετική διάσταση» με τις τιμές που είναι πιο κοντά στην αρχή των αξόνων αντιπροσωπεύουν παλιά κλαδογενετικά συμβάντα (διαχωρισμός ειδών) ενώ όσο απομακρυσμένες είναι οι τιμές από την αρχή των αξόνων τόσο πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα (διαχωρισμός πληθυσμών) αντιπροσωπεύονται.

Πίνακας 3.6. Κατάτμηση της ποικιλότητας στη μορφολογία του κελύφους μεταξύ ειδών και πληθυσμών κατά μήκος της φυλογένεσης. Η κατάτμηση της ποικιλότητας πραγματοποιήθηκε για τις σύνθετες μεταβλητές SH1, SH2 και SH3 τόσο για την καθεμία χωριστά όσο για όλες μαζί. Για την ανάλυση αυτή, χρησιμοποιήθηκε ένα τεχνητό-μεγαλύτερο δέντρο που να περιλαμβάνει και τους 35 πληθυσμούς για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα μορφολογικά δεδομένα. Η κατάτμηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τετραγωνική εντροπία του Rao. Δίνεται η συνολική ποικιλότητα, η ποικιλότητα σε επίπεδο πληθυσμού και το ποσοστό της συνολικής ποικιλότητας που ερμηνεύεται από τους πληθυσμούς. Οι δοκιμασίες ανακατανομής πραγματοποιήθηκαν 1000 φορές. Επίσης δίνεται το 5% κατώτερο όριο (5% lower bound) καθώς και η αντίστοιχη τιμή p (p-value).

Μεταβλητές	Ποικιλότητα				
	Συνολική	Πληθυσμού	%	5% Κατώτερο όριο	P
Συνολική	7,78	4,72	61	5,68	0,003
SH1	6,06	3,54	58	4,28	0,002
SH2	1,19	0,68	58	0,82	0,008
SH3	0,52	0,49	95	0,36	0,921

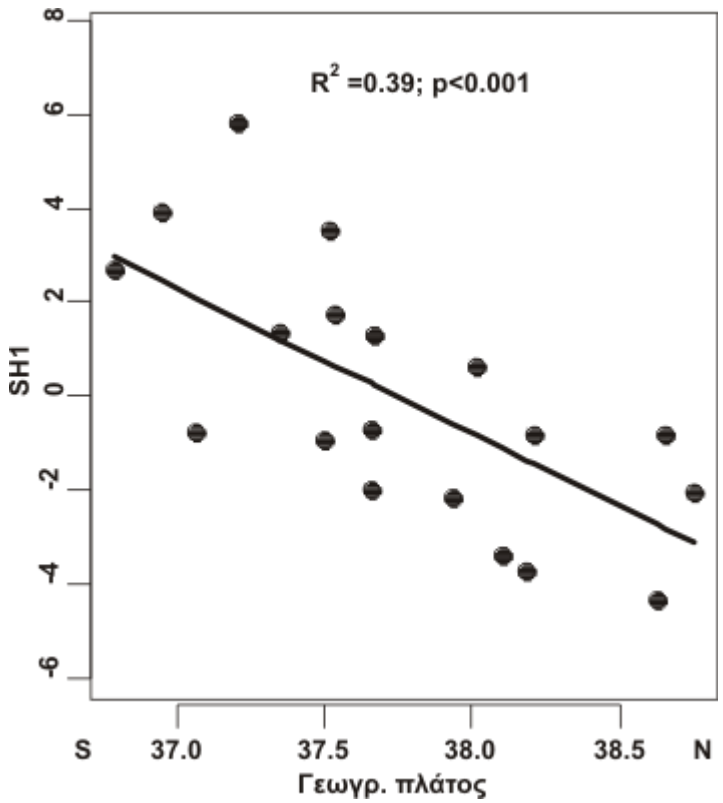


Εικόνα 3.8. Οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από την ανάλυση PSR για καθεμία από τις σύνθετες μεταβλητές SH1, SH2 και SH3. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει το αθροιστικό R^2 και ο οριζόντιος άξονας το άθροισμα των ιδιοτιμών. Η στικτή γραμμή των 45° δείχνει αυτό που αναμένεται με βάση την κίνηση Brown. Οι τιμές AUC καθώς επίσης και οι τιμές p (p-values) που προέκυψαν από τη δοκιμασία δίνονται στο πάνω αριστερό μέρος στο κάθε γράφημα.

Για τη σύνθετη μεταβλητή SH1, η σχέση μεταξύ του R^2 και του αθροίσματος των τιμών των ιδιοδιανυσμάτων δείχνει ότι ακολουθεί κατά προσέγγιση τη γραμμή των 45° (Εικόνα 3.8). Αυτό αντικατοπτρίζεται και στη θετική αλλά μικρή τιμή που έχει η τιμή AUC (περιοχή κάτω από την καμπύλη, AUC) (AUC=0,03). Οι προσομοιώσεις του μηδενικού μοντέλου, που βασίζονται στις τιμές AUC, έδειξαν ότι η μεταβλητή SH1, συνδέεται ισχυρά με τη φυλογένεση (το μηδενικό μοντέλο δέχεται την υπόθεση της απουσίας φυλογενετικού σήματος, p=0,001), αλλά δεν διαφέρει από το μοντέλο της κίνησης Brown (p=0,275). Η καμπύλη για τη μεταβλητή SH2 βρίσκεται κάτω από τη στικτή γραμμή των 45° (δηλαδή αυτού που αναμένεται με βάση την κίνηση Brown), με περισσότερο από το 50% της παρατηρούμενης ποικιλότητας να ερμηνεύεται από τα 14 τελευταία ιδιοδιανύσματα τα οποία αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 20% των φυλογενετικών σχέσεων. Η απόκλιση από τη γραμμή των 45° (Εικόνα 3.8) αντικατοπτρίζεται και στην αρνητική τιμή της τιμής AUC (AUC=-0,09), αλλά δεν βρέθηκε απόκλιση από αυτό που αναμένεται με βάση την κίνηση Brown (p=0,694). Όπως συνέβη και στην περίπτωση της SH1, έτσι και στην περίπτωση της SH2 βρέθηκε ότι η μεταβλητή σχετίζεται ισχυρά με τη φυλογένεση (p=0,009). Το πρότυπο εξέλιξης για τη μεταβλητή SH3 είναι πιο εμφανές από ότι για τη μεταβλητή SH2, έτσι για τη μεταβλητή SH3 το μεγαλύτερο μέρος της ποικιλότητας εξηγείται από τα 15 τελευταία ιδιοδιανύσματα (Εικόνα 3.8), τα οποία αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 30% των φυλογενετικών σχέσεων. Το πρότυπο αυτό αποκαλύπτεται και από την αρνητική τιμή AUC (AUC=-0,24). Αντίθετα με τις SH1 και SH2, η SH3 είναι ανεξάρτητη από τη φυλογένεση (p=0,22), αλλά δεν διαφέρει από το μοντέλο της κίνησης Brown (p=0,961).

3.3.4. Σχετική συμβολή του κλίματος, του χώρου και της φυλογένεσης στον προσδιορισμό της κελυφικής ποικιλότητας

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PGLS η οποία εφαρμόστηκε μεταξύ της καθεμίας μεταβλητής και του γεωγραφικού πλάτους και του γεωγραφικού μήκους έδειξε ότι μόνο η μεταβλητή SH1 εμφανίζει αρνητική σχέση (η οποία ήταν και στατιστικά σημαντική) με το γεωγραφικό πλάτος (PGLS: R^2=0,39, $F_{2,17}$=11,18 και p<0,001). Σύμφωνα με τις τιμές βαρύτητας (loadings) για τη μεταβλητή SH1, τα μεγαλύτερα άτομα κατανέμονται νότια ενώ τα μικρότερα βόρεια στην περιοχή εξάπλωσης του γένους (Εικόνα 3.9). Για τη σχέση αυτή η τιμή λ ήταν ίση με 0,187, δεν διέφερε σημαντικά από το μηδέν (p=0,80) αλλά διέφερε σημαντικά από τη μονάδα (p<0,001). Αυτό σημαίνει ότι η σχέση που βρέθηκε να υπάρχει μεταξύ του γεωγραφικού πλάτους και της μεταβλητής SH1 δεν επηρεάζεται από τις φυλογενετικές σχέσεις των πληθυσμών που εμπλέκονται στη μελέτη.



Εικόνα 3.9. Η σχέση μεταξύ της μεταβλητής SH1 και του γεωγραφικού πλάτους.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου παρουσιάζονται στον πίνακα 3.7 ενώ ο συντελεστής για το μοντέλο που επιλέχθηκε για την καθεμία μεταβλητή δίνεται στον πίνακα 3.8. Σημειώνεται ότι για την κάθε μία κελυφική μεταβλητή (SH1, SH2 και SH3) υπάρχουν τρεις παράγοντες (κλίμα, χώρος και φυλογένεση)

που εξετάζονται για το αν και κατά πόσο μπορούν να ερμηνεύσουν την παρατηρούμενη ποικιλότητα σε καθεμία από μεταβλητές (SH1, SH2 και SH3).

Πίνακας 3.7. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου ερμηνείας της παρατηρούμενης κελυφικής ποικιλότητας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για την κάθε κελυφική μεταβλητή (SH1, SH2 και SH3) χωριστά με τον κάθε έναν παράγοντα (κλίμα, χώρος, φυλογένεση) που θα μπορούσε να ερμηνεύει ένα μέρος της παρατηρούμενης ποικιλότητας. Οι μεταβλητές που επιλέχθηκαν για τον παράγοντα «χώρο» προέρχονται από την ανάλυση PCNM και για τον παράγοντα «φυλογένεση» από την ανάλυση PVR. Για το μοντέλο που επιλέγεται ως καλύτερο δίνονται επίσης οι τιμές βαρύτητας για την τιμή AICc (AICc weight), οι βαθμοί ελευθερίας (d.f), η τιμή F (F-ratio) η προσαρμοσμένη τιμή R^2 και η αντίστοιχη τιμή p (p-value).

	Παράγοντας	Μεταβλητές που επιλέχθηκαν	wAICc	d.f.	F	R^2	P
SH1	κλίμα	CC1, LGM_C2	0,362	2, 16	6,714	0,388	0,007
	χώρος	1, 2, 3, 7, 8	0,244	5, 13	15,15	0,797	<0,001
	φυλογένεση	1, 2, 3, 4, 11,17	0,242	5, 13	15,86	0,856	<0,001
SH2	κλίμα	LGM_C3	0,419	1, 17	10,79	0,352	0,004
	χώρος	1	0,276	1, 17	8,835	0,303	0,008
	φυλογένεση	1, 2, 8	0,061	3, 15	6,333	0,471	0,005
SH3	κλίμα		0,327				
	χώρος	4, 6	0,309	2, 16	10,78	0,521	0,001
	φυλογένεση	4, 7, 8, 10	0,113	4, 14	9,088	0,642	<0,001

Πίνακας 3.8. Για κάθε έναν από τους παράγοντες κλίμα, χώρος και φυλογένεση που εξετάζονται για το κατά πόσο μπορούν να ερμηνεύσουν την παρατηρούμενη ποικιλότητα στα κελυφικά χαρακτηριστικά SH1, SH2 και SH3, δίνονται ποιες από τις μεταβλητές συμμετέχουν στο μοντέλο που επιλέχθηκε, καθώς και το τυπικό λάθος (SE) και οι τιμές t (t-value) και P (p-value). Με έντονους χαρακτήρες σημειώνονται οι περιπτώσεις που υπάρχει σημαντική συνεισφορά.

			Estimate	SE	t-value	P
SH1	κλίμα	Intercept	-0,078	0,495	-0,158	0,876
		CC1	0,394	0,144	2,726	**0,015**
		LGM2	0,516	0,206	2,497	**0,023**
	χώρος	Intercept	-0,037	0,283	-0,132	0,896
		PCNM1	2,519	1,236	2,037	0,062
		PCNM2	-7,300	1,236	-5,903	**<0,001**
		PCNM3	-5,641	1,236	-4,561	**<0,001**
		PCNM7	2,977	1,236	2,407	**0,031**
		PCNM8	-3,944	1,236	-3,189	**0,007**
	φυλογένεση	Intercept	-0,037	0,238	-0,157	0,877
		PVR1	6,787	1,040	6,526	**<0,001**
		PVR2	3,701	1,040	3,558	**0,004**
		PVR3	-5,756	1,040	-5,534	**<0,001**
		PVR4	4,056	1,040	3,900	**0,002**
		PVR11	-2,701	1,040	-2,597	**0,023**
		PVR17	2,477	1,040	2,381	**0,034**
SH2	κλίμα	Intercept	-0,137	0,205	-0,670	0,511
		LGM3	0,547	0,166	3,285	**0,004**
	χώρος	Intercept	-0,299	0,206	-1,450	0,165
		PCNM1	2,676	0,900	2,972	**0,008**
	φυλογένεση	Intercept	-0,299	0,180	-1,664	0,116
		PVR1	1,676	0,784	2,135	**0,049**
		PVR2	-2,561	0,784	-3,263	**0,005**
		PVR8	-1,528	0,784	-1,947	0,070
SH3	χώρος	Intercept	0,019	0,098	0,194	0,848
		PCNM4	-1,841	0,428	-4,294	**<0,001**
		PCNM6	-0,756	0,428	-1,764	0,096
	φυλογένεση	Intercept	0,019	0,084	0,225	0,825
		PVR4	-1,564	0,370	-4,224	**<0,001**
		PVR7	-0,861	0,370	-2,327	**0,035**
		PVR8	0,950	0,370	2,568	**0,022**
		PVR10	0,944	0,370	2,549	**0,023**

3.3.4.1. Κλίμα

Για την κελυφική μεταβλητή SH1, οι σύνθετες μεταβλητές CC1 και LGM_C2 (βλ. παράγραφο 3.2.3) επιλέχθηκαν ως οι «καλύτεροι παράγοντες πρόβλεψης» (Πίνακας 3.7) για την παρατηρούμενη ποικιλότητα (adjusted R^2=0,388 και p=0,007). Σημειώνεται ότι οι σύνθετες μεταβλητές CC1 και LGM_C2 προέκυψαν από ανάλυση PCA, (βλ. Πίνακα 3.3) και ότι στον καθορισμό της CC1 συμμετέχουν σημαντικά σχεδόν όλες οι βιοκλιματικές μεταβλητές (εξαιρούνται οι BIO2, BIO7, BIO13, BIO16, επίσης βλ. Πίνακα 3.2) ενώ για στον καθορισμό της LGM_C2 συμμετέχουν σημαντικά μόνο οι BIO2, BIO3, BIO4, BIO5, BIO7 (βλ. Πίνακα 3.2). Για την κελυφική μεταβλητή SH2 (Πίνακας 3.7), επιλέχθηκε (adjusted R^2=0,352 και p=0,004) μόνο η μεταβλητή LGM_C3 (στον καθορισμό της συμμετέχει σημαντικά μόνο η BIO3), ενώ για την κελυφική μεταβλητή SH3 (Πίνακας 3.7) δεν επιλέχθηκε καμία μεταβλητή του κλίματος (ούτε του σύγχρονου ούτε του παρελθοντικού) που να ερμηνεύει την παρατηρούμενη ποικιλότητα. Σημειώνεται επίσης ότι για το παρελθοντικό κλίμα τα δεδομένα προέκυψαν από δύο μοντέλα, το Community Climate System Model (CCSM) και το Model for Interdisciplinary Research on Climate (MIROC) και τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής και για τα δύο μοντέλα ήταν παρόμοια ωστόσο εδώ παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα για το μοντέλο CCSM (Πίνακες 3.7 και 3.8).

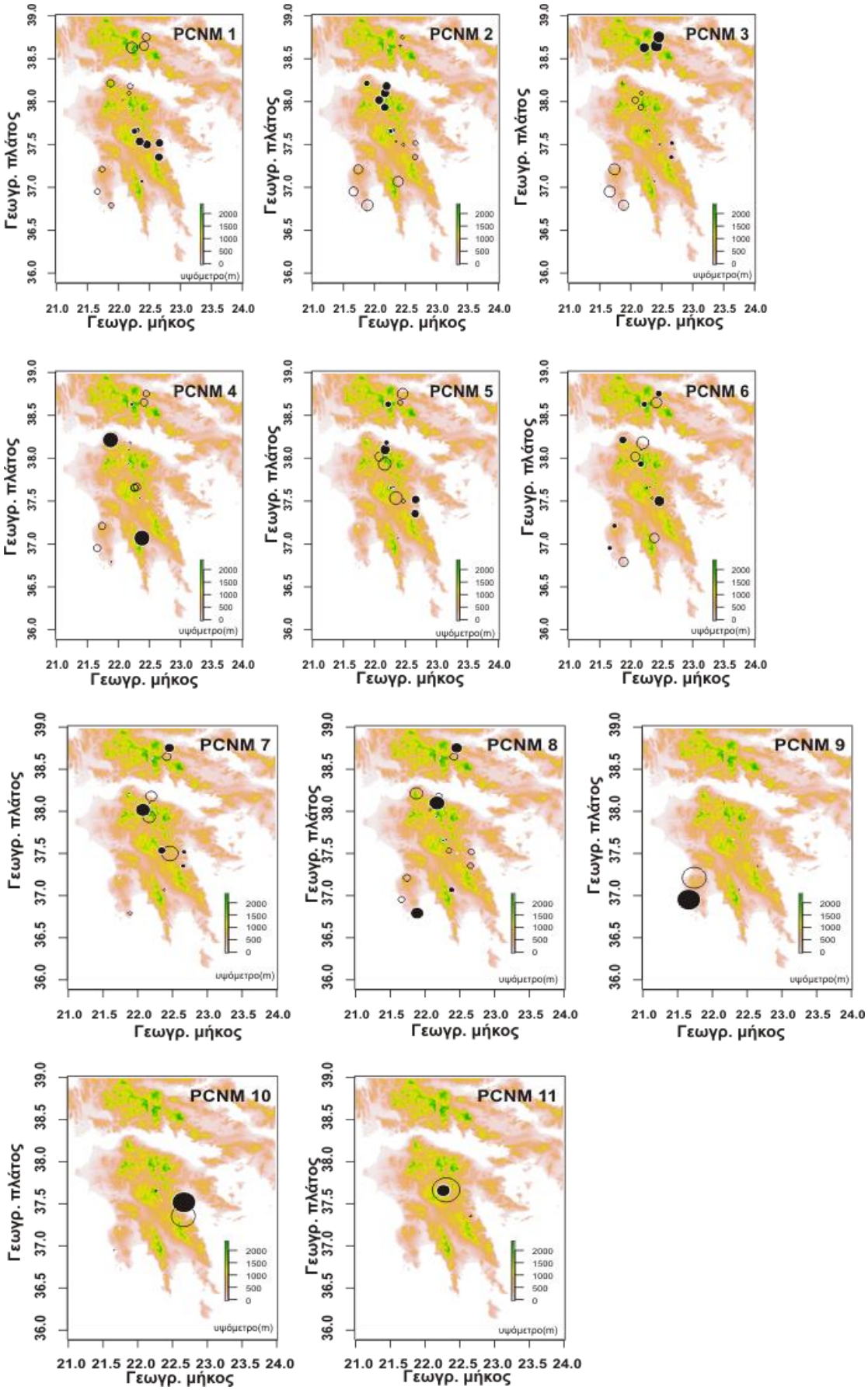
3.3.4.2. Χώρος

Από την ανάλυση PCNM προέκυψαν 11 ιδιοδιανύσματα (Εικόνα 3.10). Τα ιδιοδιανύσματα από την ανάλυση PCNM, μπορούν να θεωρηθούν σαν ένα μειούμενο κλινές του χώρου, δηλαδή τα πρώτα ιδιοδιανύσματα μπορεί να θεωρηθεί ότι αντιπροσωπεύουν τον χώρο σε μεγάλη γεωγραφική κλίμακα και σταδιακά τα επόμενα αντιπροσωπεύουν ολοένα και μικρότερη γεωγραφική κλίμακα. Με αυτό το σκεπτικό, μπορεί κανείς, αυθαίρετα, να ομαδοποιήσει τα πρώτα τρία ιδιοδιανύσματα που προέκυψαν από την ανάλυση PCNM και να θεωρήσει την ομάδα ως «χωρική μεταβλητή» μεγάλη γεωγραφικής κλίμακας. Για παράδειγμα, το 2° ιδιοδιάνυσμα (PCNM2) σχετίζεται ισχυρά με το γεωγραφικό πλάτος (r=0,57) ενώ το 3° (PCNM3) με το γεωγραφικό πλάτος και το γεωγραφικό μήκος (r=0,62 και r=0,78 αντίστοιχα). Ομοίως, τα ιδιοδιανύσματα 4 ως 6 θεωρούνται μεσαίας και τα 7 ως 11 μικρής γεωγραφικής κλίμακας «χωρικές μεταβλητές». Για την κελυφική μεταβλητή SH1, τα ιδιοδιανύσματα PCNM 1, 2, 3, 7 και 8 (Πίνακες 3.7 και 3.8) επιλέχθηκαν (adjusted R^2=0,797 και p<0,001) ως οι καλύτερες μεταβλητές που μπορούν να ερμηνεύσουν την κελυφική ποικιλότητα στη σύνθετη μεταβλητή SH1. Για τη μεταβλητή SH2 (Πίνακες 7 και 8), επιλέχθηκε μόνο το ιδιοδιάνυσμα PCNM 1 (adjusted R^2=0,303 και p=0,008) ενώ για την κελυφική μεταβλητή SH3 (Πίνακες 3.7

και 3.8) επιλέχθηκαν τα PCNM 4 και 6 (adjusted R^2=0,521 και p<0,001). Αυτό σημαίνει, σύμφωνα και με την προηγούμενη ομαδοποίηση, ότι η ποικιλότητα στη μεταβλητή SH2, ερμηνεύεται κυρίως από μεγάλης γεωγρ. κλίμακας «χωρικές μεταβλητές» ενώ στη μεταβλητή SH3, ερμηνεύεται κυρίως από μεσαίας ως μικρής γεωγρ. κλίμακας «χωρικές μεταβλητές».

Πίνακας 3.9. Αποτελέσματα της ανάλυσης κατάτμησης ποικιλότητας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τις προσαρμοσμένες τιμές R^2 ανάμεσα σε καθεμία από τις κελυφικές μεταβλητές και τον καθένα από τους παράγοντες κλίμα, χώρο, φυλογένεση και τους διάφορους συνδυασμούς αυτών.

	SH1	SH2	SH3
Κλίμα	0,057	-0,026	
Χώρος	0,044	0,057	0,086
Φυλογένεση	0,109	0,305	0,434
Κλίμα & Χώρος	-0,040	0,124	
Χώρος & Φυλογένεση	0,377	-0,089	0,208
Κλίμα & Φυλογένεση	-0,046	0,043	
Κλίμα & Χώρος & Φυλογένεση	0,417	0,212	
Ανερμήνευτο	0,082	0,375	0,271



Εικόνα 3.10. Σχηματικά τα 11 ιδιοδιανύσματα από την ανάλυση PCNM για την περιοχή μελέτης.

3.3.4.3. Φυλογένεση

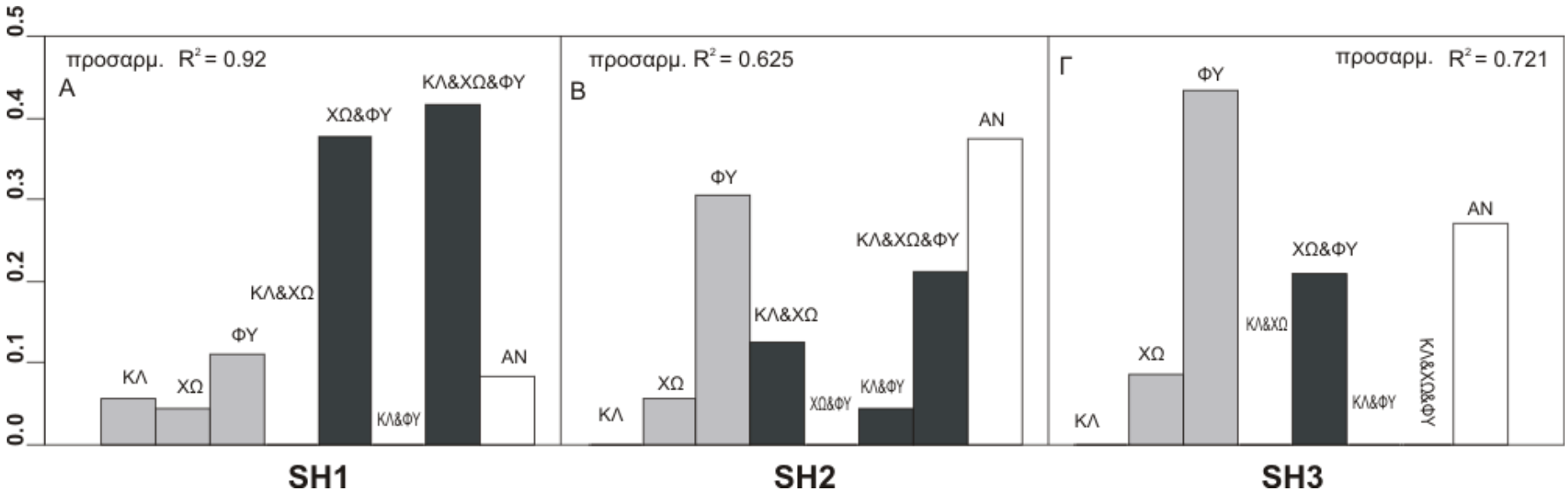
Ως προς την επίδραση της φυλογένεσης, επιλέχθηκαν τα ιδιοδιανύσματα από την ανάλυση PVR (Πίνακες 3.7 και 3.8) και για την κελυφική μεταβλητή SH1 επιλέχθηκαν τα τέσσερα πρώτα, καθώς και το 11° και το 17° ιδιοδιάνυσμα (adjusted R^2=0,856 και p<0,001). Για τις μεταβλητές SH2 και SH3 επιλέχθηκαν τα PVR 1, 2, 8 (adjusted R^2=0,471 και p=0,005) και τα PVR 4, 7, 8, 10 (adjusted R^2=0,642 και p<0,001) αντίστοιχα.

Συνολικά τα αποτελέσματα της κατάτμησης της ποικιλότητας για καθεμία από τις μεταβλητές SH1, SH2 και SH3 παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.11 και στον πίνακα 3.9.

Για την κελυφική μεταβλητή SH1, το συνολικό μοντέλο ερμηνεύει το 92% της ποικιλότητας για τη μεταβλητή αυτή. Πιο αναλυτικά, ο χώρος και το κλίμα, αν εξεταστούν ανεξάρτητα συνεισφέρουν λιγότερο από 6% το καθένα ενώ η συνεισφορά της φυλογένεσης αγγίζει το 10,9% (Πίνακας 3.9). Το πιο σημαντικό όμως δεν είναι συνεισφορά του κάθε παράγοντα ανεξάρτητα από τον άλλον, αλλά η αλληλεπίδραση αυτών και συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στους τρεις παράγοντες (χώρος, κλίμα, φυλογένεση) φτάνει το ποσοστό του 41,7% καθώς επίσης σημαντικό ρόλο, αν και σε μικρότερο βαθμό, παίζει και η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε χώρο και φυλογένεση (37,7%) (Πίνακας 3.9).

Για την κελυφική μεταβλητή SH2, το συνολικό μοντέλο ερμηνεύει το 62,5% της ποικιλότητας. Για τη μεταβλητή SH2 η κατάσταση είναι διαφορετική, καθώς η φυλογένεση μόνη της ερμηνεύει το 30,5% της παρατηρούμενης ποικιλότητας. Μικρότερη συνεισφορά έχει και ο χώρος, που μόνος του ερμηνεύει το 5,7% της παρατηρούμενης ποικιλότητας ενώ το κλίμα δεν έχει σχεδόν καμία συμμετοχή. Η αλληλεπίδραση των τριών παραγόντων ερμηνεύει επίσης ένα μεγάλο ποσοστό της ποικιλότητας (21%) ενώ και η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε χώρο και κλίμα ερμηνεύει ποσοστό της ποικιλότητας που φτάνει το 12,4% (Πίνακας 3.9).

Για την κελυφική μεταβλητή SH3, μόνο ο χώρος και η φυλογένεση ερμηνεύουν ένα ποσοστό της παρατηρούμενης ποικιλότητας (συνολικό μοντέλο=72,1%) και μάλιστα η συνεισφορά του κάθε παράγοντα ανεξάρτητα αγγίζει το 8,6 και 43,4%, αντίστοιχα, ενώ η αλληλεπίδραση των δύο το 20,8% (Πίνακας 3.9).



Εικόνα 3.11. Το μέρος της ποικιλότητας που ερμηνεύεται από καθέναν από τους παράγοντες κλίμα, χώρο και φυλογένεση για καθεμία από τις μεταβλητές SH1, SH2 και SH3,. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τη συνεισφορά του κάθε παράγοντα. Οι μπάρες με το ανοιχτό γκρι χρώμα αντιπροσωπεύουν τη συνεισφορά των παραγόντων κλίμα, χώρος και φυλογένεση ανεξάρτητα, ενώ οι μπάρες σκούρου γκρι χρώματος αντιπροσωπεύουν τη συνεισφορά των συνδυασμών των παραγόντων αυτών. Η μπάρες λευκού χρώματος αντιπροσωπεύουν την ανερμήνευτη ποικιλότητα. Συντμήσεις: ΦΥ: φυλογένεση, ΧΩ, χώρος, ΚΛ: κλίμα, ΑΝ: ανερμήνευτη ποικιλότητα. Για γραφιστικούς λόγους οι αρνητικές τιμές προσαρμόστηκαν στο μηδέν.

3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.4.1. Μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών

Με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κελύφους που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη δεν μπορούν να διακριθούν όλα τα είδη *Codringtonia* μεταξύ τους σε ικανοποιητικό βαθμό. Κάποια από τα είδη ξεχωρίζουν μεταξύ τους και είναι αυτά που βρίσκονται στα άκρα του «μορφολογικού νέφους», όμως είναι γεγονός ότι κάποια άλλα είδη εμφανίζουν σημαντική επικάλυψη στη συνολική μορφολογία του κελύφους τους (Εικόνα 3.5). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση PerMANOVA (είτε εξεταστεί κάθε άξονας της PCA χωριστά είτε όλοι μαζί) δείχνουν ότι τα είδη διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη μορφολογία του κελύφους (συνολικά: R^2=0,38, $F_{5,388}$=47,15 και p<0,001, SH1: R^2=0,46, $F_{5,388}$=65,39 και p<0,001, SH2: R^2=0,27, $F_{5,388}$=28,79 και p<0,001, SH3 R^2=0,06, $F_{5,388}$=4,64 και p<0,001) αν και οι διαφορές είναι πιο εμφανείς στους δύο πρώτους άξονες (SH1 και SH2). Ωστόσο, οι κατά ζεύγη έλεγχοι που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια, έδειξαν ότι οι διαφορές στη μορφολογία του κελύφους εντοπίζονται μόνο μεταξύ συγκεκριμένων ζευγών ειδών (Πίνακας 3.5) και όχι μεταξύ όλων των ειδών. Για παράδειγμα, κατά μήκος του άξονα SH1, το είδος *C. codringtonii* διαφέρει από όλα τα άλλα είδη ενώ κατά μήκος του άξονα SH3, το είδος που διαφέρει από τα υπόλοιπα είναι το *C. eucineta*. Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τη μονογραφία του Subai (2005), κάποια από τα είδη *Codringtonia* διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον χρωματισμό του κελύφους καθώς και με βάση άλλα χαρακτηριστικά του κελύφους (εκτός από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη), όπως το αν ο ομφαλός είναι ανοικτός, καλυμμένος ή μισο-καλυμμένος (βλ. κεφάλαιο 1). Τέλος, και το ανάγλυφο του κελύφους μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν διακριτικό γνώρισμα μεταξύ κάποιων ειδών. Επομένως, προκειμένου να διακριθούν τα είδη *Codringtonia* μεταξύ τους είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται συνδυασμός κελυφικών χαρακτηριστικών (εκτός από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή και ο χρωματισμός του κελύφους, ο ομφαλός κλπ) μαζί και με ανατομικά χαρακτηριστικά του αναπαραγωγικού συστήματος. Συνοψίζοντας, πρέπει να διευκρινιστεί ότι στόχος της μελέτης αυτής δεν είναι η συστηματική κατάταξη των ειδών *Codringtonia*, αν και φαίνεται ότι τα είδη του γένους αυτού είναι δύσκολο να διακριθούν με βάση τη μορφολογία του κελύφους τους, λόγω της πολύ μεγάλης πλαστικότητας που εμφανίζουν. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη σημασία του να λαμβάνονται υπ' όψιν διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά (κελυφικά και ανατομικά του αναπαραγωγικού) μαζί και με τις

φυλογενετικές σχέσεις των ειδών για να είναι όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη η συστηματική προσέγγιση.

3.4.2. Κατάτμηση της μορφολογικής ποικιλότητας του κελύφους κατά μήκος της φυλογένεσης: η σχετική συμβολή των ειδών και των πληθυσμών

Τα είδη *Codringtonia* αλληλεπικαλύπτονται μορφολογικά σε μεγάλο βαθμό και αιτία αυτού είναι η πολύ μεγάλη ποικιλομορφία που παρατηρείται στη μορφολογία του κελύφους μεταξύ των πληθυσμών του ίδιου είδους. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.7 οι πληθυσμοί ενός δεδομένου είδους *Codringtonia* διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους και μάλιστα η δοκιμασία Kruskal-Wallis, μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών του κάθε είδους, αποκάλυψε ότι οι πληθυσμοί διαφέρουν μεταξύ τους τόσο ως προς τη μεταβλητή SH1 (αντιπροσωπεύει το μέγεθος του κελύφους) όσο και ως προς τη SH2 (αντιπροσωπεύει το σχήμα του κελύφους). Ως εκ τούτου, μπορεί να υποστηριχθεί ότι ο συνολικός μορφολογικός χώρος που καταλαμβάνει το κάθε είδος επηρεάζεται σημαντικά (και για αυτό είναι και τόσο διευρυμένος) από την αρκετά μεγάλη ενδο-ειδική ποικιλότητα (καθώς οι πληθυσμοί του ίδιου είδους διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους). Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό σε μελέτες στις οποίες προσεγγίζεται η μορφολογική ποικιλότητα στο κέλυφος χερσαίων γαστεροπόδων όπως των ειδών *Codringtonia*, το κάθε είδος να αντιπροσωπεύεται από περισσότερους του ενός πληθυσμούς (όσο το δυνατόν περισσότερους), καθώς η ενδο-ειδική ποικιλότητα συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στη συνολικά παρατηρούμενη ποικιλότητα και σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι η μορφολογική ποικιλότητα ενός είδους μπορεί να αντιπροσωπεύεται ικανοποιητικά από έναν μόνο πληθυσμό. Συνεπώς, γίνεται σαφές ότι πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν τόσο η δια-ειδική όσο και η ενδο-ειδική ποικιλότητα καθώς η τελευταία δεν μπορεί να θεωρείται αμελητέα. Μάλιστα, αυτό είναι κάτι που έχει παρατηρηθεί και για άλλα γνωρίσματα και έτσι πρόσφατα οι Stevens *και συν.* (2010) πρότειναν ένα στατιστικό πλαίσιο για την εξέταση του ζητήματος αυτού. Με την προσέγγιση που προτείνεται από τους τελευταίους ερευνητές, μπορεί να διερευνηθεί η σχετική συμβολή των δια-ειδικών και των ενδο-ειδικών κόμβων ενός φυλογενετικού δέντρου στη συνολική μορφολογική ποικιλότητα. Τα αποτελέσματα της μεθόδου για την κελυφική ποικιλότητα στα είδη *Codringtonia* (Εικόνα 3.6) δείχνουν ότι ένα μεγάλο μέρος της διαφοροποίησης στο μέγεθος του κελύφους (SH1) διαμορφώθηκε στα πρώτα κλαδογενετικά συμβάντα όταν διαχωρίστηκε το είδος *C. intusplicata* από τον πρόγονο των ειδών *C. codringtonii*, *C. eucineta*, *C. gittenbergeri-elisabethae* και *C. helenae*. Στη συνέχεια, η

ποικιλότητα στο μέγεθος του κελύφους διαμορφώθηκε σταδιακά προς τα άκρα του φυλογενετικού δέντρου με τον διαχωρισμό των πληθυσμών του ίδιου είδους και μάλιστα τα είδη, οι πληθυσμοί των οποίων συμβάλλουν σημαντικά σε αυτή την τάση, είναι το *C. intusplicata* και το *C. parnassia*. Επομένως, η παρατηρούμενη ποικιλότητα στο μέγεθος των ειδών *Codringtonia* δημιουργήθηκε, κατά κύριο λόγο, πριν από 3,44 εκατομμύρια χρόνια κατά τη διαφοροποίηση του *C. intusplicata* από τον πρόγονο των υπολοίπων ειδών (βλ. κεφάλαιο 2). Όσον αφορά το σχήμα του κελύφους (SH2) η σχετική συμβολή των ειδών και των πληθυσμών στην παρατηρούμενη ποικιλότητα φαίνεται να είναι κάπως πιο ισορροπημένη σε σχέση το πρότυπο που καταγράφηκε για το μέγεθος του κελύφους. Η ποικιλότητα στο σχήμα του κελύφους φαίνεται ότι διαμορφώθηκε τόσο εξ' αιτίας γεγονότων ειδογένεσης όσο και κλαδογενετικών συμβάντων που αφορούσαν τη διαφοροποίηση των πληθυσμών (εντός του ίδιου είδους) μεταξύ τους. Επίσης, μια σημαντική αλλαγή στο σχήμα του κελύφους φαίνεται να έλαβε χώρα όταν το *C. codringtonii* διαχωρίστηκε από τον αδελφό κλάδο που περιλαμβάνει τα είδη *C. gittenbergeri-elisabethae* και *C. helenae*, γεγονός που συνέβη πριν από 2,85 εκατομμύρια χρόνια. Η επόμενη μεγάλη μεταβολή στο σχήμα φαίνεται να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους *C. intusplicata* πριν από περίπου 1,8 εκατομμύρια χρόνια. Τέλος, για το σχήμα του ανοίγματος (SH3) φαίνεται ότι σχεδόν όλη η ποικιλότητα διαμορφώθηκε σχετικά πρόσφατα και σχετίζεται μόνο με την ενδο-ειδική ποικιλότητα (Εικόνα 3.6) δηλαδή σε επίπεδο πληθυσμών. Εστιάζοντας στα κλαδογενετικά συμβάντα που φαίνεται να έχουν συμβάλει σημαντικά στη συνολική μεταβλητότητα του κελύφους του γένους, μπορεί να πει κανείς ότι είναι αυτά που έχουν πραγματοποιηθεί μεταξύ 3,44 έως 1,8 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο (βλ. κεφάλαιο 2), αυτό το χρονικό διάστημα φαίνεται να είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ηπειρωτική Ελλάδα. Εκείνη την εποχή η Πελοπόννησος αποχωρίστηκε από την Κεντρική Ελλάδα και άρχισε να επεκτείνεται σε έκταση καταλαμβάνοντας τελικά την έκταση που έχει σήμερα. Επιπλέον, το χρονικό διάστημα αυτό συμπίπτει με την εγκαθίδρυση του μεσογειακού κλίματος στην περιοχή, δηλαδή περίπου πριν από 3,2 εκατομμύρια χρόνια (Blondel & Aronson 1999). Είναι πολύ πιθανό, ότι οι διαδικασίες που έλαβαν χώρα στην περιοχή την περίοδο εκείνη δημιούργησαν τις προϋποθέσεις ώστε οι προγονικές γενεαλογικές γραμμές των ειδών *Codringtonia* να διαφοροποιηθούν, να επεκτείνουν την εξάπλωση τους, να προσαρμοστούν και να δημιουργήσουν τα είδη *Codringtonia* που βλέπουμε σήμερα.

3.4.3. Φυλογενετικό σήμα και πρότυπα διαφοροποίησης των χαρακτήρων

Λαμβάνοντας υπ' όψιν μόνο τους πληθυσμούς οι οποίοι αντιπροσωπεύονται και στο φυλογενετικό δέντρο (έξι είδη, 19 πληθυσμοί στο σύνολο), και με βάση το αποτέλεσμα της ανάλυσης PVR (Εικόνα 8), φαίνεται ότι η εξέλιξη του μεγέθους του κελύφους (SH1) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το μοντέλο της κίνησης Brown. Αυτό σημαίνει ότι η ποικιλότητα στο μέγεθος αυξάνεται αναλογικά με την φυλογενετική απόσταση (Freckleton, 2009). Επομένως, η ποικιλότητα στο μέγεθος του κελύφους δημιουργήθηκε κατά κύριο λόγο κατά τη διάρκεια των ειδογενετικών γεγονότων (που εξ' ορισμού σχετίζονται με μεγαλύτερες φυλογενετικές αποστάσεις από ότι τα συμβάντα κατά τα οποία διαφοροποιούνται οι πληθυσμοί μεταξύ τους) που συνέβησαν νωρίς στη φυλογενετική ιστορία του γένους (προς τη ρίζα του δέντρου) και στη συνέχεια η ποικιλότητα αυξανόταν ομαλά προς τα άκρα του φυλογενετικού δέντρου (διαφοροποίηση πληθυσμών). Η ανάλυση αυτή επιβεβαιώνει τα ευρήματα της ανάλυσης κατάτμησης της κελυφικής ποικιλότητας (Εικόνα 6), που αναλύθηκαν παραπάνω και τονίζει ότι η ποικιλότητα στο μέγεθος του κελύφους δημιουργήθηκε κυρίως κατά τα πρώτα κλαδογενετικά συμβάντα.

Αντιθέτως, το σχήμα του κελύφους (SH2) φαίνεται να διαφοροποιείται κυρίως προς τα άκρα του φυλογενετικού δέντρου (Εικόνες 3.6 και 3.8), δηλαδή ένα μέρος της ποικιλότητας δημιουργήθηκε κατά τα πρώτα κλαδογενετικά συμβάντα αλλά το μεγαλύτερο μέρος της διαφοροποίησης δημιουργήθηκε σε επίπεδο πληθυσμών (σχετικά πρόσφατη διαφοροποίηση). Αυτό το πρότυπο είναι ακόμη πιο έντονο για το σχήμα του ανοίγματος (SH3). Το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος της ποικιλότητας στο χαρακτήρα αυτόν (SH3) διαμορφώθηκε προς τα άκρα του φυλογενετικού (Εικόνες 3.6 και 3.8) δέντρου, δείχνει την απουσία φυλογενετικού σήματος, κάτι που είναι σε συμφωνία με την τιμή K που επίσης έδειξε απουσία φυλογενετικού σήματος. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής δείχνουν ότι η ποικιλότητα στο μέγεθος του κελύφους διαμορφώθηκε κυρίως κατά τα πρώτα κλαδογενετικά συμβάντα (και άρα αφορά διαφοροποίηση σε επίπεδο είδους), αντίθετα η ποικιλότητα στο σχήμα του ανοίγματος διαμορφώθηκε κυρίως κατά τα πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα (και άρα αφορά διαφοροποίηση σε επίπεδο πληθυσμού) ενώ η ποικιλότητα στο σχήμα του κελύφους ακολούθησε ένα ενδιάμεσο πρότυπο των δύο προαναφερθέντων (Εικόνα 3.8). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία και υποστηρίζεται και από την ανάλυση που προτείνεται από την Stevens *και συν.* (2010) (Εικόνα 3.7). Τα αποτελέσματα, επομένως δείχνουν ότι το μέγεθος του κελύφους είναι χαρακτήρας φυλογενετικά καθορισμένος ενώ το σχήμα (του κελύφους και του

ανοίγματος) όχι και επομένως αυτοί οι δύο χαρακτήρες ενδεχομένως να είναι εκείνοι που μπορούν να προσαρμόζουν οι πληθυσμοί ώστε να μπορούν να αντιμετωπίσουν τις περιβαλλοντικές συνθήκες του μικρό-ενδιαιτήματος (π.χ. μικροκλίμα στις σχισμές των βράχων κλπ).

3.4.4. Μορφολογική ποικιλότητα του κελύφους: η σχετική συμβολή του κλίματος, του χώρου και της φυλογένεση

Σε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί η συμβολή του κλίματος, του χώρου και της φυλογένεσης στην παρατηρούμενη ποικιλότητα στο κέλυφος των ειδών *Codringtonia*, αποκαλύφθηκε ότι το μέγεθος του κελύφους καθορίζεται κυρίως από την αλληλεπίδραση και των τριών αυτών παραγόντων (κλίμα, χώρος, φυλογένεση) (Εικόνα 3.11). Στο σημείο αυτό πρέπει να διευκρινιστεί όμως η έννοια «χώρος». Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3.8 τη σημαντικότερη συμβολή στον καθορισμό του «χώρου» έχουν δύο παράγοντες, ο PCNM2 και ο PCNM3, παράγοντες που σχετίζονται με μεγάλη γεωγραφική κλίμακα, και μπορούν να μεταφραστούν σε μεγάλες διαφορές στο γεωγραφικό πλάτος και μήκος. Επίσης η μεταβλητή SH1 (που αντιπροσωπεύει το μέγεθος του κελύφους) βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με το γεωγραφικό πλάτος (PGLS: R^2=0,39, $F_{2,17}$=11,18 και P<0,001), αυτό σημαίνει ότι τα μεγαλύτερα άτομα βρίσκονται στο νότιο τμήμα της περιοχής εξάπλωσης και τα μικρότερα στο βόρειο (Εικόνα 3.9). Επομένως, φαίνεται να υπάρχει ένα ισχυρό γεωγραφικό πρότυπο, ένα κλινές (που αφορά το μέγεθος του κελύφους) που σχετίζεται με το γεωγρ. πλάτος. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με όσα αναφέρονται από τον Hausdorf *(2003)* για τα χερσαία γαστερόποδα της βόρειο-δυτικής Ευρώπης, για τα οποία έχει βρεθεί ότι αν ληφθούν υπ' όψιν τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών δεν παρατηρείται κανένα γεωγρ. πρότυπο ούτε με το γεωγρ. πλάτος ούτε με το υψόμετρο. Το άλλο κομμάτι που χρειάζεται διευκρίνιση είναι τι αντιπροσωπεύει ο παράγοντας «φυλογένεση» στην ανάλυση αυτή. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3.8 τη σημαντικότερη συνεισφορά στον καθορισμό του παράγοντα «φυλογένεση» έχουν οι μεταβλητές PVR1 και PVR3 (βλ. παράγραφο 3.2.5.2), δύο φυλογενετικές μεταβλητές που σχετίζονται με παλιά κλαδογενετικά συμβάντα (κατά τα πρώτα στάδια της ειδογένεσης). Όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. κεφάλαιο 2), τα είδη *Codringtonia* εμφανίζουν μωσαϊκή κατανομή και η προγονική περιοχή εξάπλωσης, σύμφωνα με το βιογεωγραφικό σενάριο που προτάθηκε, φαίνεται να ήταν η Στερεά Ελλάδα. Αργότερα, ένα γεγονός ειδογένεσης επέτρεψε την εποίκιση της Πελοποννήσου και στη συνέχεια κυρίως μέσω διασποράς αλλά και

βικαριανισμού, τα είδη *Codringtonia* άρχισαν να εξαπλώνονται προς τα νότια και να διαφοροποιούνται προς τις σημερινές τους μορφές. Με τη μελέτη της μορφολογίας προκύπτει επιπρόσθετα, ότι καθώς τα είδη διαφοροποιούνταν προς τα νότια παράλληλα αυξανόταν και το μέγεθος του κελύφους τους. Αυτή η από βορρά προς νότο εξάπλωση-διαφοροποίηση των ειδών *Codringtonia* αντικατοπτρίζεται και στο φυλογενετικό δέντρο του γένους (Εικόνα 3.3), αφού τα είδη που είναι απομακρυσμένα φυλογενετικά είναι απομακρυσμένα και γεωγραφικά στον άξονα βορρά-νότου. Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν, η ισχυρή επικάλυψη (βλ. παράρτημα Εικόνα 3.12) που καταγράφεται μεταξύ «φυλογένεσης» και «χώρου» ερμηνεύοντας τη ποικιλομορφία στο μέγεθος του κελύφους (SH1) είναι πλήρως δικαιολογημένη. Όσον αφορά την επίδραση του κλίματος, είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι τόσο το σύγχρονο όσο και το παρελθοντικό κλίμα (LGM) εξηγούν ένα σημαντικό μέρος (38%) της ποικιλομορφίας στο μέγεθος του κελύφους (Πίνακας 3.8). Ωστόσο, η ανάλυση κατάτμησης της ποικιλότητας έδειξε ότι η επίδραση του κλίματος, ως προς το μέγεθος του κελύφους, δεν μπορεί να διακριθεί από αυτή της φυλογένεσης και του χώρου (βλ. παράρτημα Εικόνα 3.12), που σημαίνει ότι οι κλιματικοί παράγοντες που επιλέχθηκαν είναι μία άλλη έκφραση της μεταβολής του γεωγραφικού πλάτους.

Ο χώρος και η φυλογένεση ερμηνεύουν μικρότερο μέρος της παρατηρούμενης ποικιλότητας στο σχήμα του κελύφους από ότι στο μέγεθος του κελύφους. Επίσης, είναι γεγονός ότι οι παράγοντες «χώρος» και «κλίμα» αλληλοεπηρεάζονται, παρ' όλα αυτά οι κλιματικές συνθήκες του παρελθόντος δείχθηκε ότι μπορούν να ερμηνεύσουν την παρατηρούμενη ποικιλότητα στο σχήμα του κελύφους, ωστόσο η δυνατότητα που έχει αυτός ο παράγοντας στο να ερμηνεύσει την παρατηρούμενη ποικιλότητα είναι συγκρίσιμη και αλληλεπικαλυπτόμενη με αυτή του χώρου (βλ. παράρτημα Εικόνα 3.12). Και σε αυτή την περίπτωση, η μόνη εξήγηση για το πρότυπο αυτό είναι ότι οι παράγοντες «χώρος» και «κλίμα» ερμηνεύουν το ίδιο μέρος της ποικιλότητας στη μεταβλητή SH2, δεδομένου ότι οι διαφορές στην παράμετρο χώρος είναι στην πραγματικότητα διαφορές στις κλιματικές συνθήκες από περιοχή σε περιοχή. Όσον αφορά το σχήμα του ανοίγματος (SH3), η ποικιλότητα που παρατηρείται διαμορφώθηκε στα μεσαία προς πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα και ερμηνεύεται κυρίως από τις χωρικές μεταβλητές και κυρίως από τη μεταβλητή PCNM4, η οποία μπορεί να θεωρηθεί μεσαίας κλίμακας χωρική μεταβλητή (Εικόνα 3.11).

Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις χερσαίων σαλιγκαριών, που έχει βρεθεί ότι οι κλιματικές συνθήκες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της κελυφικής ποικιλότητας (Buckley *και συν.*, 2011; Parent & Crespi, 2009a; Pfenninger,

Eppenstein & Magnin, 2003). Επιπλέον, σε άλλα είδη βραχόβιων σαλιγκαριών με σφαιρικό κέλυφος έχει υποστηριχθεί ότι η παρουσία ή η απουσία ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού του κελύφους (καρίνα, ένας σχηματισμός που μοιάζει με καρίνα στη μεγαλύτερη σπείρα) μπορεί να είναι προσαρμογή στη διαβίωση σε ασβεστόλιθο ή βραχώδες υπόστρωμα (Alonso *και συν.*, 1985; Stankowski, 2011) ή για την κίνηση μέσα σε σχισμές βράχων (Teshima *και συν.*, 2003). Άλλες μελέτες (Cain & Cowie, 1978; Cameron & Cook, 1989; Cook & Jaffar, 1984) έχουν δείξει ότι το σχήμα κελύφους (όπως εκφράζεται από το σχήμα του κελύφους ή SH2 στη συγκεκριμένη μελέτη) παίζει λειτουργικό ρόλο που οδηγεί στην επιλογή μικροενδιαιτήματος, έτσι τα είδη που έχουν πολλές σπείρες τείνουν να δραστηριοποιούνται σε απότομες ή κάθετες επιφάνειες, σε αντίθεση με τα είδη που έχουν λίγες σπείρες τα οποία προτιμούν να κινούνται σε επιφάνειες με μικρή κλίση ή οριζόντιες επιφάνειες. Επιπλέον, όπως υποστήριξαν και οι (Chiba & Kaustuv, 2011), ένα θεωρητικό μοντέλο (Okajima & Chiba, 2011) του σχήματος του κελύφους δείχνει ότι τα είδη με λίγες σπείρες είναι πιο προσαρμοσμένα για την κίνηση σε οριζόντιες επιφάνειες, ενώ και τα είδη με πολλές και αυτά με λίγες σπείρες μπορούν να ισορροπούν καλά σε κάθετες επιφάνειες. Επομένως, είναι πιθανό ότι εκτός από τις κλιματικές συνθήκες και η διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων ασβεστόλιθου (κάθετη ή οριζόντια επιφάνεια) θα μπορούσε να συμβάλει συνολική ποικιλομορφία του κελύφους στα είδη *Codringtonia* με την έννοια ότι ανάλογα με το αν σε μια περιοχή υπάρχουν οριζόντιες ή κάθετες επιφάνειες βράχων το κέλυφος προσαρμόζεται ανάλογα ώστε το ζώο να προσφύεται κατάλληλα στη διαθέσιμη επιφάνεια, ή να επιτρέπει στα σαλιγκάρια να αναζητήσουν καταφύγιο μέσα στις σχισμές βράχων (Moreno-Rueda, 2006). Επίσης, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι οι διάφοροι πληθυσμοί *Codringtonia* έρχονται αντιμέτωποι με διαφορετικές μικροκλιματικές συνθήκες που δεν αντιπροσωπεύονται από τα βιοκλιματικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις της μελέτης αυτής. Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί ότι οι χωρικές μεταβλητές που έχουν χρησιμοποιηθεί στη μελέτη αυτή δεν αντιπροσωπεύουν την τοπογραφική πολυπλοκότητα σε μικρή κλίμακα. Επομένως, υπάρχουν επιπλέον χωρικές και κλιματικές μεταβλητές, που δεν ενσωματώνονται στις αναλύσεις που έγιναν, και που θα μπορούσε θεωρητικά να επηρεάζουν τη συνολική ποικιλομορφία στο κέλυφος, ιδίως στο επίπεδο των πληθυσμών. Ως εκ τούτου, προκειμένου να διαχωριστούν πλήρως η επίδραση του κλίματος από αυτή του χώρου, στη διαμόρφωση της ποικιλότητας των σύνθετων κελυφικών μεταβλητών SH1, SH2 και SH3, χρειάζεται μια μελέτη, σε πολύ μικρότερη γεωγραφική κλίμακα, που να μπορεί να αξιολογήσει τη επίδραση του τοπικού

μικροκλίματος και την τοπογραφική πολυπλοκότητα των περιοχών όπου κατανέμονται οι πληθυσμοί *Codringtonia*. Όπως φάνηκε πρόσφατα, η «κλίμακα» στην οποία πραγματοποιείται μια μελέτη, είναι παράγοντας μείζονος σημασίας για την αποκάλυψη των εξελικτικών προτύπων του σχήματος του κελύφους των χερσαίων σαλιγκαριών (Fiorentino *και συν.*, 2013). Ωστόσο, ακόμη και αν στη μελέτη λαμβάνονταν υπ' όψιν το μικρό-κλίμα και η τοπολογία της περιοχής σε μικρή κλίμακα, ένα πρόβλημα που παραμένει είναι η έλλειψη στοιχείων για τις παλαιοκλιματικές και παλαιογεωγραφικές συνθήκες που επικρατούσαν στην περιοχή μελέτης.

3.4.5. Συμπερασματικά

Με βάση τις κελυφικές μεταβλητές που μετρήθηκαν υπάρχουν κάποια είδη *Codringtonia* που επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό στον μορφολογικό χώρο, και κάποια άλλα που καταλαμβάνουν τα άκρα του μορφολογικού νέφους και μπορούν να διακριθούν σαφώς από άλλα. Στο μέγεθος του κελύφους είναι εμφανής η ύπαρξη ενός γεωγραφικού πρότυπου που σχετίζεται με το γεωγραφικό πλάτος. Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό τα είδη με μικρότερο μέγεθος κατανέμονται βόρεια, ενώ τα μεγαλύτερου μεγέθους νότια. Για τη μελέτη της συνολικής μεταβλητότητας του κελύφους, δεν μπορεί να θεωρήσει κανείς ότι ένας και μοναδικός πληθυσμός ανά είδος, μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικός του είδους και αυτό γιατί παρατηρείται μεγάλη ποικιλότητα στο κέλυφος σε ενδο-ειδικό επίπεδο. Ως εκ τούτου, στις μελέτες που διερευνάται η εξέλιξη ενός γνωρίσματος στο χώρο και το χρόνο, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν και η ενδο-ειδική ποικιλότητα. Το μέγεθος του κελύφους (SH1) στους κλάδους του γένους *Codringtonia*, είναι χαρακτήρας φυλογενετικά καθοριζόμενος, σχετίζεται με τα πρώτα γεγονότα ειδογένεσης και επηρεάζεται έντονα από τη χωρική μεταβλητότητα μεγάλης γεωγραφικής κλίμακας. Επίσης η επίδραση του κλίματος σε αυτό το γνώρισμα δεν μπορεί να απεμπλακεί από αυτή της φυλογένεσης και του χώρου. Το σχήμα του κελύφους (SH2) και του ανοίγματος (SH3) είναι χαρακτήρες που δεν φαίνεται να περιορίζονται φυλογενετικά, φαίνεται να έχουν διαφοροποιηθεί ως επί το πλείστον προς το μέσο και τα άκρα των κλάδων του φυλογενετικού δέντρου και έτσι η διαφοροποίηση στο σχήμα αφορά κυρίως το επίπεδο των πληθυσμών. Αυτή η πρόσφατη διαφοροποίηση είναι ιδιαιτέρως εμφανής για το σχήμα του ανοίγματος. Η ποικιλομορφία που καταγράφεται στο σχήμα του κελύφους (SH2) ερμηνεύεται από το κλίμα και το χώρο που σε μεγάλο βαθμό επικαλύπτονται. Τέλος, η ποικιλομορφία που καταγράφεται στο σχήμα του

ανοίγματος (SH3) ερμηνεύεται κυρίως από μεσαίας ως μικρής κλίμακας χωρικές μεταβλητές. Ωστόσο, το να απεμπλακεί πλήρως η επίδραση του κλίματος από αυτή του χώρου, στη μελέτη της κελυφικής ποικιλότητας, είναι πολύ πιθανό να απαιτεί την ενσωμάτωση πληροφορίας για το χώρο και το κλίμα σε πολύ μικρή κλίμακα που να αφορά τις τοπικές συνθήκες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΩΝ

The most impressive aspect of the living world is its diversity.
Wherever one looks in nature, one finds uniqueness.
Ernst Mayer

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ζώα στο φυσικό τους περιβάλλον έρχονται αντιμέτωπα με μεγάλης ή μικρής διάρκειας μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών για την αντιμετώπιση των οποίων έχουν καταγραφεί τρία είδη αποκρίσεων: η αποφυγή, η συμμόρφωση και η ρύθμιση (Willmer, Stone & Johnston, 2000). Υπάρχουν τέσσερα βασικά, διαφορετικά και αλληλεπιδρώντα επίπεδα, στα οποία λαμβάνουν χώρα οι παραπάνω αποκρίσεις: το επίπεδο της **συμπεριφοράς**, της **φυσιολογίας**, της **βιοχημείας** και της **μορφολογίας**.

Η αποφυγή αφορά τόσο τον χώρο όσο και τον χρόνο. Η αποφυγή στον χώρο απορρέει από τη συμπεριφορά (π.χ. εύρεση ενός λιγότερου «πιεστικού» ενδιαιτήματος μέσα σε ένα ευρύτερο «πιεστικό» περιβάλλον), ενώ η αποφυγή στον χρόνο μπορεί να απαιτεί πολυπλοκότερες αποκρίσεις (π.χ. πριν την είσοδο στη χειμερία νάρκη απαιτείται αποθήκευση τροφής, εύρεση καταφυγίου, μείωση της θερμοκρασίας του σώματος και του μεταβολικού ρυθμού κ.ά.) (Willmer *και συν.*, 2000). Η συμμόρφωση αφορά κυρίως μεταβολές σε βιοχημικό και φυσιολογικό επίπεδο, ενώ αντίθετα η ρύθμιση, μπορεί να απαιτεί ενεργειακά δαπανηρές μεταβολές σε όλα τα επίπεδα. Φυσικά, μια απόλυτη γενίκευση για τα πρότυπα αποφυγής, συμμόρφωσης και ρύθμισης είναι αδύνατο να γίνει αλλά θα μπορούσε να πει κανείς ότι οι διαφορετικές στρατηγικές έχουν την τάση να παρουσιάζονται σε διαφορετικά φύλα με διαφορετικό σχεδιασμό σώματος και σε διαφορετικά ενδιαιτήματα. Για παράδειγμα, στα χερσαία ενδιαιτήματα, στα μικρού μεγέθους ζώα με μαλακό σώμα, είναι κοινές οι στρατηγικές αποφυγής όπως η νάρκη, η διάπαυση, η εγκύστωση κ.ά. (Willmer *και συν.*, 2000).

Σε όποιο περιβάλλον και αν ζει ένας οργανισμός (μεταξύ άλλων) έχει δύο **προβλήματα-κλειδιά** που πρέπει να αντιμετωπίσει: την **παραγωγή ενέργειας** για την κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών και τη **διατήρηση του υδατικού του ισοζυγίου**. Στα χερσαία ενδιαιτήματα, είναι σύνηθες κάποια ζώα, όπως τα χερσαία γαστερόποδα, κάποια έντομα κ.ά., να εμφανίζουν κυκλικά πρότυπα δραστηριότητας, δηλαδή να είναι δραστήρια όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές ενώ όταν αυτές γίνονται αντίξοες (π.χ. πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές θερμοκρασίες, ξηρασία κ.ά.) να παραμένουν σε μια κατάσταση «νάρκης» (διάπαυση, διαχείμαση, κατάσταση λάρβας ή πούπας για τα έντομα). Κατά τη **διάπαυση**, μια σειρά από **μεταβολές** λαμβάνουν χώρα τόσο **σε κυτταρικό επίπεδο** όσο **και σε επίπεδο φυσιολογίας και συμπεριφοράς**. Τα βασικά προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπίσει ένα ζώο

κατά την περίοδο αυτή είναι η κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών και η ελαχιστοποίηση των απωλειών του νερού (Willmer *και συν.*, 2000).

4.1.1. Υδατικό ισοζύγιο

Το νερό αποτελεί το 60-90% του σωματικού βάρους των ζώων (το ποσοστό αυτό είναι μεγαλύτερο για τα ασπόνδυλα με μαλακό σώμα και μικρότερο για τα ζώα που έχουν κάποιο είδος σκελετικών στοιχείων όπως τα σπονδυλωτά και τα αρθρόποδα). Είναι σαφές ότι η διατήρηση του υδατικού περιεχόμενου των ζώων καθώς και η διατήρηση σε σχεδόν σταθερά επίπεδα της συγκέντρωσης των ενδοκυττάριων υγρών είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Τα ζώα που ζουν στη χέρσο, γενικά προσλαμβάνουν νερό με την τροφή και την πόση ενώ κάποια συνεισφορά στο υδατικό ισοζύγιο έχει και το μεταβολικό νερό, δηλαδή νερό που προκύπτει μέσα από οξειδωτικές διαδικασίες. Αντίθετα, απώλεια νερού παρατηρείται εξαιτίας των διάφορων εκκρίσεων (π.χ. βλέννα, σάλιο, αμυντικά υγρά κ.ά.), με τα περιττώματα και τα ούρα, από το δέρμα και το αναπνευστικό σύστημα αλλά και κατά την αναπαραγωγή. Ο ρυθμός απώλειας νερού σε κάποια χερσαία ζώα με μαλακό σώμα είναι υψηλός και για τον λόγο αυτόν λιπαίνουν συνεχώς το δέρμα τους με βλέννα από τους επιδερμικούς αδένες ενώ σε περιόδους κατά τις οποίες το νερό είναι περιορισμένο, όπως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, κάποια από αυτά τα ζώα εισέρχονται σε διάπαυση. Ειδικά τα χερσαία γαστερόποδα, κατά τη διάπαυση καταφέρνουν να μειώνουν (ως και να ελαχιστοποιούν) τις απώλειες νερού *(Machin, 1967)*. Η διάπαυση είναι μια κατάσταση μη δραστηριότητας για τα χερσαία σαλιγκάρια κατά την οποία το στόμιο του κελύφους παραμένει καλυμμένο με το επίφραγμα, έναν σχηματισμό που περιέχει ασβέστιο και βλέννα. Τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους κατά την περίοδο αυτή αποβάλλονται χάρη στο αποδοτικό απεκκριτικό τους σύστημα, που αποτελείται από έναν νεφρό και εμφανίζει μεγάλη ποικιλία προσαρμογών. Η απέκκριση όμως, περιλαμβάνει και την απώλεια μεγάλης ποσότητας νερού, έτσι για τη διατήρηση του υδατικού ισοζυγίου, στα υγρά περιβάλλοντα αποβάλλονται υπό-οσμωτικά ούρα, ενώ στα ξηρά περιβάλλοντα τα απόβλητα σχηματίζουν μια ξηρή πάστα. Με τον τρόπο αυτό τα πνευμονοφόρα μπορούν να αποβάλουν τα αζωτούχα παραπροϊόντα τους σε μια μεγάλη ποικιλία κλιματικών συνθηκών. Τα χερσαία σαλιγκάρια όταν βρίσκονται σε διάπαυση μπορούν να επιβιώνουν χωρίς να εκκρίνουν τα αζωτούχα προϊόντα του μεταβολισμού τους (κάποια αποβάλουν αέρια αμμωνία μέσα από το κέλυφος) άλλα αντίθετα τα

αποθηκεύουν, ιδιαίτερα την ουρία. Έτσι, η οσμωμοριακότητα των υγρών του σώματος αυξάνεται, σε επίπεδα τέτοια ώστε να προκαλεί καταστολή της νευρονικής δραστηριότητας και του καρδιακού ρυθμού στο 60% του φυσιολογικού (Willmer *και συν.*, 2000).

4.1.2. Αρχές μεταβολισμού-παραγωγή ενέργειας

Όλα τα μακρομόρια ενός κυττάρου και κατ' επέκταση ενός οργανισμού προέρχονται από μεταβολικές αντιδράσεις. Έτσι μέσω των αναβολικών διαδικασιών συντίθενται τα τελικά προϊόντα ενώ μέσω των καταβολικών αντιδράσεων παράγεται ενέργεια απαραίτητη για τις φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου. Τα φωσφογόνα είναι ενώσεις υψηλής ενέργειας που μεσολαβούν για τη μεταφορά ενέργειας στους οργανισμούς. Από αυτά η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ των αντιδράσεων που παράγουν ενέργεια και αυτών που την καταναλώνουν. Το ATP παράγεται είτε μέσω αερόβιων (αερόβιος μεταβολισμός) είτε μέσω αναερόβιων μονοπατιών (αναερόβιος μεταβολισμός). Ο αερόβιος μεταβολισμός είναι αποδοτικότερος (36-38 μόρια ATP ανά μόριο υποστρώματος) σε σχέση με τον αναερόβιο (2-6 μόρια ATP ανά μόριο υποστρώματος) και για αυτό τα περισσότερα μετάζωα χρησιμοποιούν τον αερόβιο μεταβολισμό για την κάλυψη των περισσότερων ενεργειακών τους αναγκών. Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο, ότι τα περισσότερα ζώα καταφεύγουν σε αναερόβιες διαδικασίες για να παράγουν ένα μέρος της ενέργειας που τους είναι απαραίτητη (π.χ. όταν ο ρυθμός κατανάλωσης ενέργειας είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό παραγωγής της) ή όταν βρεθούν σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Στα περισσότερα περιβάλλοντα η ανάγκη για αναερόβιο μεταβολισμό είναι παροδική (π.χ. όσο διαρκούν οι συνθήκες έλλειψης οξυγόνου ή όταν υπάρξει ανάγκη για ξαφνική και έντονη δραστηριότητα) (Willmer *και συν.*, 2000).

4.1.2.1. Αναερόβιος μεταβολισμός

Η παραγωγή της ενέργειας γίνεται με τη γλυκόλυση που επιτελείται στο κυτταρόπλασμα και σε περίπτωση έλλειψης οξυγόνου μπορεί να είναι αποκλειστικά αναερόβια διαδικασία. Τα «καύσιμα» της γλυκόλυσης είναι οι υδατάνθρακες και τα αμινοξέα και τελικά παράγεται μια μεγάλη ποικιλία τελικών προϊόντων. Η γλυκόζη αποτελεί το κύριο καύσιμο της γλυκόλυσης (τη γλυκολυτική οδό επίσης μπορούν να ακολουθήσουν και άλλα σάκχαρα όπως η γαλακτόζη και η φρουκτόζη) και αποθηκεύεται με τη μορφή γλυκογόνου σε πολλούς ιστούς. Από τη γλυκόλυση

παράγεται πυροσταφυλικό οξύ το οποίο (αν το τελικό προϊόν είναι το γαλακτικό οξύ) μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) ενώ από το πυροσταφυλικό οξύ μπορούν να παραχθούν και άλλα τελικά προϊόντα (π.χ. αιθανόλη, ορισμένα ιμινοξέα όπως οκταπίνη, αλανοπίνη, στρομβίνη, λυσοπίνη).

Η αναγωγή του πυροσταφυλικού σε L-γαλακτικό και D-γαλακτικό γίνεται από διαφορετικά NAD-εξαρτώμενα ένζυμα την L-γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH), την D- γαλακτική αφυδρογονάση (D-LDH) και από NAD-ανεξάρτητα ένζυμα. Η L-LDH αποτελεί μία από τις καλύτερα μελετημένες οικογένειες ενζύμων (έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο σε σπονδυλωτά και λιγότερο σε ασπόνδυλα) ενώ αντίθετα πολύ λίγα είναι γνωστά για τη δομή, τη λειτουργία και την κινητική της D-LDH (Flick & Konieczny, 2002).

4.1.2.2. Αερόβιος μεταβολισμός

Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό γίνεται πλήρης οξείδωση της γλυκόζης με τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο. Το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακέτυλο-συνένζυμο Α, αντί για γαλακτικό οξύ (αναερόβιος μεταβολισμός), το οποίο στη συνέχεια λειτουργεί σαν υπόστρωμα σε μια σειρά αντιδράσεων που ονομάζεται κύκλος του Krebs και πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Ο κύκλος του Krebs αποτελεί το κύριο μονοπάτι παραγωγής ενέργειας ενώ ταυτόχρονα από αυτή τη σειρά αντιδράσεων παράγονται και πολλές άλλες ενδιάμεσες ενώσεις οι οποίες συμμετέχουν στον σχηματισμό άλλων βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες. Τα καύσιμα του αερόβιου μεταβολισμού είναι η γλυκόζη (και τα σχετικά σάκχαρα) αλλά και τα λιπίδια, τα αμινοξέα, το γαλακτικό οξύ και άλλες ενώσεις όπως το οξαλοξικό οξύ και το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ.

Τα λιπίδια με τη μορφή των λιπαρών οξέων αποτελούν τις πιο κοινές ενώσεις του μεταβολισμού των ζώων. Τα λιπαρά οξέα αποθηκεύονται σε συνδυασμό με τη γλυκερόλη ως τριγλυκερίδια ή τριακυλογλυκερόλες οι οποίες αποτελούν υψηλής συγκέντρωσης καύσιμα. Στα σπονδυλωτά, η τριακυλογλυκερόλη υδρολύεται σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη με τη βοήθεια ενζύμων που ονομάζονται λιπάσες (λιπόλυση). Η γλυκερόλη που σχηματίζεται από τη λιπόλυση μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεριναλδεϋδη και τελικά μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ (με τη γλυκόλυση) ή σε γλυκόζη (με τη γλυκονεογένεση). Η σημασία των λιπών στην αποθήκευση ενέργειας είναι τεράστια καθώς η ποσότητα του ATP που σχηματίζεται ανά mol υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι ανά mol γλυκογόνου ή

γαλακτικού οξέος (129 και 403 mol ATP ανά mol παλμιτικού οξέος και τριακυγλυκερόλης αντίστοιχα).

Τα αμινοξέα που παράγονται από τη διάσπαση των πρωτεϊνών μπορούν επίσης να μεταβολιστούν στα μονοπάτια του αερόβιου μεταβολισμού αλλά σε αυτή την περίπτωση η παραγωγή ATP είναι σχετικά χαμηλή.

4.1.3. Η φυσιολογία της διάπαυσης

Πολλοί οργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον είναι εκτεθειμένοι σε μεγάλες αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών, αλλαγές που ποικίλουν από την επικράτηση ιδιαίτερα ευνοϊκών συνθηκών τέτοιων ώστε να προάγεται η γρήγορη αύξηση και ανάπτυξη, ως πολύ δυσμενών συνθηκών ασυμβίβαστων με την ύπαρξη «φυσιολογικής» ζωής.

Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνονται αντίξοες για την επιβίωση, πολλά είδη οργανισμών (σπονδυλωτά και ασπόνδυλα) καταφεύγουν σε ένα είδος αερόβιας νάρκης, τη διάπαυση. Η διάπαυση μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες (π.χ. ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, έλλειψη τροφής κ.ά.) και ποικίλει σε διάρκεια ανάλογα με το είδος του οργανισμού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Storey, 2002). Κομβικό σημείο κατά τη διάπαυση είναι η μείωση του μεταβολικού ρυθμού του ζώου.

Ο μεταβολικός ρυθμός αποτελεί μέτρο για τη συνολική παραγωγή ενέργειας στη μονάδα του χρόνου και είναι μία από τις πιο κοινές μεταβλητές που μετρώνται σε μελέτες φυσιολογίας. Επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως είναι το επίπεδο της δραστηριότητας, η θερμοκρασία, το μέγεθος του σώματος, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου κ.ά. Η μείωση του μεταβολικού ρυθμού (υπομεταβολισμός), παρατηρείται σε πολλές στρατηγικές επιβίωσης όπως για παράδειγμα όταν οι οργανισμοί εισέρχονται σε κατάσταση ημερήσιας ή εποχικής νάρκης, όταν εγκλιματίζονται σε ασυνήθιστες συνθήκες ξηρασίας, ζέστης ή κρύου, όταν στερούνται τροφής κ.ά.

Κατά τη διάρκεια των τριών προηγούμενων δεκαετιών η φυσιολογία της διάπαυσης (γενικά του υπομεταβολισμού) μελετήθηκε εκτενώς, σε μεγάλη ποικιλία οργανισμικών συστημάτων και φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλος βαθμός συντηρητικότητας στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην επαγωγή του υπομεταβολισμού κατά μήκος της φυλογένεσης. Παρ' όλα αυτά, τα καλύτερα μελετημένα συστήματα στο θέμα αυτό ως σήμερα είναι τα άνουρα αμφίβια και τα

χερσαία γαστερόποδα, η δεύτερη ομάδα είναι αυτή στην οποία επικεντρώνεται η μελέτη αυτή.

Τα χερσαία γαστερόποδα είναι ικανά να επιβιώνουν σε μεγάλη ποικιλία (ακόμα και ακραίων) περιβαλλοντικών συνθηκών. Όταν η διαθεσιμότητα του νερού γίνεται χαμηλή τότε εισέρχονται σε διάπαυση και παραμένουν σε αυτή την κατάσταση για μερικούς μήνες, μέχρις ότου οι συνθήκες γίνουν και πάλι ευνοϊκές (Machin, 1975). Η ικανότητα τους να παραμένουν σε διάπαυση για εκτεταμένες περιόδους εξαρτάται από την ικανότητα τους να προκαλούν υπομεταβολισμό. Ο υπομεταβολισμός χαρακτηρίζεται από τρεις βασικές αρχές:

- ✓ ολική μείωση του μεταβολικού ρυθμού, τυπικά 70-80% μείωση σε σχέση με τον μεταβολικό ρυθμό ενεργού ζώου σε ηρεμία
- ✓ διαφορικός έλεγχος πολλών μεταβολικών διεργασιών στο κύτταρο έτσι ώστε η ενέργεια να χρησιμοποιείται πρωτίστως για βασικές λειτουργίες του κυττάρου (π.χ. τη διατήρηση διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης) ενώ άλλες λειτουργίες (π.χ. κυτταρική διαίρεση) ως έναν βαθμό καταστέλλονται
- ✓ ενεργοποίηση μηχανισμών που προστατεύουν το κύτταρο και διατηρούν τη ζωτικότητα του για όλο αυτό το διάστημα.

Η μείωση του μεταβολικού ρυθμού επιτυγχάνεται κατά ένα μέρος από τη μείωση της κατανάλωσης ενέργειας για φυσιολογικές λειτουργίες (π.χ. παρατηρείται μείωση του ρυθμού της αναπνοής και του καρδιακού ρυθμού). Επίσης διάφοροι εξωγενείς παράγοντες επιδρούν στη μείωση του μεταβολικού ρυθμού όπως η μερική πίεση του οξυγόνου (O_2) και του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), το pH και η μείωση της θερμοκρασίας. Για παράδειγμα, κατά τη διάπαυση στα σαλιγκάρια τα επίπεδα CO_2 του περιβάλλοντος προκαλούν μείωση του εξωκυτταρικού pH και στη συνέχεια μείωση του μεταβολισμού (Rees & Hand, 1990; Rees & Hand, 1991). Πολύ σημαντική είναι και η ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, καθώς γίνεται μια συντονισμένη καταστολή των μονοπατιών που παράγουν ATP σε σχέση με αυτά που το καταναλώνουν, γίνεται δηλαδή μια «επαναξιολόγηση» της χρήσης ενέργειας στο κύτταρο (κάποιες λειτουργίες καταστέλλονται) και ίσως αλλάξουν και οι μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται σαν πηγή ενέργειας.

Επομένως η διάπαυση συνοδεύεται από αλλαγές σε πολλά επίπεδα: κυτταρικό, επίπεδο φυσιολογίας και συμπεριφοράς. Σε κυτταρικό επίπεδο λαμβάνουν χώρα μια σειρά από σημαντικές αλλαγές, οι σημαντικότερες είναι:

- ✓ Ο έλεγχος του μεταβολισμού με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών (Storey, 2002; Storey & Storey, 2010).

- ✓ Η καταστολή της σύνθεσης και της διάσπασης των πρωτεϊνών. Μια από τις πρώτες αποκρίσεις των περισσότερων κυττάρων όταν αυτά βρεθούν σε συνθήκες στρες ή έλλειψης ενέργειας/θρεπτικών συστατικών είναι η καταστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών *(Storey & Storey, 2004)*. Αφού καταστέλλεται η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι λογικό να καταστέλλεται και η διάσπαση τους ώστε οι ποσότητες των περισσότερων πρωτεϊνών να σταθεροποιούνται για το χρονικό διάστημα του υπομεταβολισμού *(Ramnanan και συν., 2009)*.

- ✓ Η ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης με σκοπό τον έλεγχο του μεταβολισμού. Η διατήρηση της ενέργειας είναι ζωτικής σημασίας καθώς είναι λογικό ότι όση περισσότερη ενέργεια μπορεί να διατηρήσει το ζώο τόσο μεγαλύτερο θα είναι και το χρονικό διάστημα που θα μπορέσει να παραμείνει σε διάπαυση (Storey & Storey, 2010).

- ✓ Η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων. Κατά τον υπομεταβολισμό παρατηρείται γενική καταστολή της έκφρασης των γονιδίων. Παρ' όλα αυτά όμως, υπάρχουν κάποια γονίδια η έκφραση των οποίων ενισχύεται, όπως είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη γλυκόζη, για αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες, για τις πρωτεΐνες του θερμικού σοκ κ.ά. (Storey & Storey, 2004).

Η φυσιολογία της διάπαυσης έχει μελετηθεί σε αρκετά είδη σαλιγκαριών του ελλαδικού χώρου, όπως το *Helix lucorum* (Michaelidis, 2002; Michaelidis *και συν.*, 2007), το *Helix aspersa* και το *Helix figulina* (Kotsakiozi *και συν.*, 2012a), το *Albinaria caerulea* (Giokas *και συν.*, 2005) και το *Codringtonia helenae* (Giokas *και συν.*, 2007). Από τις μελέτες αυτές φαίνεται ότι η περίοδος της διάπαυσης διαφέρει αρκετά από άποψη φυσιολογίας από την περίοδο της δραστηριότητας των ζώων. Για παράδειγμα, κατά τη διάπαυση φαίνεται αύξηση της δραστικότητας της LDH (Giokas *και συν.*, 2007; Giokas *και συν.*, 2005; Kotsakiozi *και συν.*, 2012a). Ειδικά για το *C. helenae* (βλ. επίσης κεφάλαιο 1) φαίνεται ότι οι 4 εποχές του έτους μπορούν να διακριθούν καλά με βάση τη μεταβολή στα επίπεδα των λιπιδίων, του γλυκογόνου και των πρωτεϊνών στους ιστούς των ζώων, καθώς επίσης πολύ σημαντικό είναι και το γεγονός ότι το είδος αυτό φαίνεται να χάνει νερό κατά τη θερινή διάπαυση. Η

απώλεια αυτή του υδατικού περιεχομένου σε συνδυασμό με τη μείωση των πληθυσμών του είδους οδήγησε τους συγγραφείς στο να υποθέσουν ότι μάλλον η συμπεριφορική οικολογία του είδους αυτού είναι υπολειμματική και να θέσουν ερωτήματα που αφορούν τον κίνδυνο εξαφάνισης του, δεδομένων και της κλιματικής αλλαγής αλλά και του κατακερματισμού των βιοτόπων λόγω ανθρώπινων δραστηριοτήτων.

4.1.5. Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins)

Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins-Hsps) κωδικοποιούνται από γονίδια η έκφραση των οποίων επάγεται κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η αφυδάτωση, η υποξία, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, τα παράσιτα, το ωσμωτικό σοκ, οι αλλαγές στο pH κ.ά. (Tine *και συν.*, 2010). Το όνομα τους οφείλεται στον τρόπο με τον οποίο αρχικά ανακαλύφθηκαν όταν το 1962 βρέθηκε να εκφράζονται στο έντομο *Drosophila melanogaster* μετά από έκθεση των ατόμων σε υψηλή θερμοκρασία. Το όνομα «πρωτεΐνες του θερμικού σοκ» αργότερα αντικαταστάθηκε (αν και ακόμη χρησιμοποιείται ευρέως) από το «πρωτεΐνες του στρες» (stress proteins) (Gething & Sambrook, 1992) λόγω του ότι η έκφραση τους δεν επάγεται μόνο από το θερμικό σοκ αλλά και από άλλους στρεσογόνους παράγοντες.

Στο σημείο αυτό βέβαια τίθεται ένα βασικό ερώτημα: τι θεωρείται στρεσογόνα κατάσταση; Γενικά ως στρες ορίζεται μια κατάσταση που διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία ενός βιολογικού συστήματος ή μειώνει την αρμοστικότητα (fitness) του (Hoffmann & Parsons, 1991). Συνήθως με τον όρο στρες νοείται κάποιος περιβαλλοντικός παράγοντας ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και ενδογενείς (intrinsic) παράγοντες που προκαλούν στρες όπως είναι το γενετικό στρες (ενδογαμία, επιβλαβείς μεταλλαγές) και η γήρανση. Η μελέτη αυτή όμως επικεντρώνεται μόνο στο περιβαλλοντικό στρες. Επομένως, σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, οι περιβαλλοντικοί (στρεσογόνοι) παράγοντες μπορούν να λειτουργήσουν σαν εξελικτικές πιέσεις σε έναν πληθυσμό και να προκαλέσουν προσαρμογή.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις Hsps βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι τα θηλαστικά, και δείχνουν μεγάλη συντηρητικότητα. Ως προς τις κωδικές τους περιοχές τουλάχιστον, παρουσιάζουν πολύ μικρή μεταβλητότητα (variation) μεταξύ των ειδών ενώ υπάρχει κάποια

πολυμορφικότητα (στις κωδικές περιοχές αλλά κυρίως στις μη κωδικές) και εντός των ειδών (Bettencourt *και συν.*, 2002). Οι Hsps διακρίνονται σε ομάδες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι κύριες ομάδες είναι οι: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 και οι μικρές HSPs (κάτω από 30 kDa). Οι Hsp70 θεωρούνται η κύρια οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών στα ευκαρυωτικά κύτταρα και υπάρχουν αρκετές ισομορφές αυτής της ομάδας. Επίσης οι Hsp70 είναι και η πιο καλά μελετημένη ομάδα πρωτεϊνών θερμικού σοκ και είναι η ομάδα εκείνη που μελετήθηκε και στην εργασία αυτή. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι οι Hsps εκφράζονται ως ένα βαθμό, στα κύτταρα των οργανισμών ακόμα και κάτω από μη στρεσογόνες συνθήκες και συμμετέχουν σε πολύ σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων όπως η αποτροπή του συσσωματώματος των πρωτεϊνών, η αποδόμηση (degradation) των κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, η μεταφορά, η αναδίπλωση κ.ά. (Sørensen, Kristensen & Loeschcke, 2003). Η σημασία των Hsps στην προσαρμοστικότητα των οργανισμών έχει μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια και έχει δειχθεί ότι η ικανότητα πολλών ειδών να αντιστέκονται στην αύξηση της θερμοκρασίας βελτιώνεται με την έκφραση των Hsps (Sørensen *και συν.*, 2003). Παρά το γεγονός ότι οι Hsps μελετώνται αρκετά τα τελευταία χρόνια, λίγες είναι οι οικολογικές μελέτες που περιλαμβάνουν φυσικούς πληθυσμούς. Οι φυσικοί πληθυσμοί όμως είναι μονίμως εκτεθειμένοι σε περιβαλλοντικές αλλαγές αλλά και σε γενετικές απειλές (γενετικό στρες- genetic stress- όπως είναι η ενδογαμία), οι Hsps είναι σημαντικοί παράγοντες για τη διατήρηση της ομοιόστασης κατά τις περιβαλλοντικές αυτές αλλαγές. Δεδομένου ότι οι Hsps επηρεάζουν την αρμοστικότητα κάτω από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, η έκφραση τους είναι πολύ σημαντικός παράγοντας με οικολογική και εξελικτική σημασία.

4.1.6. Στόχοι-Ερωτήματα

Σκοπός του κεφαλαίου αυτού ήταν να διερευνηθεί το εύρος των φυσιολογικών αποκρίσεων εντός του γένους *Codringtonia* προκειμένου να εντοπιστεί τόσο η γεωγραφική όσο και η φυλογενετική κλίμακα στην οποία οι αποκρίσεις αυτές διαφοροποιούνται. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

1. Η εποχική μεταβολή στη βιοχημική σύσταση και στη δραστικότητα του ενζύμου LDH και στο υδατικό περιεχόμενο σε είδη *Codringtonia* για να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές ανάμεσα στις περιόδους δραστηριότητας και σε αυτές που τα ζώα είναι ανενεργά (διάπαυση-διαχείμαση).

2. Η σύγκριση μεταξύ των ειδών για όλους τους παραπάνω παράγοντες για να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές μεταξύ των ειδών.

3. Ο ρυθμός απώλειας νερού για όλα τα είδη *Codringtonia* καθώς υπάρχουν ευρήματα που δείχνουν ότι ένα από τα είδη δεν μπορεί να διαχειριστεί αποτελεσματικά τα αποθέματα νερού κατά τη θερινή διάπαυση.

4. Τα επίπεδα έκφρασης Hsp70 σε όλα τα είδη *Codringtonia* ως μέτρο της «πίεσης» που υφίστανται τα άτομα μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία.

5. Η σχέση όλων των παραπάνω παραγόντων με αβιοτικούς παράγοντες (κλιματικές και χωρικές παραμέτρους) για να διαπιστωθεί ο ρόλος των αβιοτικών παραγόντων στη δημιουργία των όποιων προτύπων παρατηρηθούν.

6. Τέλος όλα τα παραπάνω μελετήθηκαν λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών.

Το ευρύτερο ερώτημα στο οποίο προσπαθεί να δώσει απάντηση μια τέτοιου είδους προσέγγιση είναι αν τελικά οι αποκρίσεις των ειδών είναι αποτέλεσμα προσαρμογής στο περιβάλλον, φυλογενετικά καθορισμένες ή απλά ένα τυχαίο πρότυπο.

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα πραγματοποιηθήκαν τρεις ομάδες μετρήσεων και αναλύσεων οι οποίες συνοπτικά είναι:

1. Βιοχημικές αναλύσεις.
2. Εποχική μεταβολή του υδατικού περιεχόμενου και εκτίμηση του ρυθμού απώλειας του νερού.
3. Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Στη συνέχεια περιγράφεται λεπτομερώς η μεθοδολογία για την κάθε ομάδα πειραμάτων, το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε καθώς και η στατιστική επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε. Για τη στατιστική επεξεργασία του συνόλου των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το προγραμματιστικό περιβάλλον R (R Development Core Team, 2011).

4.2.1. Βιοχημικές αναλύσεις

Οι βιοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών, του γλυκογόνου, των λιπιδίων και της δραστικότητας του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Οι δειγματοληψίες έγιναν σε εποχική βάση. Για την κάθε μέτρηση χρησιμοποιούνταν τρεις ιστοί ανά άτομο (πόδας, ηπατοπάγκρεας και γεννητικό σύστημα) και 3-10 (συνήθως 5-6) άτομα ανά ιστό, ανά πληθυσμό και ανά εποχή για την κάθε μέτρηση. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι ο σχεδιασμός των πειραμάτων σε αυτό το μέρος της μελέτης (εποχικότητα των δειγματοληψιών, αριθμός ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ανά εποχή, οι μεταβλητές που επιλέχθηκαν να μετρηθούν και η προσαρμογή των πειραματικών πρωτοκόλλων π.χ. αραιώσεις κ.ά.) βασίστηκε στα προκαταρκτικά αποτελέσματα που λήφθηκαν από παρόμοια μελέτη για άλλα είδη χερσαίων σαλιγκαριών όπως αναφέρονται από τους Kotsakiozi *και συν.* (2012a). Αναλυτικά πληροφορίες για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν παρέχονται στον Πίνακα 4.1 ενώ ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε μέτρηση αναφέρονται στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.1. Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της εποχικής μεταβολής στη βιοχημική σύσταση, στη δραστικότητα της LDH και στο υδατικό περιεχόμενο των ιστών. Παρατίθενται ακόμη κλιματικά και άλλα χαρακτηριστικά των σταθμών δειγματοληψίας. Συντμήσεις: Υψόμ: Υψόμετρο, ετ.: ετήσια μέγ.: μέγιστη, ελαχ.: ελάχιστη, Υγρότ.: υγρότερος μήνας, Ξηρότ.: ξηρότερος μήνας, καλ: καλοκαίρι, αν: άνοιξη, χειμ: χειμώνας και φθ: φθινόπωρο.

Θερμοκρασία											
Είδος	**πληθυσμός**	**Υψομ. (m)**	**Γεωγρ. Πλάτος**	**Γεωγρ. Μήκος**	**Μέση ετ.**	**Μέγ.**	**Ελάχ.**	**Μέση Υγρότ.**	**Μέση Ξηρότ.**	**Μεγ_χειμ**	**Μεγ_αν**
C. eucineta	Μυστράς	272	37.069405	22.382069	16,0	29,9	4,8	10,8	23,1	14,1	22,8
C. parnassia	Γραβιά	575	38.6492	22.4154	14,4	31,1	1,4	7,7	22,6	10,9	22,9
C. intusplicata	Διακοπτό	55	38.18046	22.19436	16,6	31,7	4,3	10,8	24,3	14,4	24,1
C. helenae	Νεστάνη	647	37.532778	22.399722	13,5	29,7	1,2	7,6	21,4	11,0	21,9
Είδος	**πληθυσμός**	**Μεγ_καλ**	**Μεγ_φθ**	**Ελαχ_χειμ**	**Ελαχ_αν**	**Ελαχ_καλ**	**Ελαχ_φθ**	**Μέση_χειμ**	**Μέση_αν**	**Μέση_καλ**	**Μέση_φθ**
C. eucineta	Μυστράς	29,9	27,1	4,8	6,4	15,7	9,5	9,9	14,0	23,1	17,5
C. parnassia	Γραβιά	31,1	26,6	1,4	3,6	14,8	6,8	6,8	12,6	23,0	15,6
C. intusplicata	Διακοπτό	31,7	28,3	4,3	6,1	16,6	9,3	10,0	14,7	24,3	18,0
C. helenae	Νεστάνη	29,6	26,2	1,2	3,1	12,6	5,7	6,1	11,6	21,4	14,7
Είδος	**πληθυσμός**	**Μέση ετ.**	**Μέγ.**	**Ελάχ.**	**Μέση_χειμ**	**Μέση_αν**	**Μέση_καλ**	**Μέση_φθ**			
C. eucineta	Μυστράς	733	140	6	113,0	47,7	8,0	75,7			
C. parnassia	Γραβιά	757	122	14	103,7	58,7	23,3	66,7			
C. intusplicata	Διακοπτό	724	127	8	106,0	50,7	13,0	71,7			
C. helenae	Νεστάνη	795	141	12	118,3	55,3	16,0	75,3			

4.2.1.1. Πληθυσμοί μελέτης

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 80 ενήλικα άτομα του γένους *Codringtonia* τα οποία αντιπροσωπεύουν τρία είδη του γένους (24 άτομα *C. parnassia*, 31 άτομα *C. intusplicata*, 25 άτομα *C. eucineta*), ενώ για τις συγκριτικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον, βιοχημικά δεδομένα από ένα τέταρτο είδος (*C. helenae*) (Giokas *και συν.*, 2007), συνολικά λοιπόν συμπεριελήφθησαν 4 από τα 7 κατ' όνομα είδη του γένους (εξαιρείται το *C. neocrassa* για τους λόγους που αναφέρονται στο δεύτερο κεφάλαιο) δηλαδή τα 4 είδη που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν σε 4 από τους 6 κλάδους του φυλογενετικού δέντρου του γένους (Kotsakiozi *και συν.*, 2012b). Τα είδη επιλέχθηκαν με βάση δύο κριτήρια, το πρώτο αφορούσε τη φυλογένεση (ώστε να αντιπροσωπεύονται τόσο ακραίοι όσο και ενδιάμεσοι κλάδοι του φυλογενετικού δέντρου) και το δεύτερο αφορούσε την περιοχή κατανομής τους, ώστε οι σταθμοί δειγματοληψίας να βρίσκονται κατά μήκος ενός νοητού άξονα βορρά προς νότο που να καλύπτει όλο το εύρος κατανομής του γένους (βλ. κεφάλαιο 1). Πραγματοποιήθηκαν εποχικές δειγματοληψίες (5-10 άτομα ανά δειγματοληψία και ανά πληθυσμό), την ίδια ημέρα και από τους τρεις σταθμούς, τα ζώα μεταφέρονταν αμέσως στο εργαστήριο όπου απομονώνονταν οι τρείς ιστοί και ψύχονταν αμέσως σε υγρό άζωτο. Τα δείγματα διατηρούνται στους -20 °C. Επιπλέον, για τα είδη *C. intusplicata* και *C. eucineta* πραγματοποιήθηκε μία ακόμη δειγματοληψία την άνοιξη (Μάιο), καθώς η άνοιξη είναι αφ' ενός εποχή αναπαραγωγής για τα είδη *Codringtonia* και αφ' ετέρου σύμφωνα με όσα αναφέρονται σε παρόμοιες μελέτες (Giokas *και συν.*, 2007; Giokas *και συν.*, 2005; Kotsakiozi *και συν.*, 2012a) είναι η περίοδος προετοιμασίας για τη θερινή διάπαυση, συνεπώς θεωρήθηκε χρήσιμο να καταγραφούν οι μεταβολές στις παραμέτρους που εξετάστηκαν σε εποχική βάση και σε μικρότερη χρονική κλίμακα.

Ακόμη, για ένα από τα είδη (*C. helenae*), πραγματοποιήθηκε μία επιπλέον δειγματοληψία (υψομετρικά) σε δύο θέσεις, διαφορετικού υψομέτρου, του όρους Μαίναλου (1050m και 1633m) την ίδια ημέρα (5 ενήλικα άτομα από κάθε υψόμετρο) και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, του γλυκογόνου, η δραστικότητα της LDH καθώς και το υδατικό περιεχόμενο των ιστών.

4.2.1.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών εφαρμόστηκε η ***μέθοδος της διουρίας*** (Layne, 1957). Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει: Ομογενοποίηση του ιστού (0,1 gr) με πενταπλάσια ποσότητα διαλύματος PCA 10% v/v και φυγοκέντρηση (4 ^{o}C, 10.000 rpm για 5 λεπτά). Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε διάλυμα KOH (ή NaOH) 0,1N ανάλογα με το αρχικό βάρος του ιστού (για κάθε 1 gr ιστού προστίθενται 10 ml διαλύματος KOH) και επώαση στους 37 ^{o}C για τουλάχιστον 30 λεπτά ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως το ίζημα. Σε 50μl του κάθε δείγματος προστίθενται 950μl δις αποσταγμένου νερού και 4 ml διουρίας (παρασκευή αντιδραστηρίου διουρίας όγκου 1lt: 1,5 gr ένυδρος θειϊκός χαλκός ($CuSO_45H_2O$), 30gr NaOH και 6gr τρυγικό καλιονάτριο ($NaKC_4H_4OH$ $4H_2O$)) και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 550nm αφού μηδενίσουμε με αρνητικό μάρτυρα (blank) (περιέχει 1ml νερού και 4 ml διουρίας). Σε κάθε πείραμα, εκτός των δειγμάτων μετρείται και η οπτική απορρόφηση διαφόρων διαλυμάτων αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης και με βάση τις τιμές αυτές κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης (10mg/ml). Στη συνέχεια ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.

4.2.1.3. Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκογόνου

Για τον προσδιορισμό του γλυκογόνου εφαρμόστηκε η ***μέθοδος της ανθρόνης*** (Seifter *και συν.*, 1950) όπως τροποποιήθηκε από τους (Pafilis, Valakos & Foufopoulos, 2005). Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια. Κονιορτοποιημένος ιστός (0,1 gr) προστίθεται σε διάλυμα KOH 30% w/v σε αναλογία 1:3 (βάρος ιστού:όγκος διαλύματος) και επωάζεται στους 100 ^{o}C για 20 λεπτά ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως ο ιστός. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για 5 λεπτά και προστίθεται καθαρή αιθανόλη (5ml CH_3CH_2OH για κάθε 3ml KOH). Επώαση στους 100 ^{o}C για 5 λεπτά για να κατακρημνιστεί το γλυκογόνο και τοποθέτηση σε πάγο για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (4 ^{o}C, 3000rpm για 10 λεπτά). Διαλυτοποίηση του ιζήματος ανάλογα με την ποσότητα του γλυκογόνου των ιστών (οι αραιώσεις που έγιναν ήταν 1/10 ως 1/40 ανάλογα με τον ιστό). Σε 50μl κάθε δείγματος προστίθενται 3ml αντιδραστηρίου ανθρόνης (παρασκευή: 0,6 gr ανθρόνη ανά 300ml H_2SO_4 75% v/v) επίσης υπάρχει ένας αρνητικός μάρτυρας (blank) (50μl νερό και 3ml αντιδραστηρίου ανθρόνης) και ένα πρότυπο γλυκόζης (1 mg/ml). Τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια στους 100°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε

μήκος κύματος 625nm αφού ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου. Υπολογισμός της ποσότητας του γλυκογόνου (μg/gr ιστού) γίνεται με βάση την απορρόφηση πρότυπου διαλύματος γλυκόζης 1mg/ml.

$$\frac{OD\delta ειγματος}{OD\pi ροτύπου} \times \frac{1}{W\delta είγματος} \times \mathit{αραίωση} \times 0{,}05 \times 0{,}9$$

4.2.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός λιπιδίων

Για τον προσδιορισμό των λιπιδίων εφαρμόστηκε η ***μέθοδος της φωσφοβανιλίνης*** (Alexis, Papaparaskeva-Papoutsoglou & Theochari, 1985). Η μέθοδος περιλαμβάνει ομογενοποίηση του ιστού (0,03-0,04 gr) με 1,5 ml διαλύματος 2:1 χλωροφόρμιο:μεθανόλη. Φυγοκέντρηση (3000 rpm, 12 λεπτά, 4 ^{o}C) και μεταφορά 200 μl από το υπερκείμενο του κάθε δείγματος, σε βιδωτούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Στον αρνητικό μάρτυρα προστίθενται 200μl δις αποσταγμένου νερού. Προστίθενται 5 ml H_2SO_4 (94%-96% v/v) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση, επώαση στους 100°C για 10 λεπτά και τοποθέτηση σε πάγο για 5 λεπτά. 200 μl από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες και προστίθενται 5ml φωσφοβανιλλίνης (παρασκευή: 0,2gr βανιλλίνης σε 100ml H_3PO_4). Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και επώαση στους 37 ^{o}C για 10 λεπτά πριν την φωτομέτρηση στα 530 nm. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται μείγμα ελαιολάδου και αραβοσιτελαίου σε αναλογία 2:1. Ο υπολογισμός της ποσότητας των λιπιδίων γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\frac{OD\delta ειγματος}{OD\pi ροτύπου} \times \frac{V\pi ροτύπου}{W\delta είγματος} \times 1000$$

4.2.1.5. Προσδιορισμός της δραστικότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης γίνεται με τη ***μέθοδο Kornberg*** (1955). Η μέθοδος περιλαμβάνει ομογενοποίηση φρέσκου ιστού (0,1gr περίπου) με εννεαπλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης (0,1M Tris-HCL, pH 7,5, 1mM EDTA) και φυγοκέντρηση (12000 rpm, 1 λεπτό, 4 ^{o}C). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που βρίσκονται σε πάγο. Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της LDH του κάθε εκχυλίσματος, προστίθεται σε κάθε κυψελίδα Tris-HCL pH 7,3 (1,5 ml), KCN (0,5 ml), νερό (ώστε ο τελικός όγκος να είναι 3 ml), πυροσταφυλικό οξύ (0,2 ml), NADH (0,3 ml), και εκχύλισμα (η ποσότητα εξαρτάται από τον ιστό συνήθως χρησιμοποιούσα 0,1 ml) με τη σειρά που αναφέρονται. Κάθε

δείγμα φωτομετρείται στα 340 nm ανά λεπτό μέχρι σταθεροποίησης των τιμών OD πράγμα που αποτελεί ένδειξη ότι όλο το πυροσταφυλικό οξύ έχει μετατραπεί σε γαλακτικό. Ο υπολογισμός της δραστικότητας της LDH, γίνεται αφού δημιουργηθεί το διάγραμμα της μεταβολής της OD σε σχέση με τον χρόνο. Στο σημείο πρέπει αυτό να σημειωθεί ότι ο υπολογισμός της δραστικότητας της LDH πραγματοποιήθηκε δύο φορές (μία φορά υπολογίζοντας τη δραστικότητα ανά μονάδα νωπού βάρους ιστού και μία ανά μονάδα ξηρού βάρους) και αυτό γιατί στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε νωπός ιστός και θα ήταν αναμενόμενο να υποτεθεί ότι οι διαφορές που καταγράφονται μεταξύ των εποχών ή των ιστών ή και των ειδών, οφείλονται απλά στο ότι οι διαφορετικοί ιστοί ή τα διαφορετικά είδη στις διάφορες εποχές έχουν διαφορετικό υδατικό περιεχόμενο (βλ. παράγραφο 4.2.2.1). Επομένως, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι πρόκειται για «κυκλική ανάλυση» και ότι οι διαφορές που καταγράφονται οφείλονται απλά στο διαφορετικό υδατικό περιεχόμενο των ιστών και όχι σε πραγματική αυξομείωση της δραστικότητας του ενζύμου, για αυτό κρίθηκε απαραίτητο να αφαιρεθεί αυτός ο παράγοντας από την ανάλυση. Η δραστικότητα της LDH υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{\Delta(OD)}{6{,}22} \times \frac{V\kappa\upsilon\psi\varepsilon\lambda\acute{\iota}\delta\alpha\varsigma}{V\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma} \times \text{αραίωση} = \frac{\mu moles}{gr\ \iota\sigma\tau o\acute{\upsilon} \times min}$$

4.2.1.6. Στατιστική επεξεργασία

Κλασική στατιστική ανάλυση

Για κάθε μέτρηση, ιστό και εποχή υπολογίστηκαν τα μέτρα θέσης και διασποράς (μέσος, διάμεσος, τυπική απόκλιση). Στη συνέχεια έγινε έλεγχος κανονικότητας (Shapiro-test) για όλες τις παραμέτρους (λιπίδια, πρωτεΐνες, γλυκογόνο και δραστικότητα LDH) και αφού επιβεβαιώθηκε ότι τα δεδομένα δεν αποκλίνουν σημαντικά από την κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA), θεωρώντας την εποχή και τους διαφορετικούς ιστούς ως ανεξάρτητους παράγοντες, παράλληλα πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (univariate ANOVA) για καθένα ιστό χωριστά. Για τις δια-ειδικές συγκρίσεις, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA), για κάθε βιοχημική παράμετρο και κάθε ιστό χωριστά, θεωρώντας αυτή τη φορά, την εποχή και τα είδη ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Σε κάθε περίπτωση που φαινόταν στατιστικά σημαντική διαφορά (επίπεδο σημαντικότητας 0,05) έγινε εκ των υστέρων έλεγχος του Tukey (Tukey HSD post hoc test) για να εξακριβωθεί μεταξύ

ποιων εποχών ή\και ποιων ιστών (ή\και ποιων ειδών στην περίπτωση των δια-ειδικών συγκρίσεων) εντοπίζεται η διαφορά αυτή.

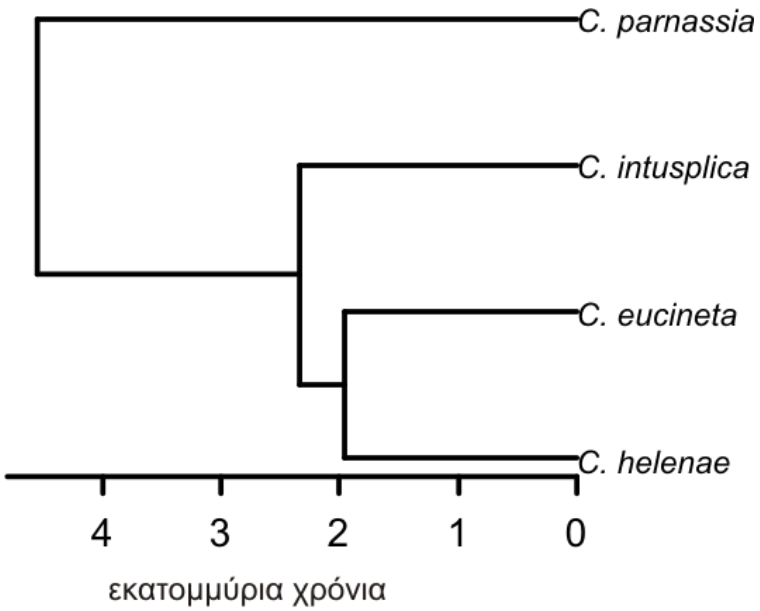
Στη συνέχεια, για κάθε μία από τις μεταβλητές αυτές (λιπίδια, πρωτεΐνες, LDH και υδατικό περιεχόμενο) που υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για 4 είδη, εφαρμόστηκαν απλά γραμμικά μοντέλα, χρησιμοποιώντας τρεις χωρικές μεταβλητές (υψόμετρο, γεωγρ. πλάτος και μήκος) για να διαπιστωθεί ποια ή ποιες από τις χωρικές μεταβλητές ερμηνεύουν καλύτερα τα αποτελέσματα στις βιοχημικές μετρήσεις. Ο συνδυασμός των τριών αυτών παραμέτρων μπορεί να θεωρηθεί ότι «αντιπροσωπεύει» σε έναν καλό βαθμό τις διαφορές των κλιματικών συνθηκών στους σταθμούς δειγματοληψίας. Η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου έγινε με βάση το κριτήριο AIC (Akaike, 1974) (βλ. κεφάλαιο 2) και η επιλογή έγινε ανάμεσα σε 8 μοντέλα (συμπεριλαμβανομένου του μηδενικού). Στην περίπτωση που επιλεγεί το μηδενικό μοντέλο, αυτό σημαίνει ότι καμία από τις χωρικές μεταβλητές (ή συνδυασμός τους) δεν ερμηνεύει τις τιμές για τη συγκεκριμένη μεταβλητή-μέτρηση που εξετάζεται, καθώς δεν μεταβάλλονται γραμμικά. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το «πακέτο» MuMIn στην R. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 1-καμία συσχέτιση (μηδενικό μοντέλο), 2-υψόμετρο, 3-γεωγρ. πλάτος, 4-γεωγρ. πλάτος και υψόμετρο, 5-γεωγρ. μήκος, 6-γεωγρ. μήκος και υψόμετρο, 7-γεωγρ. πλάτος και γεωγρ. μήκος, 8-γεωγρ. πλάτος και γεωγρ. μήκος και υψόμετρο.

Στη συνέχεια, μετά από αυτόν τον πρώτο έλεγχο, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων που μπορούν να ερμηνεύσουν το πρότυπο που φαίνεται να ισχύει με βάση τα βιοχημικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κλιματικά χαρακτηριστικά των σταθμών δειγματοληψίας (Πίνακας 4.1) και εφαρμόστηκε ιεραρχική κατάτμηση διακύμανσης (Hierarchical Variance Partitioning-HVP) (Chevan και Sutherland 1991) για να διαπιστωθεί ποιες από τις κλιματικές μεταβλητές μπορούν να ερμηνεύσουν τα δεδομένα και κατά πόσο. Η ανάλυση αυτή είναι μια αναλυτική μέθοδος πολλαπλής παλινδρόμησης, μέσω της οποίας μπορεί να προσδιοριστούν οι πιο πιθανοί παράγοντες που ευθύνονται για ένα παρατηρούμενο πρότυπο, ενώ παράλληλα, αντιμετωπίζονται και τα προβλήματα πολυσυγγραμμικότητα. Η χρήση της μεθόδου ολοένα και αυξάνεται στον κλάδο της οικολογίας και αυτό οφείλεται στο ότι είναι πολύ χρήσιμη για τη συμπλήρωση αναλύσεων πολλαπλής παλινδρόμησης. Με την HP όλες οι κλιματικές μεταβλητές μπορούν να εισαχθούν στην ίδια ανάλυση και επιπλέον παρέχεται και η δυνατότητα εκτίμησης της διακύμανσης λόγω συγγραμμικότητας μεταξύ των κλιματικών μεταβλητών. Ως προς το τελευταίο, η μέθοδος εκτιμά την ανεξάρτητη συμβολή για την κάθε κλιματική μεταβλητή που χρησιμοποιείται στο τελικό

μοντέλο. Η μέθοδος εξετάζει πολλά μοντέλα για να βρει πιο ερμηνεύει καλύτερα τα δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα αν θεωρήσουμε ότι ο αριθμός των ερμηνευτικών μεταβλητών είναι N, τότε υπάρχουν 2^N πιθανά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου του μηδενικού μοντέλου. Στόχος της μελέτης είναι να απομονώσουμε τον/τους πιο σημαντικό/ούς (κλιματικούς) παράγοντες που ευθύνονται για το πρότυπο που παρατηρούμε στις βιοχημικές μετρήσεις.

Στατιστική επεξεργασία λαμβάνοντας υπ' όψιν τη φυλογένεση

Ο έλεγχος αυτός έγινε μόνο σε εκείνες τις μεταβλητές για τις οποίες υπήρχαν δεδομένα για τέσσερα είδη (τρία είδη που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή και ένα επιπλέον είδος οι μετρήσεις του οποίου αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία (Giokas *και συν.*, 2007)). Για τον έλεγχο αυτόν χρησιμοποιήθηκε το φυλογενετικό δέντρο του γένους (Kotsakiozi *και συν.*, 2012b) από το οποίο αφαιρέθηκαν κάποιοι κλάδοι (pruned phylogenetic tree) ώστε να περιλαμβάνει μόνο αυτά τα τέσσερα είδη *Codringtonia* (Εικόνα 4.1). Οι τροποποιήσεις στο φυλογενετικό δέντρο έγιναν με τη χρήση του πακέτου "APE" (Paradis *και συν.*, 2004). Με το ίδιο πακέτο πραγματοποιήθηκε επίσης η δοκιμασία των ανεξάρτητων αντιθέσεων (PIC-Phylogenetic Independent Contrast) (Felsenstein, 1985). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ειδών στις βιοχημικές παραμέτρους (βλ. παράγραφος 4.3.1) και οι συσχετίσεις που καταγράφονται μεταξύ αυτών των βιοχημικών παραμέτρων και των χωρικών μεταβλητών, ερμηνεύονται από τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών.



Εικόνα 4.1. Το φυλογενετικό δέντρο με τα τέσσερα είδη *Codringtonia* που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις λαμβάνοντας υπ' όψιν τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών, το οποίο προέκυψε από το φυλογενετικό δέντρο του γένους (Kotsakiozi *και συν.*, 2012b) αφαιρώντας κλάδους. Ο άξονας στο κάτω μέρος της εικόνας δείχνει το χρόνο διαφοροποίησης των ειδών σε εκατομμύρια χρόνια.

4.2.2. Υδατικό περιεχόμενο και ρυθμός απώλειας νερού

Σε αυτό το μέρος πραγματοποιήθηκαν δυο σειρές μετρήσεων, η πρώτη αφορά τη μέτρηση του υδατικού περιεχομένου των ιστών σε ζώα που συλλέχθηκαν απευθείας από το πεδίο κατά τη διάρκεια ενός έτους (εποχικές δειγματοληψίες) και η δεύτερη αφορά τον ρυθμό απώλειας νερού σε ζώα που είχαν εγκλιματιστεί σε εργαστηριακές συνθήκες και υπέστησαν τεχνητά αφυδάτωση με έκθεση τους σε υψηλή θερμοκρασία για περιορισμένο χρόνο. Η πρώτη σειρά μετρήσεων πραγματοποιήθηκε σε 3 (υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα και για ένα 4^{ο} είδος βλ. (Giokas *και συν.*, 2007), οπότε συνολικά 4 είδη) από τα 7 είδη του γένους ενώ η δεύτερη σειρά μετρήσεων πραγματοποιήθηκε σε 6 είδη. Η επιλογή των ειδών στηρίχθηκε στο φυλογενετικό δέντρο, με βάση το οποίο επιλέχθηκε ένα είδος για κάθε φυλογενετικό κλάδο. Τέλος, για ένα από τα είδη (*C. intusplicata*), χρησιμοποιήθηκε μια ακόμα ομάδα ζώων που ήταν σε διάπαυση πριν την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία με σκοπό να εντοπιστούν τυχόν διαφορές ως προς τον ρυθμό απώλειας νερού ανάμεσα σε ενεργά άτομα και σε άτομα που βρίσκονταν σε διάπαυση.

4.2.2.1 Εποχική μεταβολή του υδατικού περιεχομένου στο πεδίο

Τα είδη, οι πληθυσμοί (Πίνακας 4.1) και οι δειγματοληψίες είναι τα ίδια με αυτά που αναφέρονται στην παράγραφο 4.2.1.1. Τα άτομα μετά τη συλλογή τους, μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου χωρίζονταν οι τρεις ιστοί (πόδας, ηπατοπάγκρεας και γεννητικό σύστημα), καταγράφονταν το αρχικό βάρος τους και τοποθετούνταν σε κλίβανο μέχρι σταθεροποίησης του βάρους τους. Το υδατικό περιεχόμενο των ιστών εκφράζεται ως εκατοστιαία περιεκτικότητα των ιστών σε νερό.

4.2.2.2. Ρυθμός απώλειας νερού

Για τη μέτρηση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα είδη *C. parnassia*, *C. intusplicata*, *C. eucineta*, *C. gittenbergeri*, *C. codringtonii* και *C. helenae* (πληροφορίες για τους σταθμούς δειγματοληψιών αναφέρονται στον Πίνακα 4.2) τα οποία εγκλιματίστηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες (φωτοπερίοδος: 12 ώρες σκοτάδι, 12 ώρες φως και θερμοκρασία 16 °C) και διατηρούνταν σε terraria (διαστάσεις 15 × 25 × 20 cm) όπου είχαν πρόσβαση σε άφθονη τροφή και νερό. Ο εγκλιματισμός των ατόμων κρίθηκε απαραίτητος για να μην επηρεάσει τις μετρήσεις που επρόκειτο να ακολουθήσουν (και κυρίως τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70), η πρότερη κατάσταση των ζώων (Scheil, Köhler & Triebskorn, 2011), καθώς τα άτομα των διαφορετικών ειδών είχαν συλλεχθεί σε διαφορετικές περιόδους και από βιοτόπους διαφορετικού υψομέτρου. Στην ομάδα που βρισκόταν σε διάπαυση πριν την μέτρηση, η διάπαυση είχε προκληθεί τεχνητά ένα μήνα πριν την μέτρηση με αφαίρεση του νερού από τα terraria.

Για τη μέτρηση του ρυθμού αφυδάτωσης χρησιμοποιήθηκε ζυγός (ζυγός Kern) στον οποίο τα ζώα εκτέθηκαν χωριστά το καθένα στους 50 °C για 15 λεπτά και σημειωνόταν η μεταβολή του βάρους τους (άρα η απώλεια νερού) ανά λεπτό. Η θερμοκρασία στην οποία εκτέθηκαν τα ζώα επιλέχθηκε έτσι ώστε να είναι «ακραίες» οι συνθήκες έκθεσης αλλά ταυτόχρονα να βρίσκεται και εντός του θερμοκρασιακού εύρους που καταγράφεται σε σχισμή βράχου κατά την καλοκαιρινή περίοδο. Από μετρήσεις στο πεδίο που πραγματοποιήθηκαν στην Πελοπόννησο τον μήνα Ιούνιο, βρέθηκε ότι μέσα σε σχισμή βράχου η μέση θερμοκρασία του εικοσιτετραώρου είναι περίπου 35 °C, η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ημέρας είναι περίπου 44,5 °C ενώ το μεσημέρι (11.30-15.00) κυμαίνεται μεταξύ 50 °C και 57 °C (Σαγώνας προσωπική επικοινωνία). Ο χρόνος έκθεσης των ζώων στις συνθήκες αυτές επιλέχθηκε έτσι ώστε να είναι επαρκής για την έκφραση των Hsp (Scheil *και συν.*, 2011). Μετά την έκθεση τους τα άτομα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά (recovery)

(Mahroof *και συν.*, 2005) και στη συνέχεια ακολουθούσε αφαίρεση του κελύφους, μέτρηση του βάρους του και διαχωρισμός των ιστών, οι οποίοι ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο, κονιορτοποιήθηκαν και διατηρήθηκαν στους -80 °C. Η ποσότητα του νερού που έχασαν τα ζώα κατά τη διάρκεια της έκθεσης τους στις ακραίες αυτές συνθήκες εκφράστηκε τόσο με απόλυτο τρόπο (ποσότητα νερού που χάνεται ανά λεπτό) όσο και ως ποσοστιαία απώλεια του νωπού τους βάρους (αφού αφαιρέθηκε πρώτα το βάρος του κελύφους) ανά λεπτό.

4.2.2.3. Στατιστική επεξεργασία

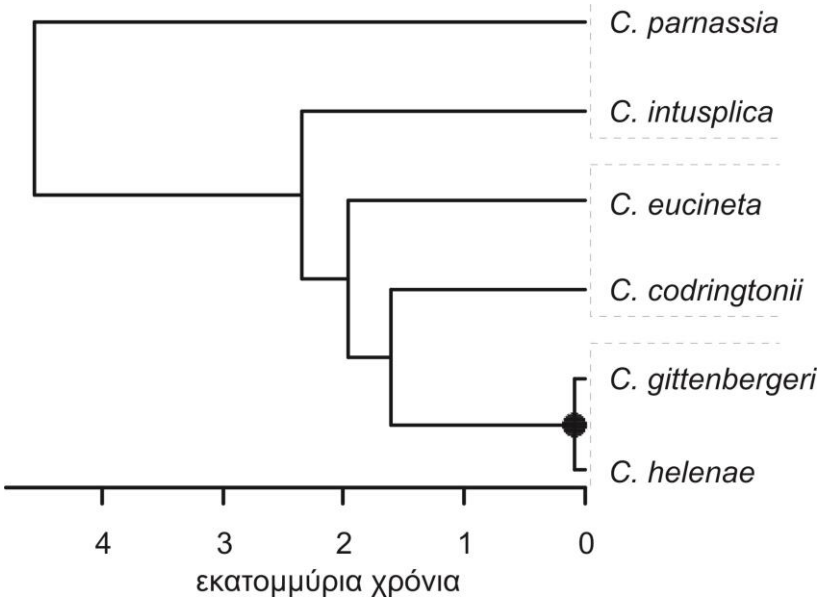
Εποχική μεταβολή του νερού

Όλες οι αναλύσεις αυτού του μέρους είναι ακριβώς οι ίδιες με αυτές που αναφέρονται στην παράγραφο παραγράφους 4.2.1.6. Επειδή, όμως φάνηκε μία τάση όλα τα είδη να αυξάνουν τη δραστικότητα της LDH και σχεδόν ταυτόχρονα να παρατηρείται ελαφρά μείωση στο υδατικό περιεχόμενο των ιστών (βλ. αποτελέσματα παράγραφοι 4.3.1 και 4.3.2.1) πραγματοποιήθηκε επίσης συσχέτιση των δύο αυτών παραγόντων (δραστικότητα της LDH και υδατικό περιεχόμενο) για όλες τις εποχές και για όλα τα είδη.

Ρυθμός απώλειας νερού

Αφού πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητα (Shapiro test) και επιβεβαιώθηκε ότι οι μετρήσεις δεν αποκλίνουν σημαντικά από την κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες παραμετρικές δοκιμασίες. Για τον ρυθμό απώλειας του νερού πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (univariate ANOVA), που ακολουθήθηκε από εκ των υστέρων έλεγχο (Tukey HSD post hoc test και Fisher test) για να διευκρινιστεί μεταξύ ποιών ειδών παρατηρούνται διαφορές. Επίσης, για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια διαφορά ως προς τον ρυθμό απώλειας νερού, ανάμεσα σε ενεργά και μη άτομα πραγματοποιήθηκε δοκιμασία student (t test). Τέλος, εφαρμόστηκαν απλά γραμμικά μοντέλα για να διερευνηθεί η σχέση των μεταβλητών που μετρήθηκαν με κλιματικές και χωρικές μεταβλητές (υψόμετρο, γεωγρ. πλάτος και μήκος). Οι κλιματικές μεταβλητές που εξετάστηκαν ήταν αυτές που αναφέρονται στον Πίνακα 4.2. Τα κλιματικά δεδομένα αφορούσαν ακριβώς τις θέσεις δειγματοληψίας και λήφθηκαν από τον ιστότοπο WorldClim (http://www.worldclim.org/ (Hijmans *και συν.*, 2005)). Για τις φυλογενετικές αναλύσεις αυτής της σειράς πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το φυλογενετικό δέντρο του γένους (Kotsakiozi *και συν.*, 2012b) από το οποίο

αφαιρέθηκαν κλάδοι (pruned phylogenetic tree) ώστε να περιλαμβάνει μόνο τους πληθυσμούς εκείνους που αντιστοιχούν στα έξι αυτά είδη *Codringtonia* (Εικόνα 4.2). Οι αναλύσεις είναι οι ίδιες με αυτές που αναφέρονται στην παράγραφο 4.2.1.6.



Εικόνα 4.2. Το φυλογενετικό δέντρο με τα έξι είδη *Codringtonia* που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ύπαρξης φυλογενετικού σήματος, το οποίο προέκυψε από το φυλογενετικό δέντρο του γένους *(Kotsakiozi και συν., 2012b)*. Ο άξονας στο κάτω μέρος της εικόνας δείχνει το χρόνο διαφοροποίησης των ειδών σε εκατομμύρια χρόνια.

Πίνακας 4.2. Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του ρυθμού απώλειας νερού και των επιπέδων έκφρασης των Hsp70. Παρατίθενται ακόμη κλιματικά και άλλα χαρακτηριστικά των σταθμών δειγματοληψίας. Συντμήσεις: Υψ: Υψόμετρο, καλ: καλοκαίρι και χειμ: χειμώνας.

					ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ			**ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΕΙΣ**		
Είδος	**Σταθμός**	**Γεωγρ. Πλάτος**	**Γεωγρ. Μήκος**	**Υψ. (m)**	Μέση έτους	Μέση καλ.	Μέση χειμ.	Μέση έτους	Μέση καλ.	Μέση χειμ.
C. parnassia	Σκαμνός	38.752941	22.453308	872	14,4	23,0	6,2	757	70	311
C. intusplicata	Διακοπτό	38.18046	22.19436	54	11,9	20,0	4,3	868	66	371
C. eucineta	Παναχαϊκό	38.21333	21.87472	1725	7,6	15,7	0,0	1012	92	418
C. codringtonii	1,2 km πριν τη Ροδιά	37.2126	21.73833	436	16	22,6	9,8	799	20	376
C. helenae	Λεβίδι-Βυτίνα	37.700253	22.199292	850	12	19,9	4,6	870	58	382
C. gittenbergeri	Ορεινή Μελιγού	37.352893	22.654839	648	13,8	21,6	6,6	742	39	335

4.2.3. Επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού στρες

Για να εκτιμηθεί η ανοχή των διαφορετικών ειδών στην αφυδάτωση πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ (Hsp70) τόσο στα άτομα που εκτέθηκαν στις ακραίες αυτές συνθήκες (χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια άτομα που εκτέθηκαν στις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 4.2.2.2) όσο και σε άτομα που δεν εκτέθηκαν και παρέμεναν στον θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας τα οποία αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (control group). Για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 χρησιμοποιήθηκε μόνο ο πόδας, καθώς είναι το μέρος του σώματος που είναι άμεσα εκτεθειμένο στις περιβαλλοντικές αλλαγές και η σύνθεση των Hsp70 στον ιστό αυτό είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ζώων υπό συνθήκες περιβαλλοντικού στρες (Mizrahi *και συν.*, 2010). Η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 έγινε με δύο μεθόδους: α) σε επίπεδο mRNA με PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) και β) σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανάλυση κατά Western (Western blot). Η ακτίνη-α χρησιμοποιήθηκε και στις δυο περιπτώσεις σαν γονίδιο αναφοράς (reference gene) καθώς πολλές μελέτες που αφορούν τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της Hsp70 χρησιμοποιούν την ακτίνη σαν γονίδιο αναφοράς (βλ. (Mizrahi *και συν.*, 2010)). Σε τέτοιες μετρήσεις, είναι απαραίτητο να συνεκτιμάται και η έκφραση τουλάχιστον ενός ακόμα γονιδίου η έκφραση του οποίου είναι γνωστό ότι δεν μεταβάλλεται εξαιτίας των συνθηκών στις οποίες υποβάλλονται τα άτομα.

4.2.3.1. Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 με PCR αντίστροφης μεταγραφής

Απομόνωση ολικού RNA

Πριν τη διαδικασία λήφθηκαν όλα τα απαραίτητα μέτρα (πλύσιμο όλων των υλικών και των πάγκων που χρησιμοποιήθηκαν με ειδικό υγρό (Rnase ZAP, Ambion)) για να μην υπάρξουν μολύνσεις ή καταστροφή του RNA. Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με το Purelink kit (Invitrogen, Carlsbad CA 92008 USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιώντας ακριβώς την ίδια ποσότητα ιστού στο κάθε δείγμα. Ακολούθησε προσδιορισμός της ποσότητας του RNA στο κάθε δείγμα με μέτρηση σε φωτόμετρο τύπου NanoDrop. Στη συσκευή αυτή εκτιμάται ταυτόχρονα η απορρόφηση του δείγματος σε μήκος κύματος 260nm (A_{260nm}) και 280nm (A_{280nm}) καθώς και ο λόγος των απορροφήσεων A_{260nm}/A_{280nm} αλλά και η ποσότητα του RNA (ng RNA/μl). Για την εκτίμηση της καθαρότητας του RNA χρησιμοποιήθηκε ο λόγος

A_{260nm}/A_{280nm}, σύμφωνα με αυτόν, αποδεκτές θεωρούνται οι τιμές που κυμαίνονται από 1,8 ως 2.

Σύνθεση cDNA

Το cDNA (complementary DNA) κατασκευάστηκε ξεκινώντας με σταθερή ποσότητα RNA σε όλα τα δείγματα (250 ng). Αναλυτικά η διαδικασία είναι η ακόλουθη: Σε κάθε δείγμα RNA προστίθενται 1μl oligo dT (100pmol/μl), 1μl dNTPs (μείγμα ισομοριακών ποσοτήτων dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10mM το καθένα σε ουδέτερο pH) και DEPC νερό (πρόκειται για νερό εντελώς απαλλαγμένο από RNAάσες λόγω της παρουσίας του DEPC που είναι αναστολέας των RNAασών) ώστε ο τελικός όγκος να είναι 12μl. Ακολουθεί θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά και τα δείγματα τοποθετούνται αμέσως σε πάγο, στη συνέχεια προστίθενται ανά δείγμα 4μl διαλύματος αντίδρασης (first strand buffer) και 2μl DTT 0,1M. Ακολουθεί επώαση στους 42 °C για 2 λεπτά, προστίθεται 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) 0,2u/μl και συνεχίζεται η επώαση στις ίδιες συνθήκες για 50 λεπτά ακόμα για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του cDNA. Η αντίδραση τερματίζεται τοποθετώντας τα δείγματα στους 70 °C για 15 λεπτά και ακολούθως αποθηκεύονται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την PCR.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Τόσο για τις Hsp70 όσο και για την ακτίνη-α χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για χερσαία σαλιγκάρια (Reuner, Brümmer & Schill, 2008) και μετά τη λήψη των πρώτων αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση (sequencing) των προϊόντων της PCR, στοίχιση και σύγκριση τους με κατατεθειμένες αλληλουχίες των γονιδίων στόχων στην GenBank, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι όντως οι εκκινητές πολλαπλασιάζουν το γονίδιο στόχο. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR φαίνονται στους Πίνακες 4.3 και 4.4 αντίστοιχα. Για να καθοριστούν οι συνθήκες της αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές αντιδράσεις PCR με διάφορους κύκλους αλλά και με διαδοχικές αραιώσεις του ίδιου δείγματος (1/5, 1/10, 1/100) προκειμένου να βρεθούν οι συνθήκες εκείνες, στις οποίες δεν υπάρχει κορεσμός του προϊόντος, αλλά και να αξιολογηθεί το κατά πόσο η τελική ποσότητα του προϊόντος εξαρτάται από την αρχική ποσότητα των αλληλουχιών στόχων που βρίσκονται στο δείγμα.

Πίνακας 4.3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων στόχων Hsp70 και ακτίνη α.

Γονίδιο	**Όνομα εκκινητών**	**Αλληλουχία εκκινητών**	
Hsp70	Helix Hsp70 F	5-ATCTTTGACTTGGGTGGTGG-3	
	Helix Hsp70 R	5-TGTTCAGTTCCTTGCCATTG-3	
a-actin	Ca-actin F	5-CAGCTGTCTGCATCTCTTG-3	
	Ca-actin R	5-CCCATACATGAAGGCTACGC-3	

Πίνακας 4.4. Συνθήκες αντιδράσεων PCR για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων στόχων Hsp70 και ακτίνη α.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Στάδιο	Θερμοκρασία (^oC)	Χρόνος
Taq buffer	1X	Προ-επώαση	95	10''
$MgCl_2$	1,5mM	Αποδιάταξη	94	30''
dNTPs	0,2 mM	Υβριδοποίηση	59 για Hsp70 65 για α-ακτίνη	30''
Εκκινητής A	0,8 μM	Επέκταση	72	30''
Εκκινητής B	0,8 μM	Άλλο στάδιο	72	2'/4'
Taq πολυμεράση	5 μονάδες/μl	Κύκλοι	30 για Hsp70 33 για α-ακτίνη	

Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων

Μετά την PCR, ίση ποσότητα από κάθε δείγμα αναμειγνύεται με χρωστική (orange G) και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2% w/v αγαρόζη και 1xTBE), παρουσία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (1xTBE) και εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης 90V. Στη συνέχεια το πήκτωμα αγαρόζης παρατηρείται σε πλάκα υπεριώδους φωτός και φωτογραφίζεται. Η φωτογραφία εισάγεται σε κατάλληλο λογισμικό (ImageJ) και εκτιμάται η ποσότητα του προϊόντος με την εφαρμογή Gel analyser. Στη κάθε PCR, χρησιμοποιούνται τόσο τα άτομα που αποτελούν την ομάδα ελέγχου (control) όσο και άτομα που είχαν εκτεθεί στους 50 °C από όλα τα είδη. Η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων γίνεται συγκριτικά σε σχέση με τα άτομα που αποτελούν την ομάδα ελέγχου και εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες.

4.2.3.2. Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 με ανάλυση κατά Western

Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Ο κονιορτοποιημένος ιστός ομογενοποιείται με πενταπλάσιο όγκο διαλύματος λύσης σύμφωνα με όσα αναφέρονται από τους Aggeli *και συν. (2001)*. Αναλυτικά, το διάλυμα λύσης περιέχει, 20mmol Hepes, pH 7,5, 20mmol β-φωσφογλυκερινικό οξύ, 20mmol NaF, 2 mmol EDTA, 0,2 mmol Na_3VO_4, 5 mmol διθειοθρεϊτόλη (DTT), 10 mmol βενζαμιδίνη, 200 μmol λευπεπτίνη, 120μmol πεπστατίνη A, 10μmol trans-έποξυ-ηλεκτρυλο-L-λευκυλάμιδο-(4-γουανιδο) βουτάνιο, 300μmol φθοριούχο μεθυλφαινυλσουλφονύλιο (PMSF) και 0,5% (v/v) Triton X-100, μετά την ομογενοποίηση τα δείγματα παραμένουν στον πάγο για 30 λεπτά πριν φυγοκεντρηθούν (20.800Xg, 5 λεπτά, 4 °C). Ακολουθεί βρασμός για 3 λεπτά αφού προστεθεί διάλυμα κατεργασίας (SDS/PAGE sample buffer περιέχει 0,33 M Tris-HCL, pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 13% (v/v) γλυκερόλη, 20% (v/v) 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,2% (w/ v) μπλε της βρωμοφαινόλης), σε κάθε δείγμα προστίθεται διάλυμα ίσο με το 1/3 του όγκου του. Στη συνέχεια γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον με αποτέλεσμα την αλλαγή του χρώματος. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται έχει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 ml αντιδραστηρίου Bradford και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595nm, αφού προηγηθεί μηδενισμός με το «τυφλό» δείγμα (περιέχει νερό και 1ml αντιδραστηρίου Bradford). Η εκτίμηση της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Ο βρασμός παρουσία SDS που προηγήθηκε, συνέβαλε στο να αποκτήσουν όλες οι πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο και έτσι να διαχωριστούν με βάση αποκλειστικά και μόνο το μοριακό τους βάρος. Με την προσθήκη της μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγικός παράγοντας) διασπώνται και τυχόν δισουλφιδικοί δεσμοί έτσι ώστε να διαχωριστούν όλα τα πεπτίδια. Στη συνέχεια τα σύμπλοκα των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών-SDS, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακριλαμίδης (10% (w/v) ακριλαμίδη, 0,275% (w/v) δισακριλαμίδη) σε κατακόρυφη διάταξη (Mini-protean III), παρουσία διαλύματος ηλεκτροφόρησης (περιέχει 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 0,1%(w/v) SDS) στα 180-200V. Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ασυνεχές και ουσιαστικά αποτελείται από δυο πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, το πήκτωμα επιστίβαξης (stacking gel) και αυτό του διαχωρισμού (separating gel). Αυτό εξυπηρετεί τη συμπύκνωση των πεπτιδίων

ώστε όλα τα πεπτίδια να φτάσουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Τέλος, χρησιμοποιείται σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης (40 μg) για κάθε δείγμα που προορίζεται για ηλεκτροφόρηση.

Ανάλυση κατά Western

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά (εφαρμόζεται σταθερή τάση 12V) στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης (0.45 μm). Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 30 λεπτά σε διάλυμα TBS-T που περιέχει (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20] και περιέχει 5% (w/v) άπαχο γάλα και κατόπιν επωάζεται με κατάλληλο αντίσωμα (ολονύχτια επώαση, υπό συνεχή ανάδευση). Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα Sigma H-5147 για τις Hsp70 και Sigma A-4700 για την ακτίνη (Mizrahi *και συν.*, 2010), στην αραίωση που προτείνεται από τον κατασκευαστή (1:1000). Στη συνέχεια ακολουθεί ξέπλυμα (3 φορές για 10 λεπτά) και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG), το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο, στην αραίωση που προτείνεται από τον κατασκευαστή (1:5000) σε 1% άπαχο γάλα (1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση), ακολουθεί εκ νέου ξέπλυμα και στη συνέχεια γίνεται η ανίχνευση των ανοσοσυμπλόκων. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση, ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της λουμινόλης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), με τελικό αποτέλεσμα την εκπομπή φωτονίων, έτσι είναι δυνατόν να αποτυπωθούν σε φιλμ οι θέσεις των αντισωμάτων (που είναι συζευγμένα με το ένζυμο) και κατ' επέκταση και των πρωτεϊνών. Το φιλμ στη συνέχεια πυκνομετρείται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Gel Analyzer v.1.0). Η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης τόσο των Hsp70 όσο και της ακτίνης έγινε από την ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφού προηγήθηκε ξέπλυμα αυτής με διάλυμα αποκόλλησης αντισωμάτων (stripping buffer).

4.2.3.3. Στατιστική επεξεργασία

Για όλες τις μετρήσεις πρώτα πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητα (Shapiro test) και στη συνέχεια αφού ελέγχθηκε αν οι μετρήσεις αποκλίνουν σημαντικά από την κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες δοκιμασίες (μη παραμετρικές αν αποκλίνουν και παραμετρικές αν δεν αποκλίνουν από την κανονική κατανομή). Για τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 και της ακτίνης όπως αυτά μετρήθηκαν με RT-PCR έγινε t-test (unpaired t-test) για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης Hsp70 και της ακτίνης, ανάμεσα στα άτομα που υπέστησαν αφυδάτωση και σε αυτά της ομάδας ελέγχου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (univariate ANOVA), για να διαπιστωθεί αν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ειδών. Για τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 και της ακτίνης όπως αυτά μετρήθηκαν με Western blot πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες μη παραμετρικές δοκιμασίες (Wilcoxon rank sum test και Kruskal-Wallis) εξαιτίας του μικρού μεγέθους δείγματος σε κάποια από τα είδη που εξετάστηκαν. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των μεταβλητών που μετρήθηκαν με κλιματικές και χωρικές μεταβλητές για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ τους. Οι κλιματικές και χωρικές μεταβλητές που εξετάστηκαν ήταν οι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στην παράγραφο 4.2.2.2.

Η ανάλυση λαμβάνοντας υπόψη τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών έγινε μόνο σε εκείνες τις μεταβλητές για τις οποίες υπήρχαν δεδομένα και για τα έξι είδη (δηλαδή για τα επίπεδα έκφρασης Hsp70 όπως μετρήθηκαν με RT-PCR). Χρησιμοποιήθηκε το φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 4.2 και πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανεξάρτητων αντιθέσεων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.1.6.

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1. Βιοχημικές αναλύσεις

Οι εποχικές μεταβολές στη βιοχημική σύσταση (λιπίδια, πρωτεΐνες, γλυκογόνο) και στη δραστικότητα της LDH για τα είδη *C. parnassia*, *C. intusplicata* και *C. eucineta*, παρουσιάζονται στις εικόνες 4.3, 4.5 και 4.7 αντίστοιχα. Τα μέτρα θέσης και διασποράς φαίνονται στον Πίνακα 4.5 ενώ στους Πίνακες 4.6, 4.7 και 4.8 αναφέρονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις διακύμανσης (ANOVA) για καθένα από τα τρία είδη που εξετάστηκαν. Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

4.3.1.1. C. parnassia

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των λιπιδίων

Τα επίπεδα των λιπιδίων (Εικόνα 4.3.Α) διαφέρουν μεταξύ των ιστών και των εποχών ($F_{3,43}$=4,45, p=0,00052, συγκεκριμένα η άνοιξη και το καλοκαίρι στον πόδα και η άνοιξη μόνο στο ηπατοπάγκρεας από τις άλλες εποχές) και στην αλληλεπίδραση ιστών και εποχών ($F_{6,43}$=5,069, p=0,0005). Σημειώνεται ότι το να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική διαφορά στην αλληλεπίδραση δύο ανεξάρτητων μεταβλητών (στην προκειμένη περίπτωση ιστοί και εποχές) πάνω σε μια εξαρτημένη μεταβλητή (στην προκειμένη περίπτωση η συγκέντρωση λιπιδίων) σημαίνει ότι η επίδραση του τύπου του ιστού στο πώς μεταβάλλεται η συγκέντρωση των λιπιδίων ανάμεσα στις εποχές διαφέρει από ιστό σε ιστό. Πιο αναλυτικά, στον πόδα και το ηπατοπάγκρεας η συγκέντρωση των λιπιδίων αυξάνεται την άνοιξη, παραμένει σε χαμηλά επίπεδα το καλοκαίρι και τον χειμώνα ενώ το φθινόπωρο παρατηρούνται τιμές ενδιάμεσες αυτών που καταγράφηκαν την άνοιξη και καλοκαίρι-χειμώνα (Πίνακας 4.8). Στο γεννητικό σύστημα η συγκέντρωση των λιπιδίων φαίνεται να αυξάνεται τον χειμώνα και στη συνέχεια να μειώνεται κατά την άνοιξη, ωστόσο οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των εποχών δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($F_{3,15}$=1,83318, p=0,1844).

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών (Εικόνα 4.3.Β) διαφέρουν μεταξύ των ιστών ($F_{2,48}$=85,424, p<0,00001) μεταξύ των εποχών ($F_{3,48}$=7,709, p=0,00026, και συγκεκριμένα διαφέρει στον πόδα το καλοκαίρι από τις άλλες εποχές) αλλά όχι στην αλληλεπίδραση ιστών και εποχών ($F_{6,48}$=1,978, p=0,0873). Συγκεκριμένα στον πόδα φαίνεται να διατηρούνται σε

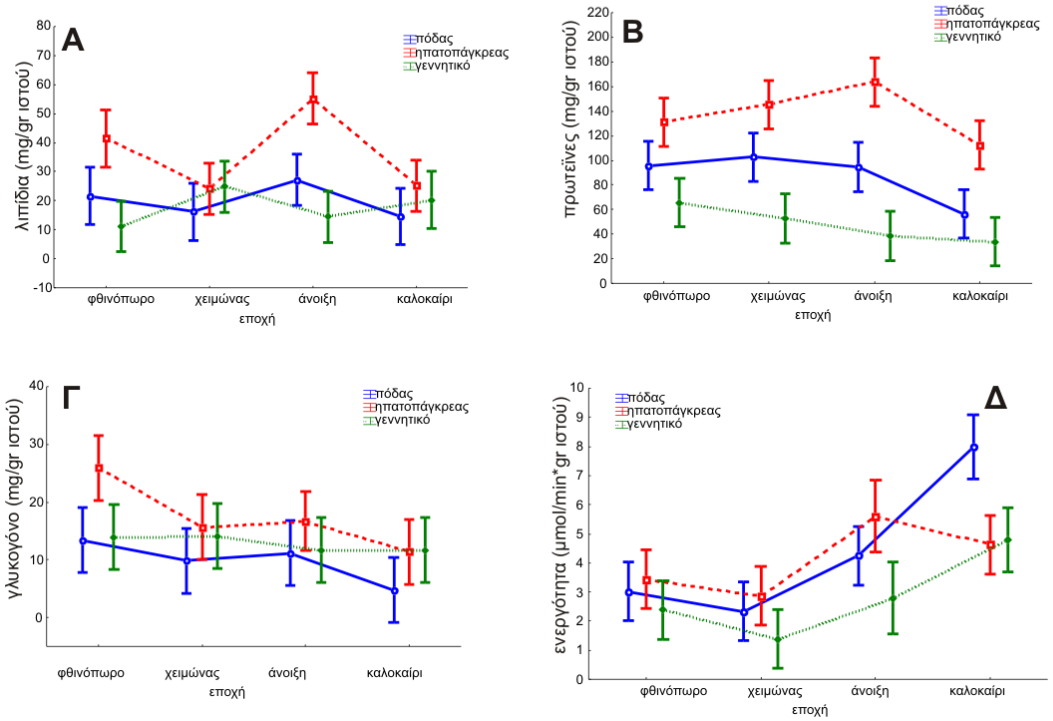
σταθερά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους ενώ παρατηρείται μείωση κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ($F_{3,16}$=7,1117, p=0,002987). Παρόμοιο πρότυπο ακολουθείται και στο ηπατοπάγκρεας, αν και σε αυτή την περίπτωση οι διαφορές που παρατηρούνται είναι οριακά μη σημαντικές (Πίνακας 4.8), ωστόσο, ο εκ των υστέρων έλεγχος (Tukey test) έδειξε ότι την άνοιξη η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι υψηλότερη και διαφέρει από αυτή του καλοκαιριού. Στο γεννητικό σύστημα διατηρούνται σχεδόν σταθερά επίπεδα πρωτεϊνών καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Πίνακας 4.8).

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση του γλυκογόνου

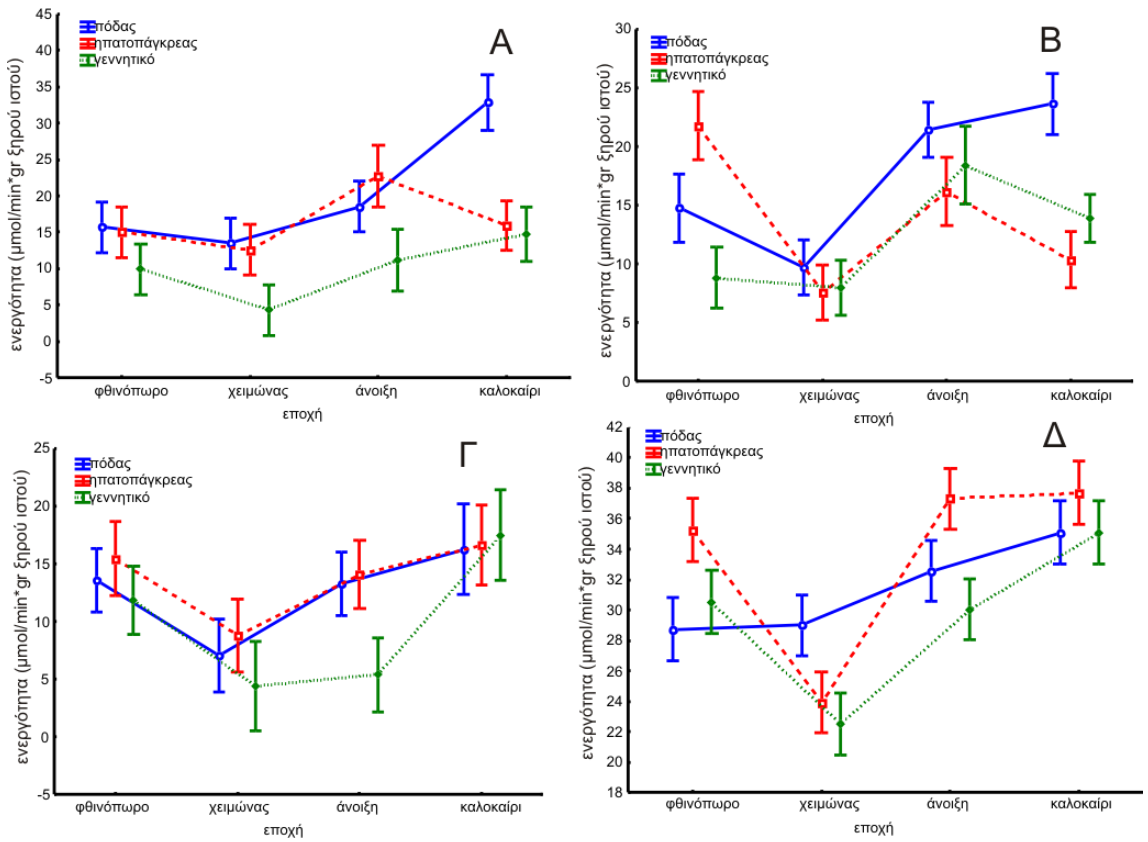
Αν και στην Εικόνα 4.3.Γ φαίνεται ότι η συγκέντρωση του γλυκογόνου κατά τις περιόδους δραστηριότητας (φθινόπωρο και άνοιξη) είναι ελαφρώς υψηλότερη από αυτή κατά τις περιόδους διαθέρισης/διαχείμασης οι διαφορές στην αλληλεπίδραση ιστών και εποχών δεν είναι σημαντικές (Πίνακας 4.8). Συγκεκριμένα, το γλυκογόνο διατηρείται σε σταθερά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους στο ηπατοπάγκρεας και στο γεννητικό σύστημα (Πίνακας 4.8) ενώ στον πόδα διαφέρει οριακά ανάμεσα στο καλοκαίρι και το φθινόπωρο ($F_{3,16}$=3,3429, p=0,04574) κατά τη διάρκεια του οποίου η συγκέντρωση του γλυκογόνου αυξάνεται.

Εποχική μεταβολή στη δραστικότητα της LDH

Η δραστικότητα της LDH (Εικόνα 4.3.Δ και Πίνακας 4.9) διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα το φθινόπωρο και τον χειμώνα και αυξάνεται σταδιακά κατά την άνοιξη και το καλοκαίρι. Ο πόδας και το γεννητικό ακολουθούν ακριβώς το ίδιο πρότυπο όπου η μέγιστη τιμή δραστικότητας του ενζύμου καταγράφεται το καλοκαίρι (Πίνακας 4.8). Παρόμοιο πρότυπο ακολουθείται και στο ηπατοπάγκρεας παρόλο που στον ιστό αυτό η μέγιστη τιμή δραστικότητας καταγράφεται την άνοιξη (Πίνακας 4.8). Ο εκ των υστέρων έλεγχος (Tukey test) που ακολούθησε έδειξε ότι η δραστικότητα του ενζύμου δεν διαφέρει στατιστικά ανάμεσα στην άνοιξη και το καλοκαίρι. Τέλος, εάν εξεταστεί η δραστικότητα της LDH (Εικόνα 4.4.Α) ανά μονάδα ξηρού βάρους δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στο πρότυπο που περιγράφηκε προηγουμένως ($F_{6,54}$=6,5964, p<0,0001).



Εικόνα 4.3. Εποχικές μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων (Α), των πρωτεϊνών (Β), του γλυκογόνου (Γ) και της δραστικότητας της LDH (Δ) σε τρεις ιστούς (πόδας, ηπατοπάγκρεας, γεννητικό σύστημα) του είδους *C. parnassia*.



Εικόνα 4.4. Εποχικές μεταβολές στη δραστικότητα της LDH για τρεις ιστούς (πόδας, ηπατοπάγκρεας, γεννητικό σύστημα) στα είδη *C. parnassia* (A), *C. intusplicata* (B), *C. eucineta* (Γ) και *C. helenae* (Δ). Η δραστικότητα της LDH εκφράζεται σε μmol/min×gr **ξηρού** ιστού. Οι υπολογισμοί για το είδος *C. helenae* έγιναν με βάση τις μετρήσεις που αναφέρονται από τους Giokas *και συν.* (2007). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

4.3.1.2. C. intusplicata

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των λιπιδίων

Η συγκέντρωση των λιπιδίων (Εικόνα 4.5.A) παρουσιάζει διακυμάνσεις τόσο μεταξύ των ιστών ($F_{2,57}$=22,841, p<0,0001) όσο και μεταξύ των εποχών που μελετήθηκαν ($F_{3,62}$=7,57, p=0,0002, συγκεκριμένα στον πόδα διαφέρει η άνοιξη από τις άλλες εποχές, στο ηπατοπάγκρεας ο χειμώνας από το καλοκαίρι, στο γεννητικό ο χειμώνας από άνοιξη-φθινόπωρο). Συγκεκριμένα, στο ηπατοπάγκρεας αυξάνεται σταδιακά η συγκέντρωση των λιπιδίων από το φθινόπωρο ως τον χειμώνα ενώ από την άνοιξη παρατηρείται σταδιακή μείωση ως το καλοκαίρι. Στο γεννητικό σύστημα τα επίπεδα των λιπιδίων διατηρούνται χαμηλά το καλοκαίρι και το φθινόπωρο ενώ αυξάνονται σημαντικά το χειμώνα, για να ακολουθήσει μείωση τους κατά την άνοιξη. Στον πόδα παρατηρείται σταδιακή αύξηση από το φθινόπωρο ως την άνοιξη όταν και καταγράφεται η υψηλότερη συγκέντρωση ενώ το καλοκαίρι τα επίπεδα των λιπιδίων

είναι όμοια με αυτά του φθινοπώρου (Πίνακας 4.7). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα ζώα λίγο πριν εισέλθουν στη διάπαυση του καλοκαιριού (Μάιος), αυξάνουν τα επίπεδα των λιπιδίων στο ηπατοπάγκρεας και στο γεννητικό ($F_{4,41}$=7,4808, p=0,0001), ενώ στον πόδα η συγκέντρωση των λιπιδίων παραμένει σχετικά σταθερή (Εικόνα 4.6.Α).

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών (Εικόνα 4.5.Β) διαφέρουν μεταξύ των ιστών ($F_{2,70}$=32,6979, p<0,00001) και μεταξύ των εποχών ($F_{3,70}$=18,4316, p<0,0001, κατά κύριο λόγο διαφοροποιείται το καλοκαίρι από τις άλλες εποχές) αλλά όχι στην αλληλεπίδραση ιστών και εποχών ($F_{6,70}$=1,0209, p=0,4190). Το ηπατοπάγκρεας και το γεννητικό σύστημα ακολουθούν το ίδιο πρότυπο διατηρώντας υψηλότερα επίπεδα το φθινόπωρο και την άνοιξη, ελαφρώς χαμηλότερα τον χειμώνα ενώ κατακόρυφη μείωση παρατηρείται κατά τη θερινή περίοδο (Πίνακας 4.7). Στον πόδα παρατηρούνται υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών από το φθινόπωρο ως και την άνοιξη (μέγιστη συγκέντρωση) για να ακολουθήσει κατακόρυφη μείωση κατά το καλοκαίρι ($F_{3,26}$=18,6741, p<0,0001). Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η μείωση στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών φαίνεται να αρχίζει από τον Μάιο (Εικόνα 4.6.Γ), ωστόσο οι διαφορές που καταγράφονται ανάμεσα στον Μάιο και τον Ιούλιο δεν είναι σημαντικές ($F_{4,47}$=0,873, p=0,487) και η μόνη διαφορά για την οποία μπορεί να γίνει λόγος είναι στον πόδα ανάμεσα σε Απρίλιο και Ιούλιο που φαίνεται να υπάρχει μείωση.

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση του γλυκογόνου

Η μεταβολή της συγκέντρωσης του γλυκογόνου (Εικόνα 4.5.Γ) διαφέρει από το πρότυπο που καταγράφηκε στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Ωστόσο τα επίπεδα του γλυκογόνου δεν φαίνεται να μεταβάλλονται ανάλογα με τον υπό μελέτη ιστό ($F_{2,57}$=1,918, p=0,156) αλλά μεταβάλλονται ανάλογα με την εποχή ($F_{3,57}$=63,726, p<0,00001). Το ηπατοπάγκρεας και το γεννητικό σύστημα ακολουθούν ακριβώς το ίδιο πρότυπο, συγκεκριμένα διατηρούν σταθερά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους ενώ αυξάνουν κατά πολύ τα επίπεδα του γλυκογόνου τον χειμώνα (Πίνακας 4.7). Στον πόδα, η συγκέντρωση του γλυκογόνου αυξάνεται σταδιακά από το φθινόπωρο ως την άνοιξη, παρατηρείται μείωση κατά τη θερινή διάπαυση ($F_{3,20}$=8,8493, p=0,000619) ενώ δεν φαίνονται σημαντικές διαφορές από την άνοιξη στο καλοκαίρι. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η δειγματοληψία της άνοιξης πραγματοποιήθηκε τον μήνα Απρίλιο, η δειγματοληψία του Μαΐου που ακολούθησε αποκάλυψε ότι τα επίπεδα του γλυκογόνου

και στους τρεις ιστούς (Εικόνα 4.6.Γ) αυξάνονται κατά πολύ τον Μάιο και στη συνέχεια μειώνονται σε σημαντικό βαθμό κατά τη θερινή διάπαυση ($F_{4,43}$=4,3972, p=0,0045).

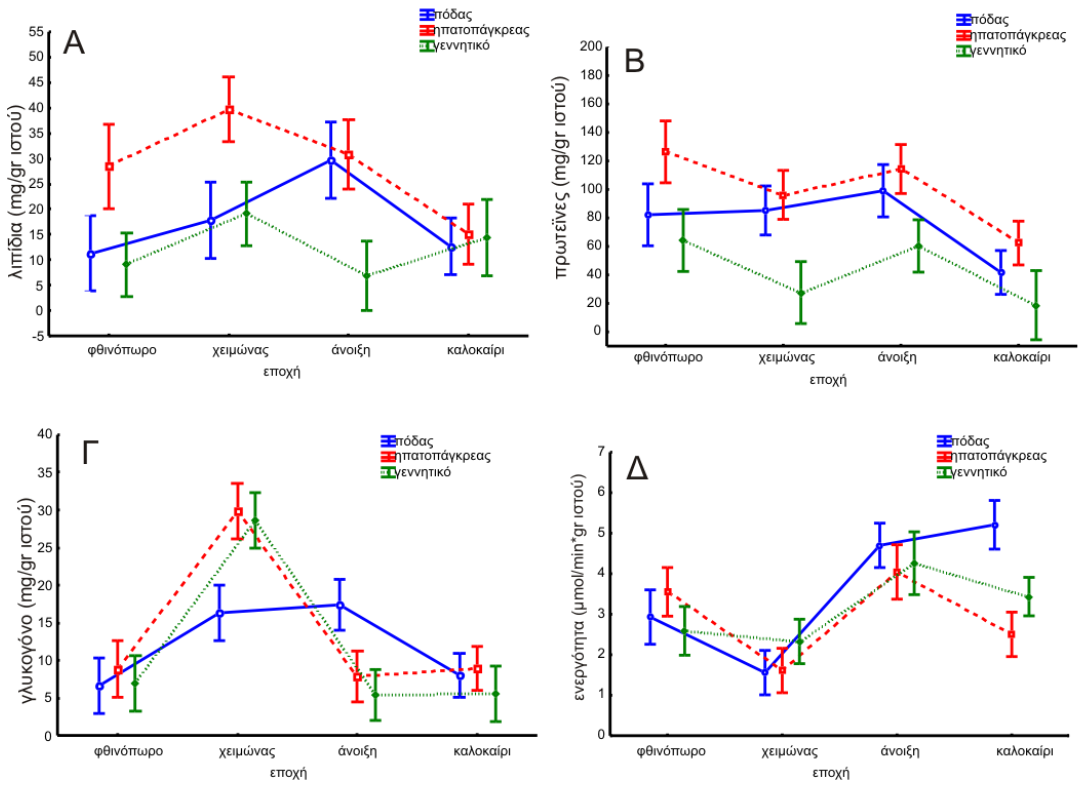
Εποχική μεταβολή στη δραστικότητα της LDH

Η δραστικότητα του ενζύμου διαφέρει ανάλογα με τον ιστό που εξετάζεται ($F_{2,52}$=5,329, p=0,0078), αλλά οι τρεις ιστοί ακολουθούν το ίδιο μοτίβο (Εικόνα 4.5.Δ) διατηρώντας χαμηλά επίπεδα τον χειμώνα τα οποία αυξάνονται την άνοιξη και το καλοκαίρι (Πίνακας 4.9). Το φθινόπωρο παρατηρούνται τιμές ενδιάμεσες αυτών που παρατηρήθηκαν το καλοκαίρι και το χειμώνα (Πίνακας 4.7). Επίσης, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του *C. parnassia*, έτσι και στην περίπτωση του *C. intusplicata* το πρότυπο αυτό δεν διαφοροποιείται αν ληφθεί υπ' όψιν το υδατικό περιεχόμενο των ιστών (Εικόνα 4.4.Β). Τέλος, τα επίπεδα της LDH δεν διαφέρουν μεταξύ Απριλίου και Μαΐου (Εικόνα 4.6.Δ) αλλά φαίνεται να αυξάνεται η δραστικότητα του ενζύμου από τον Απρίλιο ως τον Ιούλιο ($F_{4,32}$=1,748, p=0,0215).

4.3.1.3. C. eucineta

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των λιπιδίων

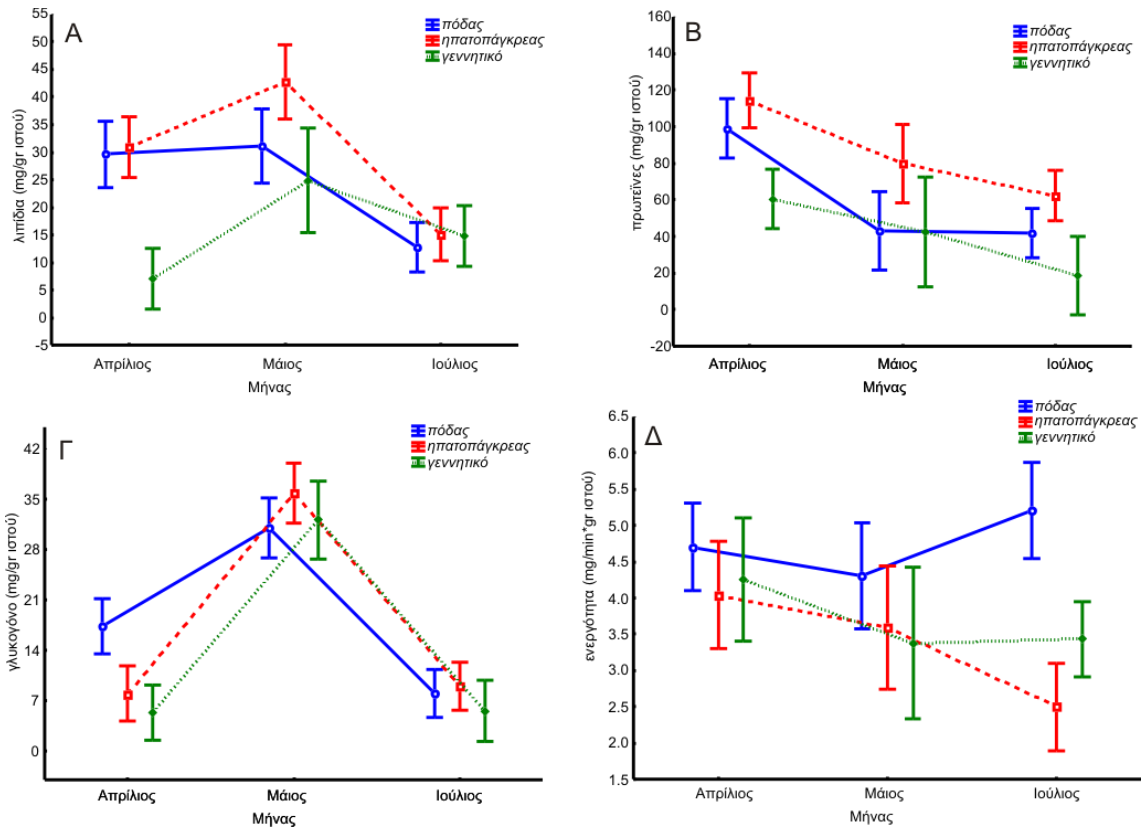
Η συγκέντρωση των λιπιδίων (Εικόνα 4.7.Α) δεν φαίνεται να διαφέρει ούτε μεταξύ των ιστών ούτε μεταξύ των εποχών ($F_{6,57}$=1,6629, p=0,1469 με εξαίρεση τον πόδα όπου παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στη συγκέντρωση του καλοκαιριού και σε αυτή των άλλων εποχών ($F_{3,19}$=11,8569, p=0,000133)). Αντίθετα στους άλλους ιστούς φαίνεται να διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα των λιπιδίων καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Πίνακας 4.6). Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι η μείωση των λιπιδίων στον πόδα φαίνεται να αρχίζει από τον Μάιο κιόλας (Εικόνα 4.8.Α), ενώ για τους άλλους δυο ιστούς ($F_{4,33}$=5,3148, p=0,002), παρατηρείται μία ελαφρά αύξηση των λιπιδίων τον μήνα Μάιο (Εικόνα 4.8.Α).



Εικόνα 4.5. Εποχικές μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων (Α), των πρωτεϊνών (Β), του γλυκογόνου (Γ) και της δραστικότητας της LDH (Δ) σε τρεις ιστούς (πόδας, ηπατοπάγκρεας, γεννητικό σύστημα) του είδους *C. intusplicata*.

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών

Αντίθετα με όσα αναφέρθηκαν για τα λιπίδια, τα επίπεδα των πρωτεϊνών (Εικόνα 4.7.Β) διαφοροποιούνται ανάλογα με τον ιστό που εξετάζεται ($F_{2,56}$=11,658 p=0,000059) καθώς και ανάλογα με την εποχή που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία ($F_{3,56}$=8,128, p=0,000139, συγκεκριμένα στον πόδα και το ηπατοπάγκρεας το φθινόπωρο από την άνοιξη). Στον πόδα και το ηπατοπάγκρεας οι πρωτεΐνες αυξάνονται σταδιακά από το φθινόπωρο ως την άνοιξη και στη συνέχεια μειώνονται κατά το καλοκαίρι (Πίνακας 4.6). Στο γεννητικό σύστημα παρά τη μείωση που φαίνεται να συμβαίνει κατά το χειμώνα οι πρωτεΐνες διατηρούνται σε σχεδόν σταθερά επίπεδα ($F_{3,17}$=1,4368, p=0,2669). Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση των λιπιδίων, η μείωση των πρωτεϊνών φαίνεται να αρχίζει από τον Μάιο και για τους τρείς ιστούς (Εικόνα 4.8.Β) αν και η αλληλεπίδραση των παραγόντων μήνας και ιστός δείχνει ότι οι διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($F_{4,31}$=0,704, p=0,595).



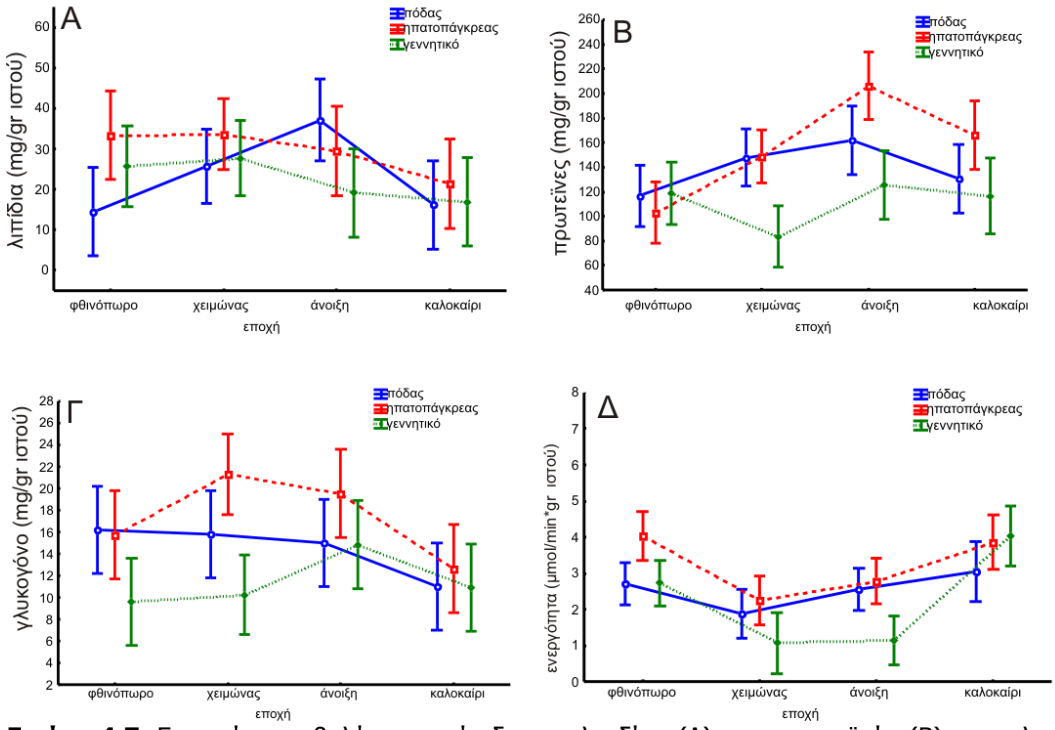
Εικόνα 4.6. Μηνιαία μεταβολή στα επίπεδα των λιπιδίων (Α), των πρωτεϊνών (Β), του γλυκογόνου (Γ) και της δραστικότητας της LDH (Δ) σε τρεις ιστούς (πόδας, ηπατοπάγκρεας, γεννητικό σύστημα) του είδους *C. intusplicata*.

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση του γλυκογόνου

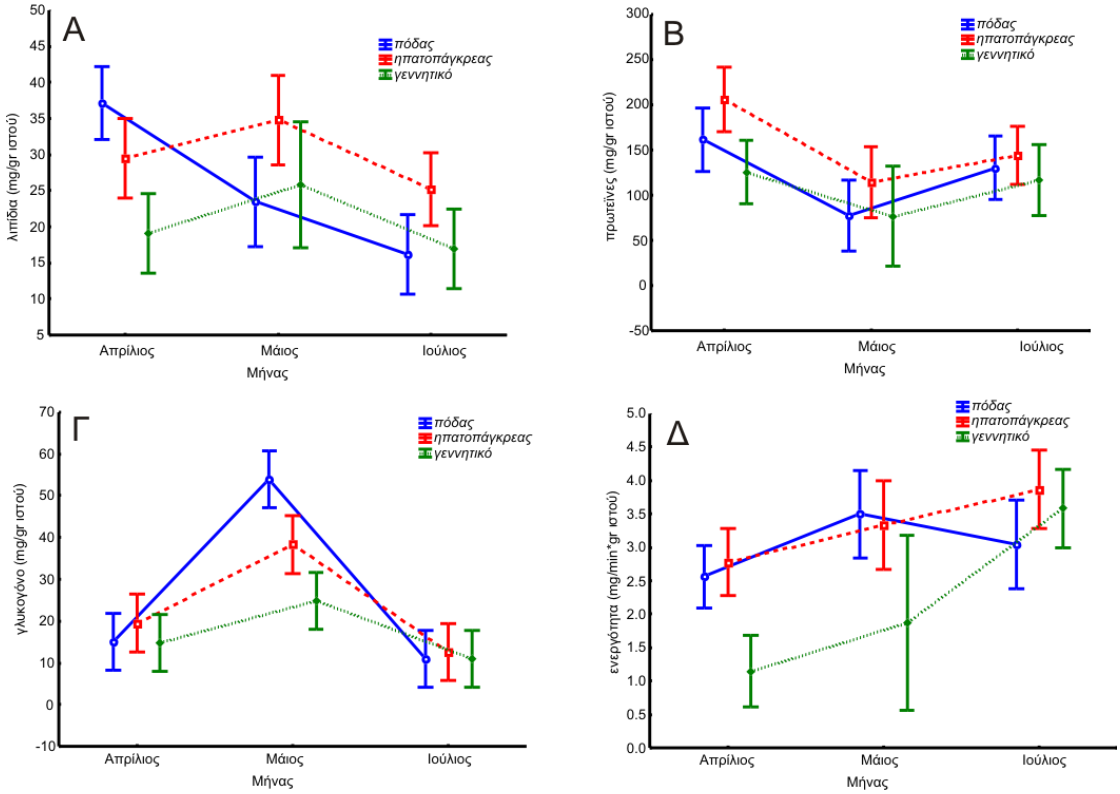
Διαφορές τόσο μεταξύ των ιστών ($F_{2,50}$=9,1172, p=0,000421) όσο και των εποχών ($F_{3,50}$=3,7278, p=0,01711) καταγράφονται στη συγκέντρωση του γλυκογόνου (Εικόνα 4.7.Γ). Συγκεκριμένα, το γλυκογόνο φαίνεται να συσσωρεύεται στο γεννητικό σύστημα την άνοιξη και μειώνεται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ($F_{3,17}$=4,4441, p=0,01764). Οι δυο άλλοι ιστοί διατηρούν σχεδόν σταθερά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Πίνακας 4.6). Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση του *C. intusplicata*, έτσι και στο *C. eucineta* τα επίπεδα του γλυκογόνου μετά τον Απρίλιο αυξάνονται κατά πολύ και στους τρεις ιστούς (Εικόνα 4.8.Γ) για να ακολουθήσει μείωση τους το καλοκαίρι ($F_{4,36}$=6,3863, p=0,0005).

Εποχική μεταβολή στη δραστικότητα της LDH

Η δραστικότητα του ενζύμου (Εικόνα 4.7.Δ και Πίνακας 4.9) εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ ιστών ($F_{2,59}$=8,0866, p=0,000788) και των εποχών ($F_{3,59}$=17,144, p<0,000001, συγκεκριμένα διαφέρει στο ηπατοπάγκρεας και το γεννητικό το φθινόπωρο από άνοιξη-χειμώνα). Στο ηπατοπάγκρεας και στο γεννητικό διατηρούνται υψηλά επίπεδα δραστικότητας της LDH το καλοκαίρι και το φθινόπωρο και χαμηλότερα επίπεδα τον χειμώνα και την άνοιξη (Πίνακας 4.6). Αντίθετα στον πόδα, παρά το ότι φαίνεται να υπάρχουν μεταβολές, αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($F_{3,22}$=1,1861 p=0,3378). Επίσης η αύξηση στη δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται να αρχίζει από Μάιο ($F_{4,35}$=3,7839, p=0,011) κιόλας και να διατηρείται στα ίδια περίπου επίπεδα και το καλοκαίρι (Εικόνα 4.8.Δ). Τέλος, όταν αφαιρέθηκε το υδατικό περιεχόμενο των ιστών από τους υπολογισμούς (Εικόνα 4.4.Γ), αν και η αλληλεπίδρση των ιστών και των εποχών δεν είναι πια στατιστικά σημαντική ($F_{6,59}$=1,804, p=0,113) παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση σε όλους τους ιστούς το καλοκαίρι ($F_{3,59}$=17,408, p<0,0001).



Εικόνα 4.7. Εποχικές μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων (Α), των πρωτεϊνών (Β), του γλυκογόνου (Γ) και της δραστικότητας της LDH (Δ) σε τρεις ιστούς (πόδας, ηπατοπάγκρεας, γεννητικό σύστημα) του είδους *C. eucineta*.



Εικόνα 4.8. Μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων (Α), των πρωτεϊνών (Β), του γλυκογόνου (Γ) και της δραστικότητας της LDH (Δ) για τους μήνες Μάιο, Απρίλιο και Ιούλιο σε τρεις ιστούς (πόδας, ηπατοπάγκρεας, γεννητικό σύστημα) του είδους *C. eucineta*.

Πίνακας 4.5. Μέτρα θέσης και διασποράς για τις βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν (λιπίδια, πρωτεΐνες, γλυκογόνο, LDH και ποσοστό νερού). Παρουσιάζονται ο μέσος όρος, η διάμεσος, η τυπική απόκλιση και το μέγεθος του δείγματος για την κάθε μέτρηση, το κάθε είδος και την κάθε εποχή. Συντομογραφίες: euc: *C. eucineta*, int: *C. intusplicata*, par: *C. parnassia*, ΙΣΤ: ιστός, ΗΠ: ηπατοπάγκρεας, ΠΔ: πόδας, ΓΝ: γεννητικό, ΕΠ: εποχή, Διαμ.: διάμεσος, SD: τυπική απόκλιση, N: αριθμός ατόμων, ΦΘ: φθινόπωρο, ΧΕ: χειμώνας, ΑΝ: άνοιξη, ΚΑ: καλοκαίρι.

			Λιπίδια				**Πρωτεΐνες**				**Γλυκογόνο**				**LDH**				**Ποσοστό νερού**			
Είδος	**ΙΣΤ**	**ΕΠ**	**Μέσος**	**Διάμ.**	**SD**	**N**	**Μέσος**	**Διάμ.**	**SD**	**N**	**Μέσος**	**Διάμ.**	**SD**	**N**	**Μέσος**	**Διάμ.**	**SD**	**N**	**Μέσος**	**Διάμ.**	**SD**	**N**
euc	ΗΠ	ΦΘ	33,36	24,99	19,01	5	103,11	100,00	12,00	6	15,75	15,15	4,71	5	4,04	3,72	0,99	8	73,90	73,85	2,10	4
		ΑΝ	29,46	28,23	6,85	6	206,11	205,24	26,41	5	19,54	19,96	3,24	6	2,78	2,86	0,32	8	80,28	82,35	6,10	6
		ΚΑ	21,38	20,81	1,81	5	166,15	178,85	27,52	5	12,65	14,69	3,59	5	3,86	3,91	0,44	4	76,79	75,00	6,19	4
		ΧΕ	33,63	28,89	22,91	7	148,74	169,51	39,07	7	21,29	16,70	8,52	5	19,40	2,32	31,83	6	75,61	71,43	11,36	7
	ΠΔ	ΦΘ	14,50	15,06	1,73	5	116,66	119,95	13,74	6	16,18	16,33	4,94	5	2,71	2,98	1,44	6	80,05	80,20	1,12	4
		ΑΝ	37,13	37,92	7,81	5	161,79	169,21	32,71	5	14,98	13,52	4,21	8	2,56	2,36	0,82	7	80,74	80,00	2,18	5
		ΚΑ	16,22	15,59	5,36	5	130,38	125,00	32,59	5	11,02	10,98	1,89	5	3,04	3,04	1,02	5	81,25	80,54	6,63	4
		ΧΕ	25,69	26,06	9,43	8	147,80	146,15	23,33	8	15,80	16,37	6,41	5	1,88	1,60	0,55	6	73,24	75,00	5,58	8
	ΓΝ	ΦΘ	25,64	29,60	12,68	6	118,50	109,00	30,63	6	9,59	8,12	2,38	5	2,74	2,87	1,09	7	76,94	78,71	7,05	4
		ΑΝ	19,12	19,07	1,32	5	125,47	104,80	54,65	5	14,85	15,37	4,32	6	1,15	1,15	0,07	6	78,70	78,89	4,05	4
		ΚΑ	16,94	17,45	4,28	5	116,35	105,77	41,14	4	10,91	11,35	0,89	5	4,03	4,01	0,26	4	76,94	76,39	2,42	4
		ΧΕ	27,68	30,24	15,12	7	83,58	89,76	19,28	6	10,24	10,39	1,25	5	1,07	0,97	0,78	4	75,72	72,73	8,91	5
int	ΗΠ	ΦΘ	28,46	24,53	9,26	4	126,40	118,00	23,14	5	8,85	10,03	3,13	5	3,55	3,66	0,76	5	82,32	84,81	7,44	4
		ΑΝ	30,90	27,67	12,77	6	114,34	108,97	25,59	8	7,93	7,88	0,31	6	4,04	4,03	1,52	4	75,01	73,17	3,46	5
		ΚΑ	15,12	15,52	5,21	8	62,38	62,77	31,27	10	8,97	8,25	5,15	8	2,50	2,41	0,30	6	75,83	76,93	3,57	8
		ΧΕ	39,67	40,80	18,06	7	96,21	84,00	43,66	8	29,89	25,74	7,36	5	1,61	1,48	0,42	6	78,71	80,00	3,69	5
	ΠΔ	ΦΘ	11,32	11,66	0,80	5	82,20	80,00	16,53	5	6,62	6,26	2,01	5	2,93	3,11	0,52	4	80,18	79,58	1,68	4
		ΑΝ	29,67	27,08	9,27	5	99,08	105,77	17,52	7	17,42	17,04	5,32	6	4,70	4,83	0,88	6	78,06	79,17	3,96	7
		ΚΑ	12,69	13,91	5,02	9	41,75	37,14	18,33	10	7,95	7,53	3,15	8	5,21	5,16	0,08	5	77,99	80,38	8,97	6
		ΧΕ	17,88	18,33	1,36	5	85,25	85,33	14,81	8	16,26	18,08	6,73	5	1,56	1,84	0,57	6	83,99	83,97	5,25	6
	ΓΝ	ΦΘ	9,06	8,34	2,89	7	64,20	67,00	22,52	5	6,93	6,07	3,70	5	2,59	2,43	0,44	5	70,60	69,57	8,09	5
		ΑΝ	6,98	7,17	0,87	6	60,35	57,69	20,64	7	5,40	5,20	1,34	6	4,26	3,85	0,95	3	76,88	77,78	7,15	5

		ΚΑ	14,45	13,65	3,08	7	18,75	18,75	1,58	4	5,59	5,21	0,68	5	3,43	3,21	0,67	8	75,33	75,32	9,47	5
		ΧΕ	19,10	21,44	8,97	7	27,60	28,00	12,68	5	28,63	26,02	3,90	5	2,33	2,32	0,33	6	70,69	72,50	7,82	4
par	ΗΠ	ΦΘ	41,50	41,62	7,16	4	131,22	124,49	29,22	5	25,94	29,23	7,65	5	3,43	3,54	0,86	6	77,20	76,79	1,68	5
		ΑΝ	55,25	66,35	20,83	5	163,85	163,46	16,28	5	16,71	13,01	12,86	6	5,60	5,53	0,33	4	75,40	76,61	2,58	5
		ΚΑ	25,28	25,51	2,99	5	112,31	99,36	27,22	5	11,39	8,63	5,38	5	4,63	3,98	2,59	6	70,94	70,97	2,58	5
		ΧΕ	24,22	22,72	7,16	5	145,33	148,67	33,44	5	15,70	15,23	1,18	4	2,87	2,87	0,33	6	77,20	78,31	2,98	6
	ΠΔ	ΦΘ	21,65	20,30	8,97	4	95,51	93,88	25,66	5	13,39	14,91	3,67	5	3,01	3,07	0,13	6	80,85	80,28	2,39	5
		ΑΝ	27,20	22,85	6,70	5	94,62	101,92	19,06	5	11,19	15,62	7,23	5	4,25	4,25	0,38	6	77,10	76,46	2,13	4
		ΚΑ	14,61	15,02	2,89	4	56,35	59,62	9,16	5	4,72	3,74	1,71	5	7,99	8,15	0,92	5	75,73	76,47	3,59	5
		ΧΕ	16,24	16,22	2,65	4	102,80	108,00	11,45	5	9,83	8,91	3,53	4	2,32	2,56	0,48	6	82,76	81,89	5,54	6
	ΓΝ	ΦΘ	11,12	11,78	2,81	5	65,71	73,47	13,93	5	13,93	14,74	4,49	5	2,38	2,53	0,48	6	76,04	77,27	5,55	5
		ΑΝ	14,55	16,53	4,44	5	38,46	28,85	15,92	5	11,64	8,17	6,06	4	2,79	2,57	0,54	4	75,00	73,33	10,07	5
		ΚΑ	20,21	19,98	5,58	4	33,91	30,77	9,76	5	11,69	12,53	4,88	4	4,80	6,39	2,78	5	67,39	63,87	8,66	5
		ΧΕ	24,84	17,03	17,93	5	52,67	47,33	31,99	5	14,14	11,94	4,73	3	1,39	1,24	1,07	6	67,83	67,33	1,67	5

Πίνακας 4.6. Τιμές p και F όπως προέκυψαν από τη διπαραμετρική (Two-way ANOVA) και τη μονοπαραγοντική (One-way ANOVA) ανάλυση διακύμανσης για το υδατικό περιεχόμενο των ιστών, τη δραστικότητα της LDH και όλες τις βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν σε εποχική βάση για το είδος *C. eucineta*. Φαίνεται ακόμη το μέγεθος του δείγματος (N) που χρησιμοποιήθηκε στο κάθε πείραμα. Σύμβολα: ns: p>0.05, mns: 0,05<p<0,055, *:0,01<p<0,05, **:0,001<p<0,01, ***:p<0,001.

		Two-way ANOVA						**One-way ANOVA**		
		Επίδραση ιστού		Επίδραση εποχής		Επίδραση ιστού-εποχής		Επίδραση εποχής		
παράγοντας	ιστός	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**N**
υδατικό περιεχόμενο	πόδας							$F_{3,17}$=4,509	*	21
	ηπατοπ							$F_{3,17}$=0,751	ns	21
	γεννητ	$F_{2,47}$=0,359	ns	$F_{3,47}$=2,163	ns	$F_{6,47}$=0,409	ns	$F_{3,13}$=0,16	ns	17
ενεργότητα LDH	πόδας							$F_{3,22}$=1,186	ns	26
	ηπατοπ							$F_{3,20}$=10,347	***	24
	γεννητ	$F_{2,59}$=8,086	***	$F_{3,59}$=17,144	***	$F_{6,59}$=2,458	*	$F_{3,17}$=16,844	***	20
λιπίδια	πόδας							$F_{3,19}$=11,857	***	23
	ηπατοπ							$F_{3,19}$=0,637	ns	23
	γεννητ	$F_{2,57}$=2,191	ns	$F_{3,57}$=2,755	ns	$F_{6,57}$=1,663	ns	$F_{3,19}$=1,276	ns	23
γλυκογόνο	πόδας							$F_{3,16}$=1,296	ns	20
	ηπατοπ							$F_{3,17}$=2,495	ns	21
	γεννητ	$F_{2,50}$=9,117	***	$F_{3,50}$=3,758	*	$F_{6,50}$=1,54	ns	$F_{3,17}$=4,444	*	21
πρωτεΐνες	πόδας							$F_{3,19}$=3,23	*	23
	ηπατοπ							$F_{3,20}$=11,63	***	24
	γεννητ	$F_{2,56}$=11,66	***	$F_{3,56}$=8,128	***	$F_{6,56}$=3,401	**	$F_{3,17}$=1,43	ns	21

Πίνακας 4.7. Τιμές p και F όπως προέκυψαν από τη διπαραμετρική (Two-way ANOVA) και τη μονοπαραγοντική (One-way ANOVA) ανάλυση διακύμανσης για το υδατικό περιεχόμενο των ιστών, τη δραστικότητα της LDH και όλες τις βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν σε εποχική βάση για το είδος *C. intusplicata*. Φαίνεται ακόμη το μέγεθος του δείγματος (N) που χρησιμοποιήθηκε στο κάθε πείραμα. Σύμβολα: ns: p>0.05, *:0,01<p<0,05, **:0,001<p<0,01, ***:p<0,001.

		Two-way ANOVA						**One-way ANOVA**		
		Επίδραση ιστού		Επίδραση εποχής		Επίδραση ιστού-εποχής		Επίδραση εποχής		
παράγοντας	ιστός	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**N**
υδατικό περιεχόμενο	πόδας							$F_{3,16}$=3,691	*	20
	ηπατοπ							$F_{3,17}$=7,01	**	21
	γεννητ	$F_{2,52}$=6,038	**	$F_{3,52}$=0,211	ns	$F_{6,52}$=1,735	ns	$F_{3,16}$=2,007	ns	20
ενεργότητα LDH	πόδας							$F_{3,17}$=41,75	***	21
	ηπατοπ							$F_{3,17}$=9,645	***	21
	γεννητ	$F_{2,52}$=5,329	**	$F_{3,52}$=40,301	***	$F_{6,52}$=7,778	***	$F_{3,18}$=9,271	***	22
λιπίδια	πόδας							$F_{3,20}$=13,624	***	24
	ηπατοπ							$F_{3,21}$=5,068	**	25
	γεννητ	$F_{2,62}$=22,841	***	$F_{3,62}$=7,57	***	$F_{6,62}$=4,795	***	$F_{3,21}$=7,185	**	25
γλυκογόνο	πόδας							$F_{3,20}$=8,849	***	24
	ηπατοπ							$F_{3,20}$=27,127	***	24
	γεννητ	$F_{2,57}$=1,918	ns	$F_{3,57}$=63,727	***	$F_{6,57}$=10,118	***	$F_{3,17}$=88,209	***	21
πρωτεΐνες	πόδας							$F_{3,26}$=18,674	***	30
	ηπατοπ							$F_{3,27}$=5,790	**	31
	γεννητ	$F_{2,70}$=32,698	***	$F_{3,70}$=18,432	***	$F_{6,70}$=1,021	ns	$F_{3,17}$=8,394	**	21

Πίνακας 4.8. Τιμές p και F όπως προέκυψαν από τη διπαραμετρική (Two-way ANOVA) και τη μονοπαραγοντική (One-way ANOVA) ανάλυση διακύμανσης για το υδατικό περιεχόμενο των ιστών, τη δραστικότητα της LDH και όλες τις βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν σε εποχική βάση για το είδος *C. parnassia*. Φαίνεται ακόμη το μέγεθος του δείγματος (N) που χρησιμοποιήθηκε στο κάθε πείραμα. Σύμβολα: ns: p>0.05, mns: 0,05<p<0,055, *:0,01<p<0,05, **:0,001<p<0,01, ***:p<0,001.

		Two-way ANOVA						**One-way ANOVA**		
		Επίδραση ιστού		Επίδραση εποχής		Επίδραση ιστού-εποχής		Επίδραση εποχής		
παράγοντας	ιστός	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**N**
υδατικό περιεχόμενο	πόδας							$F_{3,19}$=1,441	ns	23
	ηπατοπ							$F_{3,18}$=2,575	ns	22
	γεννητ	$F_{2,49}$=11,60	***	$F_{3,49}$=4,89	**	$F_{6,49}$=1,73	ns	$F_{3,15}$=0,73	ns	19
ενεργότητα LDH	πόδας							$F_{3,19}$=119,63	***	23
	ηπατοπ							$F_{3,18}$=3,516	*	22
	γεννητ	$F_{2,54}$=9,573	***	$F_{3,54}$=27,453	***	$F_{6,54}$=4,151	**	$F_{3,17}$=4,826	*	21
λιπίδια	πόδας							$F_{3,13}$=4,086	*	17
	ηπατοπ							$F_{3,15}$=7,607	**	19
	γεννητ	$F_{2,43}$=20,82	***	$F_{3,43}$=4,45	**	$F_{6,43}$=5,069	***	$F_{3,15}$=1,833	ns	19
γλυκογόνο	πόδας							$F_{3,15}$=3,381	*	19
	ηπατοπ							$F_{3,16}$=2,558	ns	20
	γεννητ	$F_{2,43}$=6,992	**	$F_{3,43}$=4,037	*	$F_{6,43}$=0,955	ns	$F_{3,12}$=0,232	ns	16
πρωτεΐνες	πόδας							$F_{3,16}$=7,111	**	20
	ηπατοπ							$F_{3,16}$=3,196	mns	20
	γεννητ	$F_{2,48}$=85,42	***	$F_{3,48}$=7,709	***	$F_{6,48}$=1,978	ns	$F_{3,16}$=2,659	ns	20

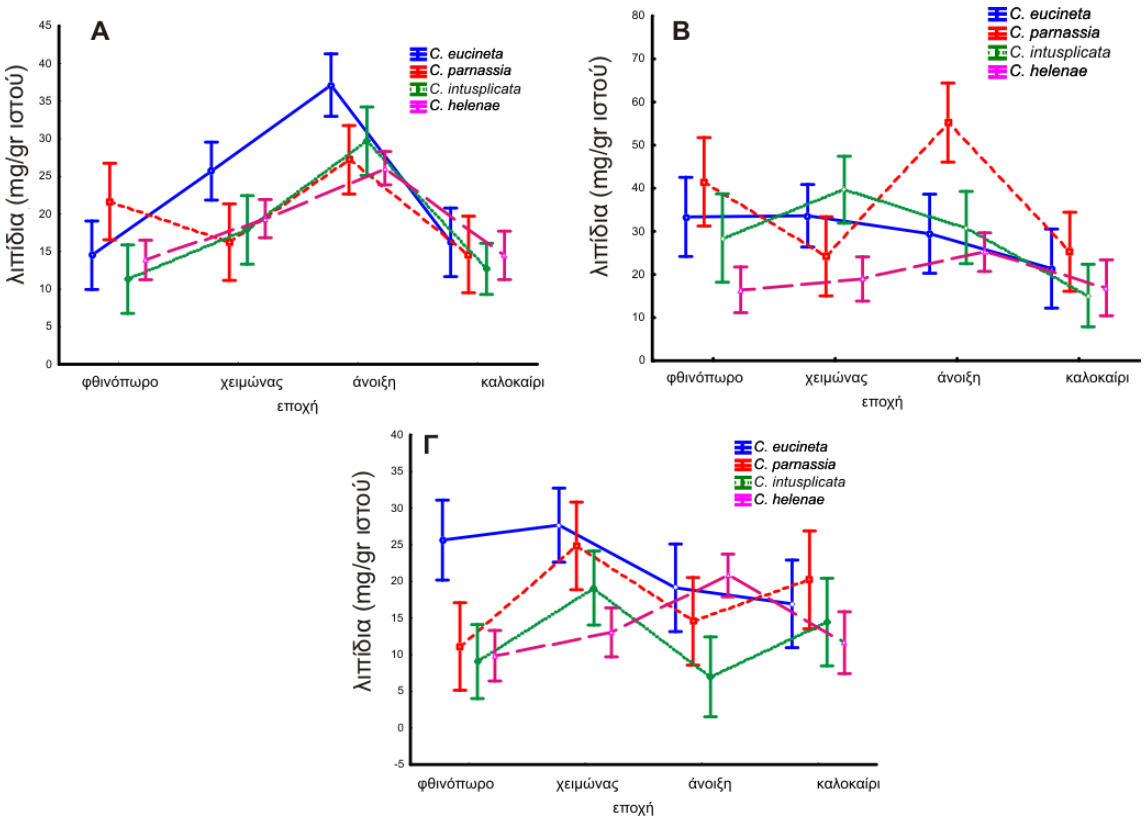
4.3.1.4. Δια-ειδική σύγκριση

Για κάθε μια από τις παραμέτρους που μετρήθηκαν (συγκέντρωση λιπιδίων, πρωτεϊνών, γλυκογόνου και δραστικότητα LDH) έγινε δια-ειδική σύγκριση των προτύπων μεταβολής που έδειξαν. Στις συγκριτικές αυτές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ακόμη δεδομένα από ένα τέταρτο είδος, το *C. helenae*, τα οποία αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία (Giokas *και συν.*, 2007).

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των λιπιδίων

Η συγκέντρωση των λιπιδίων στα 4 είδη ακολουθεί διαφορετικά πρότυπα μεταβολής, στους τρεις ιστούς που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στον πόδα (Εικόνα 4.9.Α), το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των λιπιδίων είναι το ίδιο και για τα 4 είδη αν και υπάρχουν διαφορές στην αλληλεπίδραση ειδών και εποχών ($F_{9,110}$=2,619 p=0,0088). Οι διαφορές που φαίνονται μεταξύ των εποχών ($F_{3,110}$=48,357 p<0,0001) οφείλονται κυρίως στα υψηλότερα επίπεδα της άνοιξης, σε όλα τα είδη, σε σχέση με τις άλλες εποχές (Tukey test), ενώ διαφορές υπάρχουν και μεταξύ των ειδών ($F_{3,110}$=5,867 p<0,0001) που οφείλονται κυρίως στη διαφοροποίηση του *C. helenae* από τα υπόλοιπα (καθώς επίσης και του *C. eucineta* σε σχέση με το *C. parnassia* (καλοκαίρι) και *C. intusplicata* (άνοιξη), και του *C. parnassia* με το *C. intusplicata* (καλοκαίρι)). Στο ηπατοπάγκρεας (Εικόνα 4.9.Β), οι μεταβολές των συγκεντρώσεων φαίνεται να ακολουθούν 3 διαφορετικά πρότυπα (για την αλληλεπίδραση ειδών και εποχών $F_{9,113}$=3,7987 p=0,000325). Τα είδη *C. eucineta* και *C. intusplicata* μοιράζονται ένα κοινό πρότυπο μεταβολής, ενώ τα άλλα δυο είδη ακολουθούν διαφορετικά πρότυπα. Παρ' όλα αυτά το κοινό στοιχείο για όλα τα είδη, είναι η μείωση των λιπιδίων κατά τη θερινή περίοδο. Στο γεννητικό σύστημα (Εικόνα 4.9.Γ), τα είδη *C. parnassia* και *C. intusplicata* ακολουθούν ακριβώς το ίδιο πρότυπο (για την αλληλεπίδραση ειδών και εποχών, $F_{9,113}$=5,0762 p<0,00001). Το *C. eucineta* ακολουθεί το πρότυπο των *C. parnassia* -*C. intusplicata* όλο τον χρόνο με τη μοναδική εξαίρεση το φθινόπωρο λόγω των υψηλότερων επιπέδων λιπιδίων που καταγράφονται στο είδος αυτό. Το *C. helenae* ακολουθεί ένα διαφορετικό πρότυπο συσσωρεύοντας λιπίδια την άνοιξη (αντίθετα στα άλλα τρία είδη φαίνεται μείωση κατά τη περίοδο αυτή). Τέλος, τόσο στην περίπτωση του γεννητικού συστήματος όσο και σε αυτή του ηπατοπαγκρέατος το Tukey test έδειξε ότι, γενικά η απόλυτη τιμή της συγκέντρωσης των λιπιδίων, για κάθε δεδομένη εποχή δεν διαφέρει ανάμεσα στα είδη (εξαιρούνται: για το γεννητικό σύστημα:

φθινόπωρο και για το ηπατοπάγκρεας: άνοιξη), αλλά διαφέρει το πρότυπο μεταβολής που δείχνουν τα διάφορα είδη, ως προς τα επίπεδα των λιπιδίων μέσα στον χρόνο.

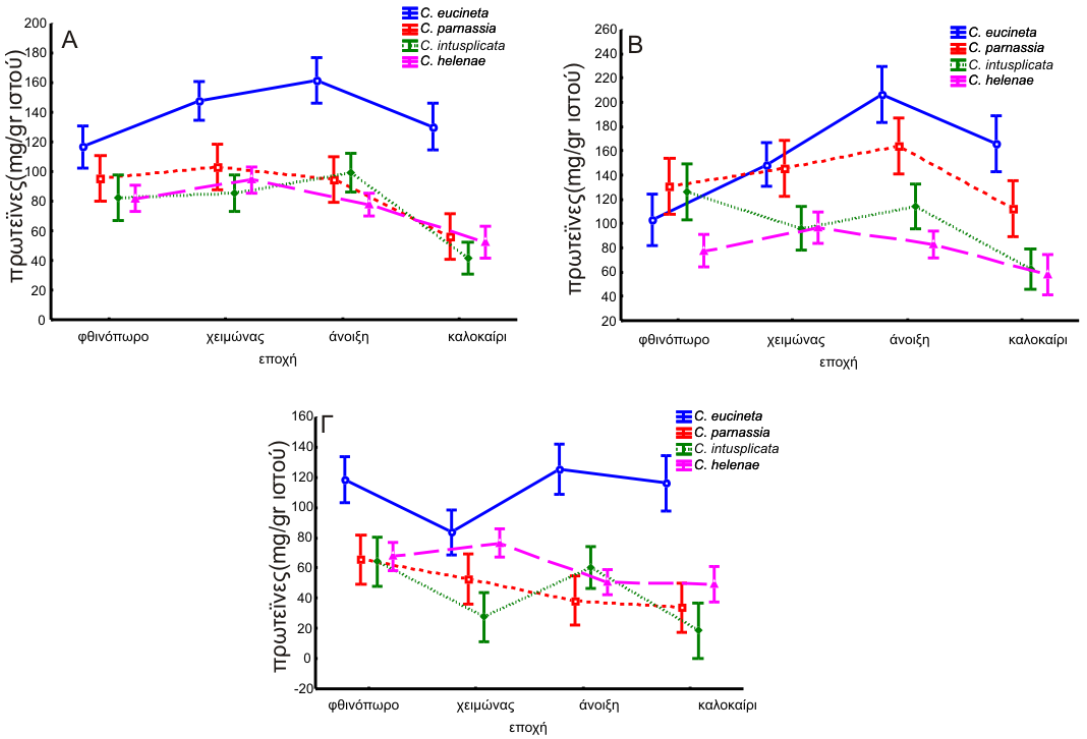


Εικόνα 4.9. Εποχικές μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων στον πόδα (Α), το ηπατοπάγκρεας (Β), το γεννητικό σύστημα (Γ) σε 4 είδη του γένους *Codringtonia* (*C. eucineta*, *C. parnassia*, *C. intusplicata* και *C. helenae*). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών

Τα είδη που μελετήθηκαν εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες ως προς το πρότυπο μεταβολής των πρωτεϊνών τους και στους 3 ιστούς που μελετήθηκαν. Πιο αναλυτικά, στον πόδα (Εικόνα 4.10.Α), το πρότυπο μεταβολής των πρωτεϊνών είναι το ίδιο και για τα 4 είδη, αν και το *C. eucineta* δείχνει υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη ($F_{9,119}$=3,847 p=0,000268). Ως προς τη μεταβολή των πρωτεϊνών στο ηπατοπάγκρεας (Εικόνα 4.10.Β), τα είδη *C. eucineta*, *C. parnassia* και *C. intusplicata* εμφανίζουν ομοιότητες καθώς συσσωρεύουν πρωτεΐνες την άνοιξη η συγκέντρωση των οποίων μειώνεται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Το *C. helenae*, ωστόσο ακολουθεί ένα διαφορετικό πρότυπο ($F_{9,121}$=6,48 p<0,00001). Οι απόλυτες τιμές γενικά δεν διαφέρουν ανάμεσα στα είδη παρά μόνο για το *C. eucineta* (χειμώνα, άνοιξη, καλοκαίρι), το οποίο διατηρεί υψηλότερες τιμές από τα *C. intusplicata* και *C. helenae*. Στο γεννητικό σύστημα (Εικόνα 4.10.Γ), τα είδη *C. eucineta* και *C. intusplicata* ακολουθούν ακριβώς το ίδιο πρότυπο μεταβολής των πρωτεϊνών τους, ενώ ομοιότητες εμφανίζουν και τα είδη *C. helenae* και *C. parnassia* μεταξύ τους, καθώς διατηρούν

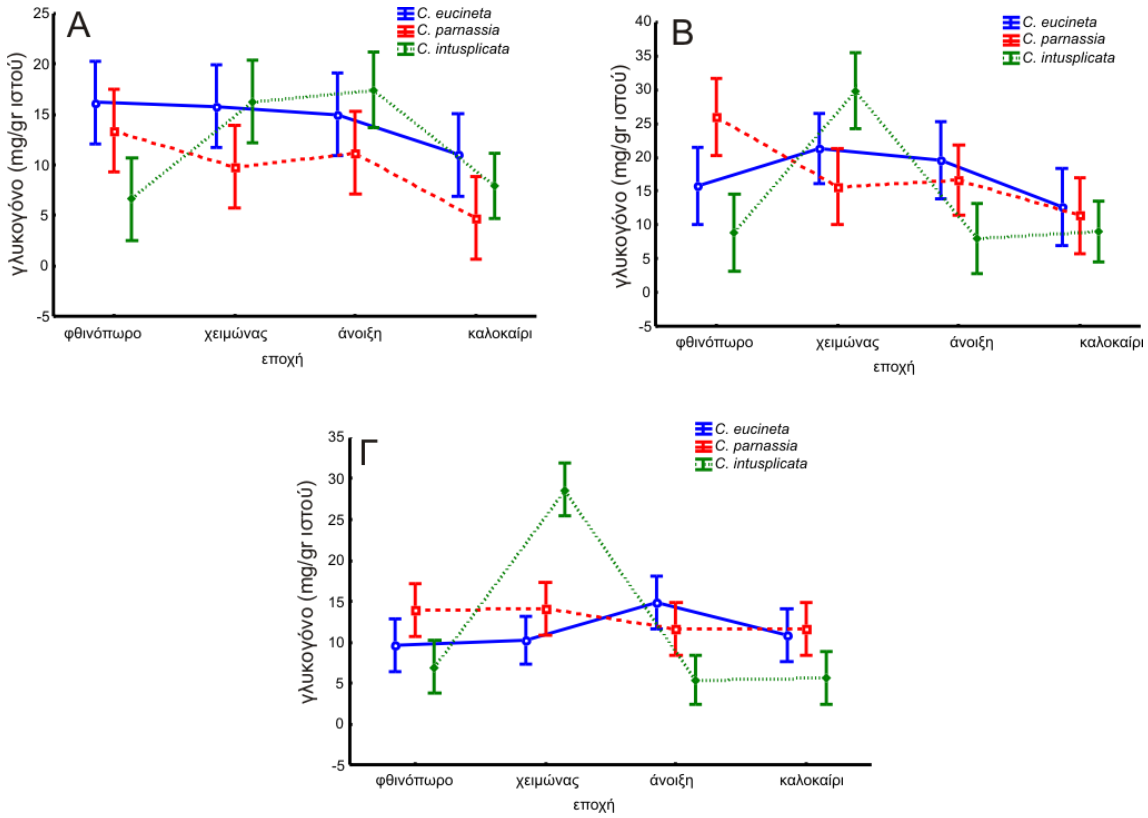
υψηλά επίπεδα το φθινόπωρο και τον χειμώνα ενώ παρατηρείται μείωσή τους την άνοιξη και το καλοκαίρι ($F_{9,108}$=5,8596 p<0,00001).



Εικόνα 4.10. Εποχικές μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών στον πόδα (Α), το ηπατοπάγκρεας (Β), το γεννητικό σύστημα (Γ) σε 4 είδη του γένους *Codringtonia* (*C. eucineta*, *C. parnassia*, *C. intusplicata* και *C. helenae*). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

Εποχική μεταβολή στη συγκέντρωση του γλυκογόνου

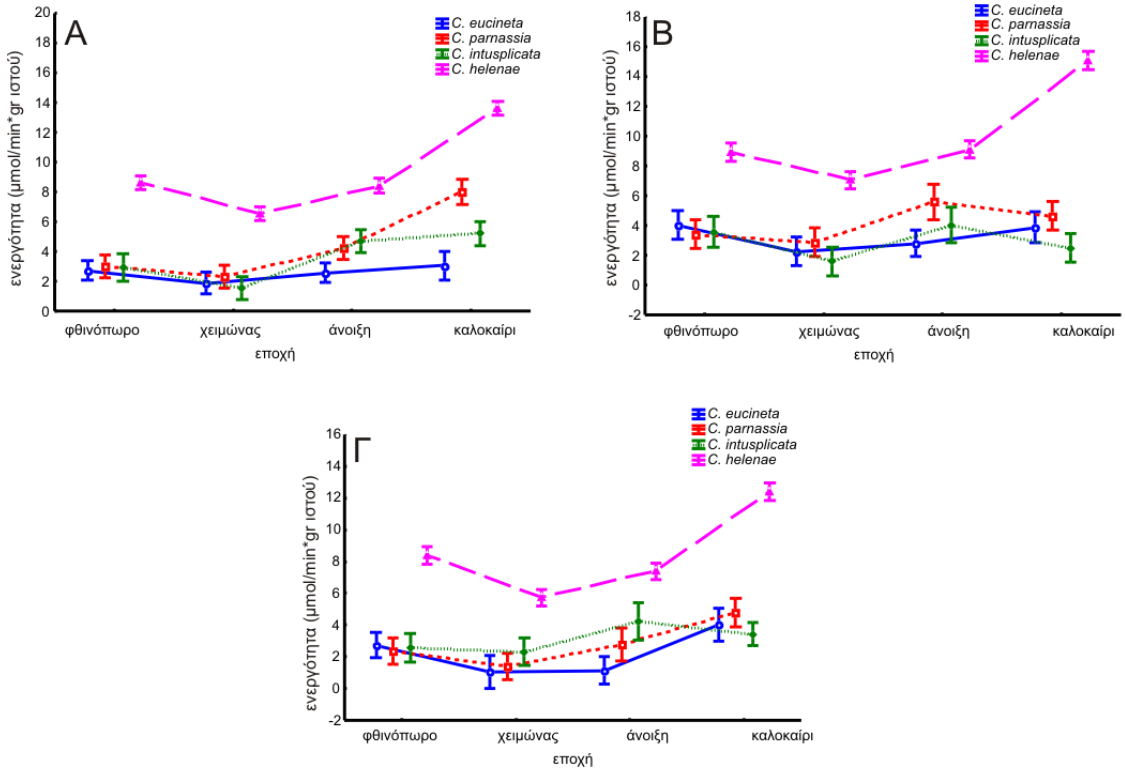
Το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης του γλυκογόνου διαφέρει επίσης στα είδη που μελετήθηκαν (Εικόνα 4.11). Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στον πόδα (Εικόνα 4.11.Α), στα είδη *C. eucineta* και *C. parnassia* διατηρείται σε υψηλά επίπεδα από το φθινόπωρο ως την άνοιξη ενώ μείωση παρατηρείται κατά τη θερινή περίοδο. Το *C. intusplicata* διαφέρει σε σχέση με τα *C. eucineta* -*C. parnassia* στο ότι το φθινόπωρο διατηρεί χαμηλά επίπεδα γλυκογόνου που αυξάνονται τον χειμώνα και την άνοιξη για να ακολουθήσει μείωση τους το καλοκαίρι ($F_{6,52}$=2,8419 p=0,01809). Στο ηπατοπάγκρεας και το γεννητικό σύστημα (Εικόνες 4.11.Β και 4.11.Γ) η μεταβολή της συγκέντρωσης του γλυκογόνου ακολουθεί 3 διαφορετικά πρότυπα στα 3 είδη ($F_{6,54}$=6,2943 p=0,00005 και $F_{6,50}$=18,626 p<0,00001 στο ηπατοπάγκρεας και το γεννητικό αντίστοιχα) με κοινό στοιχείο και στα 3 είδη, τη μείωση του γλυκογόνου κατά τη θερινή διάπαυση.



Εικόνα 4.11. Εποχικές μεταβολές στα επίπεδα του γλυκογόνου στον πόδα (Α), το ηπατοπάγκρεας (Β), το γεννητικό σύστημα (Γ) σε 3 είδη του γένους *Codringtonia* (*C. eucineta*, *C. parnassia* και *C. intusplicata*). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

Εποχική μεταβολή στη δραστικότητα της LDH

Η δραστικότητα της LDH (Εικόνα 4.12) φαίνεται να αυξάνεται την άνοιξη και το καλοκαίρι και στους 3 ιστούς και στα 4 είδη που μελετήθηκαν ($F_{9,116}$=13,383 p<0,00001, $F_{9,113}$=21,122 p<0,00001 και $F_{9,110}$=11,369 p<0,00001 για τον πόδα, το ηπατοπάγκρεας και το γεννητικό αντίστοιχα). Ως προς τη μείωση που παρατηρείται στο ηπατοπάγκρεας των ειδών *C. parnassia* και *C. intusplicata* κατά τη μετάβαση από την άνοιξη στο καλοκαίρι, το Tukey test έδειξε ότι δεν είναι στατιστικά σημαντική, επομένως, θεωρούμε ότι η δραστικότητα του ενζύμου σε αυτές τις δυο εποχές διατηρείται σε σταθερά υψηλά επίπεδα. Οι απόλυτες τιμές της δραστικότητας του ενζύμου (και στους τρεις ιστούς) είναι υψηλότερες για το είδος *C. helenae* σε σχέση με αυτές που καταγράφονται στα άλλα 3 είδη που μελετήθηκαν.



Εικόνα 4.12. Εποχικές μεταβολές στη δραστικότητα της LDH στον πόδα (Α), το ηπατοπάγκρεας (Β), το γεννητικό σύστημα (Γ) σε 4 είδη του γένους *Codringtonia* (*C. eucineta*, *C. parnassia*, *C. intusplicata* και *C. helenae*). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

Πίνακας: 4.9. Μεταβολή της μέσης της ενεργότητας της LDH ανάμεσα σε ενεργά και ανενεργά άτομα για τρία *Codringtonia*. Μελετήθηκαν τρεις ιστοί (πόδας, ηπατοπάγκρεας και γεννητικό σύστημα). Η περίοδος μη δραστηριότητας διακρίνεται περαιτέρω σε καλοκαίρι και χειμώνα. Συντμήσεις: Καλοκ: καλοκαίρι, Χειμ: χειμώνας.

	Μέση τιμή ενεργότητας LDH								
Είδος	**πόδας**			**ηπατοπάγκρεας**			**γεννητικό**		
	ενεργά	**ανενεργά**		**ενεργά**	**ανενεργά**		**ενεργά**	**ανενεργά**	
		Καλοκ.	**Χειμ.**		**Καλοκ.**	**Χειμ.**		**Καλοκ.**	**Χειμ.**
C. eucineta	2,63	3,04	1,88	3,36	3,86	2,25	2	4,03	1,065
C. intusplicata	3,99	5,208	1,55	3,77	2,25	1,61	3,21	3,43	2,32
C. parnassia	3,63	7,988	2,324	4,29	4,62	2,86	2,54	4,803	1,388

4.3.1.5. Σχέση με γεωγραφικούς και κλιματικούς παράγοντες

Γεωγραφικές παράμετροι

Όταν εφαρμόστηκαν γραμμικά μοντέλα για να διαπιστωθεί κατά πόσο τα βιοχημικά δεδομένα (ανά ιστό και ανά εποχή) ερμηνεύονται από χωρικές παραμέτρους (υψόμετρο, γεωγρ. μήκος και πλάτος) βρέθηκε ότι για τις πρωτεΐνες και τη δραστικότητα της LDH για όλες τις εποχές και για όλους τους ιστούς φαίνεται ότι **μια μόνο χωρική μεταβλητή** (υψόμετρο ή γεωγρ. μήκος ή πλάτος) **δεν αρκεί** για να ερμηνεύσει τα δεδομένα και στις περισσότερες περιπτώσεις μάλιστα, χρειάζονται και οι τρεις μεταβλητές (Πίνακας 4.10). Για τα λιπίδια και το υδατικό περιεχόμενο στις περισσότερες περιπτώσεις το μοντέλο που ερμηνεύει καλύτερα τα δεδομένα είναι αυτό που χρησιμοποιεί και τις τρεις μεταβλητές ή τουλάχιστον δύο από αυτές αλλά εδώ παρατηρούνται και κάποιες εξαιρέσεις (π.χ. για τον χειμώνα: λιπίδια σε πόδα/ηπατοπάγκρεας και νερό σε πόδα/γεννητικό, για το καλοκαίρι: λιπίδια στον πόδα και το νερό στο γεννητικό) που ερμηνεύονται και από μία μόνο χωρική μεταβλητή (Πίνακας 4.10). Σε όλες τις περιπτώσεις όμως παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ των βιοχημικών μεταβλητών και των χωρικών μεταβλητών που εξετάστηκαν (Πίνακας 4.10) (εξαιρέσεις: (α) το νερό στο γεννητικό φθινόπωρο/άνοιξη, στο ηπατοπάγκρεας τον χειμώνα και (β) τα λιπίδια στο γεννητικό το καλοκαίρι).

Κλιματικές παράμετροι

Από τον Πίνακα 4.10 (οι τιμές του R^2 αναφέρονται στο μοντέλο που επιλέχθηκε ως «καλύτερο» με βάση το κριτήριο AICc) φαίνεται ότι οι βιοχημικές παράμετροι που εξετάστηκαν εξαρτώνται από τις ακριβείς συντεταγμένες του σταθμού δειγματοληψίας και κατά συνέπεια από τις κλιματικές συνθήκες του κάθε σταθμού. Λαμβάνοντας υπ' όψιν το παραπάνω, έγινε ένας δεύτερος έλεγχος χρησιμοποιώντας διάφορα κλιματικά χαρακτηριστικά και εφαρμόζοντας την ιεραρχική κατάτμηση (HP) υπολογίστηκε αν κάποιες από αυτές τις κλιματικές μεταβλητές μπορούν να ερμηνεύσουν τα δεδομένα που προέκυψαν από τις βιοχημικές μετρήσεις (λιπίδια, πρωτεΐνες, δραστικότητα LDH, υδατικό περιεχόμενο) αλλά και τη συνεισφορά του κάθε κλιματικού παράγοντα στην ερμηνεία των βιοχημικών δεδομένων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για κάθε ιστό και κάθε εποχή χωριστά (Πίνακας 4.11, 4.12 και 4.13 για το ηπατοπάγκρεας, τον πόδα και το γεννητικό σύστημα αντίστοιχα).

Για το ηπατοπάγκρεας, για όλες τις εποχές, περισσότερο από 71% των δεδομένων που αφορούν τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τη δραστικότητα της LDH, ερμηνεύεται από τις κλιματικές μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν. Φυσικά, οι

κλιματικές μεταβλητές που ερμηνεύουν τα δεδομένα είναι δυνατόν να διαφέρουν ανάλογα με την εκάστοτε μεταβλητή ή/και εποχή που εξετάζεται (σημειώνονται με έντονους χαρακτήρες στον Πίνακα 4.11). Για παράδειγμα, τα δεδομένα που αφορούν την LDH για το καλοκαίρι (και για τα 4 είδη) ερμηνεύονται σε ποσοστό 82,7% από τα κλιματικά χαρακτηριστικά των σταθμών δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα, σημαντικό ρόλο παίζουν κατά 18,33% και 17,96% η μέγιστη και η ελάχιστη θερμοκρασία του έτους αντίστοιχα, κατά 30,73% η ελάχιστη θερμοκρασία του καλοκαιριού και κατά 21,871% η μέγιστη τιμή των κατακρημνίσεων που παρατηρούνται ετησίως στις περιοχές μελέτης (Πίνακας 4.11).

Ανάλογα, για τον πόδα και το γεννητικό σύστημα, για όλες τις εποχές, το ποσοστό των δεδομένων που αφορούν τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τη δραστικότητα της LDH και που ερμηνεύεται από τις κλιματικές μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν, κυμαίνεται μεταξύ 48% και 80,6% για τον πόδα και 55,6%-85,8% για το γεννητικό σύστημα (Πίνακες 4.12 και 4.13 αντίστοιχα). Το υδατικό περιεχόμενο των ιστών (εξαίρεση αποτελεί ο πόδας) δεν φαίνεται να ερμηνεύεται από τις διαφορές στα κλιματικά χαρακτηριστικά των περιοχών δειγματοληψίας τουλάχιστον όχι σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 4.10. Επιλογή μοντέλου (με βάση το κριτήριο AICc) και υπολογισμός του R^2, που ερμηνεύει καλύτερα τα δεδομένα για τις βιοχημικές παραμέτρους που εξετάστηκαν (λιπίδια, πρωτεΐνες, δραστικότητα LDH, υδατικό περιεχόμενο) στους 3 ιστούς (ηπατοπάγκρεας, πόδας, γεννητικό) για τα 4 είδη *Codringtonia* για κάθε μια εποχή χωριστά. Με έντονους χαρακτήρες σημειώνονται τα αποτελέσματα εκείνα που είναι στατιστικά σημαντικά. Συντ/σεις: ΥΨ: υψόμετρο, ΓΠ: γεωγρ. πλάτος, ΓΜ: γεωγρ. μήκος, ηπατ.: ηπατοπάγκρεας, γεννητ.: γεννητικό σύστημα, Rsq: η τιμή του R^2, ΜΗΔΕΝΙΚΟ: δεν υπάρχει συσχέτιση.

		ΛΙΠΙΔΙΑ		ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ		LDH		ΝΕΡΟ	
ΕΠΟΧΗ	ΙΣΤΟΣ	Μοντέλο	Rsq	Μοντέλο	Rsq	Μοντέλο	Rsq	Μοντέλο	Rsq
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	ηπατ.	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,673**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,74**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,805**	ΓΜ	0,115
	πόδας	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,406**	ΥΨ+ΓΜ	**0,518**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,606**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,772**
	γεννητ.	ΥΨ+ΓΜ	**0,548**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,496**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,84**	ΜΗΔΕΝΙΚΟ	0
ΑΝΟΙΞΗ	ηπατ.	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,456**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,58**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,91**	ΓΠ	0,106
	πόδας	ΥΨ+ΓΜ	**0,319**	ΥΨ+ΓΜ	**0,482**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,881**	ΓΠ	0,07
	γεννητ.	ΓΠ+ΓΜ	**0,723**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,608**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,973**	ΜΗΔΕΝΙΚΟ	0
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	ηπατ.	ΓΜ	**0,279**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,676**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,89**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,641**
	πόδας	ΥΨ	**0,158**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,69**	ΥΨ+ΓΜ	**0,925**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,526**
	γεννητ.	ΜΗΔΕΝΙΚΟ	0	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,887**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,779**	ΥΨ	**0,282**
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	ηπατ.	ΥΨ	**0,203**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,417**	ΓΠ+ΥΨ	**0,333**	ΜΗΔΕΝΙΚΟ	0
	πόδας	ΓΠ	**0,18**	ΥΨ+ΓΜ	**0,664**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,889**	ΓΠ	**0,393**
	γεννητ.	ΥΨ+ΓΜ	**0,166**	ΓΠ+ΓΜ	**0,584**	ΓΠ+ΓΜ+ΥΨ	**0,758**	ΓΠ	**0,189**

Πίνακας 4.11. Οι κλιματικές μεταβλητές που ερμηνεύουν τα δεδομένα για τις βιοχημικές παραμέτρους που εξετάστηκαν (λιπίδια, πρωτεΐνες, δραστικότητα LDH, υδατικό περιεχόμενο) στο ηπατοπάγκρεας όλων των ειδών *Codringtonia* και το ποσοστό των δεδομένων που ερμηνεύει η κάθε κλιματική μεταβλητή. Στον πίνακα φαίνεται το ποσοστό των δεδομένων που ερμηνεύει η κάθε κλιματική μεταβλητή, με έντονους χαρακτήρες σημειώνεται το ποσοστό για εκείνες τις μεταβλητές που συμμετέχουν στατιστικά σημαντικά (εκείνες για τις οποίες υπολογίστηκε $p<0.05$) στην ερμηνεία των δεδομένων.

ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ								**ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ**					
	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ				ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ			ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ			ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ		
	ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ					ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ			
	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq	Μέγ.	Ελάχ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq
λιπίδια	16,821	16,388	10,506	**21,05**	**23,415**	11,82	0,717	16,875	17,619	**28,608**	**24,893**	12,005	0,717
πρωτεΐνες	**22,053**	13,225	12,866	**17,104**	**25,146**	9,607	0,771	**22,814**	**14,132**	**27,456**	**26,64**	8,957	0,771
LDH	**17,897**	**16,336**	12,607	**21,303**	**20,875**	10,982	0,827	**18,333**	**17,964**	**30,735**	**21,871**	11,097	0,827
νερό	29,281	9,062	25,606	10,315	18,749	6,987	0,212	37,576	10,994	20,032	23,397	8	0,212
ΑΝΟΙΞΗ								**ΧΕΙΜΩΝΑΣ**					
	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ				ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ			ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ			ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ		
	ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ					ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ			
	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq
λιπίδια	**15,971**	15,864	16,835	**17,378**	22,507	11,445	0,717	21,311	19,785	13,786	**30,221**	14,897	0,717
πρωτεΐνες	**20,353**	12,803	**20,268**	14,298	**23,441**	8,837	0,771	**28,381**	14,274	11,371	**32,719**	**13,255**	0,771
LDH	**16,787**	**15,938**	**19,396**	17,723	**19,627**	10,528	0,827	**23,148**	**19,647**	14,75	**27,579**	**14,877**	0,827
νερό	29,845	8,314	27,454	9,247	19,314	5,826	0,212	38,015	10,365	16,208	24,389	11,023	0,212

Πίνακας 4.12. Οι κλιματικές μεταβλητές που ερμηνεύουν τα δεδομένα για τις βιοχημικές παραμέτρους που εξετάστηκαν (λιπίδια, πρωτεΐνες, δραστικότητα LDH, υδατικό περιεχόμενο) στον πόδα όλων των ειδών *Codringtonia* και το ποσοστό των δεδομένων που ερμηνεύει η κάθε κλιματική μεταβλητή. Στον πίνακα φαίνεται το ποσοστό των δεδομένων που ερμηνεύει η κάθε κλιματική μεταβλητή, με έντονους χαρακτήρες σημειώνεται το ποσοστό για εκείνες τις μεταβλητές που συμμετέχουν στατιστικά σημαντικά (εκείνες για τις οποίες υπολογίστηκε $p<0.05$) στην ερμηνεία των δεδομένων.

ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ								**ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ**					
	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ				ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ			ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ			ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ		
	ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ					ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ			
	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq	Μέγ.	Ελάχ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq
λιπίδια	15,312	14,929	11,833	16,775	25,804	15,348	0,484	16,583	16,618	19,449	**29,535**	17,815	0,484
πρωτεΐνες	10,276	**22,766**	13,947	**25,432**	8,692	18,887	0,563	14,746	**26,032**	**25,174**	11,539	22,508	0,563
LDH	8,824	**23,179**	13,515	**27,985**	10,035	**16,463**	0,65	9,149	**26,896**	**34,371**	10,461	**19,123**	0,65
νερό	16,737	17,169	12,092	**22,568**	20,001	11,432	0,806	17,105	**18,925**	**31,307**	20,931	11,733	0,806
ΑΝΟΙΞΗ								**ΧΕΙΜΩΝΑΣ**					
	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ				ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ			ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ			ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ		
	ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ					ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ			
	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq
λιπίδια	15,845	14,305	13,194	14,432	**26,905**	15,319	0,484	18,141	18,51	15,565	**31,217**	16,568	0,484
πρωτεΐνες	12,901	21,589	14,291	22,297	10,529	18,393	0,563	11,674	**31,205**	24,043	10,454	22,624	0,563
LDH	9,197	**22,741**	**17,37**	**24,425**	9,869	16,398	0,65	11,323	**30,173**	**23,208**	13,933	**21,363**	0,65
νερό	15,864	16,796	**18,602**	18,657	18,979	11,103	0,806	**21,562**	21,27	15,5	**26,426**	15,243	0,806

Πίνακας 4.13. Οι κλιματικές μεταβλητές που ερμηνεύουν τα δεδομένα για τις βιοχημικές παραμέτρους που εξετάστηκαν (λιπίδια, πρωτεΐνες, δραστικότητα LDH, υδατικό περιεχόμενο) στο γεννητικό σύστημα όλων των ειδών *Codringtonia* και το ποσοστό των δεδομένων που ερμηνεύει η κάθε κλιματική μεταβλητή. Στον πίνακα φαίνεται το ποσοστό των δεδομένων που ερμηνεύει η κάθε κλιματική μεταβλητή, με έντονους χαρακτήρες σημειώνεται το ποσοστό για εκείνες τις μεταβλητές που συμμετέχουν στατιστικά σημαντικά (εκείνες για τις οποίες υπολογίστηκε $p<0.05$) στην ερμηνεία των δεδομένων.

ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ								**ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ**					
	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ				ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ			ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ			ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ		
	ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ					ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ			
	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq	Μέγ.	Ελάχ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq
λιπίδια	13,049	**21,187**	14,942	**22,188**	9,17	19,463	0,586	**18,68**	**24,376**	**21,302**	12,549	**23,093**	0,586
πρωτεΐνες	15,048	20,236	13,362	**19,11**	11,222	21,022	0,556	**19,982**	**23,394**	17,49	14,582	**24,552**	0,556
LDH	14,715	**18,573**	12,404	**23,756**	**17,847**	12,704	0,858	**14,906**	**20,647**	**32,386**	**18,571**	13,489	0,858
νερό	18,634	13,842	25,014	15,252	14,375	12,882	0,154	27,444	17,016	17,658	20,491	17,391	0,154
ΑΝΟΙΞΗ								**ΧΕΙΜΩΝΑΣ**					
	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ				ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ			ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ			ΚΑΤΑΚΡΗ-ΜΝΙΣΕΙΣ		
	ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ					ΕΤΗΣΙΑ		ΕΠΟΧΗΣ			
	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq	Μέγ.	Ελάχ.	Μέγ.	Μέγ.	Ελάχ.	Rsq
λιπίδια	15,623	**19,885**	15,016	20,107	10,862	18,507	0,586	14,733	**28,439**	**23,024**	10,405	**23,398**	0,586
πρωτεΐνες	16,737	18,989	13,883	18,611	12,088	19,692	0,556	16,758	**24,857**	20,877	12,397	**25,112**	0,556
LDH	**14,108**	**18,118**	**18,482**	**19,918**	**16,976**	12,398	0,858	**19,061**	**23,179**	**17,064**	**23,866**	**16,83**	0,858
νερό	22,198	12,859	20,872	13,005	18,228	12,837	0,154	22,783	21,182	24,29	16,989	14,756	0,154

Έλεγχος για την ύπαρξη φυλογενετικού σήματος

Για τον έλεγχο ύπαρξης φυλογενετικού σήματος επαναλήφθηκαν οι συσχετίσεις ανάμεσα στις βιοχημικές παραμέτρους και τις χωρικές μεταβλητές (υψόμετρο, γεωγρ. πλάτος και μήκος) λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των 4 ειδών που εμπλέκονται (Phylogenetic Indepedent Contrast). Παρατηρούμε ότι συνεχίζει να υπάρχει σχέση μεταξύ κάποιων από τις μεταβλητές που αναλύθηκαν (Πίνακας 4.14) αλλά η σχέση αυτή σε τέσσερις μόνο περιπτώσεις είναι στατιστικά σημαντική (λιπίδια (ηπατοπάγκρεας/χειμώνας) με το υψόμετρο, λιπίδια (ηπατοπάγκρεας/καλοκαίρι) με το γεωγρ. μήκος, το νερό (πόδας/άνοιξη και γεννητικό/χειμώνας) με το γεωγρ. πλάτος) και σε τρεις περιπτώσεις οριακά μη σημαντική (λιπίδια (πόδας/καλοκαίρι) με το υψόμετρο, πρωτεΐνες (ηπατοπάγκρεας/φθινόπωρο) με το υψόμετρο, νερό (ηπατοπάγκρεας/άνοιξη) με το γεωγρ. πλάτος) ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις παρά το ότι ο συντελεστής συσχέτισης μπορεί να υπερβαίνει το 0,88 αυτό δεν θεωρείται στατιστικό σημαντικό ($p<0,05$).

Λιπίδια:

Υπάρχει θετική γραμμική σχέση ανάμεσα σε γεωγρ. μήκος και τα λιπίδια του ηπατοπαγκρέατος το καλοκαίρι και αρνητική ανάμεσα στο υψόμετρο και τα λιπίδια του ηπατοπαγκρέατος τον χειμώνα. Επίσης θετική σχέση (αν και οριακά μη σημαντική) παρατηρείται ανάμεσα στο υψόμετρο και τα λιπίδια του πόδα το καλοκαίρι.

Πρωτεΐνες:

Για τις πρωτεΐνες του ηπατοπαγκρέατος το φθινόπωρο παρατηρείται αρνητική γραμμική σχέση (οριακά μη σημαντική) με το υψόμετρο των σταθμών δειγματοληψίας.

Νερό:

Αρνητική σχέση (στατιστικά σημαντική) παρατηρείται ανάμεσα στο γεωγρ. πλάτος και το νερό του πόδα την άνοιξη αλλά και του γεννητικού κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Το υδατικό περιεχόμενο του ηπατοπαγκρέατος την άνοιξη φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά και γραμμικά (οριακά μη σημαντική σχέση) με το γεωγρ. πλάτος επίσης.

Πίνακας 4.14. Συντελεστής συσχέτισης του Spearman για τις μετρήσεις των βιοχημικών παραμέτρων (λιπίδια, πρωτεΐνες, δραστικότητα LDH, υδατικό περιεχόμενο) και των χωρικών μεταβλητών μετά από εφαρμογή της μεθόδου των ανεξάρτητων αντιθέσεων (PIC). Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν ανά ιστό και ανά εποχή. Με έντονα γράμματα επισημαίνονται οι περιπτώσεις όταν $r^2>0,5$ ενώ οι περιπτώσεις όπου $p<0,05$ είναι μόνο εκείνες με $r^2 = 1$ και $p=0,05$ είναι εκείνες όπου $r^2 =0,9428$. Συντμήσεις: ΥΨ: υψόμετρο, ΓΠ: γεωγρ. πλάτος, ΓΜ: γεωγρ. μήκος, ΧΕ: χειμώνας, ΦΘ: φθινόπωρο, ΑΝ: άνοιξη, ΚΑ: καλοκαίρι, ΠΟ: πόδας, ΗΠ: ηπατοπάγκρεας, ΓΕ: γεννητικό σύστημα.

ΛΙΠΙΔΙΑ															
	ΥΨ	ΓΠ	ΓΜ	ΗΠ_ΦΘ	ΗΠ_ΑΝ	ΗΠ_ΚΑ	ΗΠ_ΧΕ	ΠΟ_ΦΘ	ΠΟ_ΑΝ	ΠΟ_ΚΑ	ΠΟ_ΧΕ	ΓΕ_ΦΘ	ΓΕ_ΑΝ	ΓΕ_ΚΑ	ΓΕ_ΧΕ
ΥΨ		**-0,54286**	**0,885714**	-0,48571	-0,25714	**0,885714**	**-1**	0,028571	-0,37143	**0,942857**	-0,02857	-0,02857	0,428571	0,485714	-0,2
ΓΠ	**-0,54286**		-0,42857	0,257143	0,485714	-0,42857	0,542857	0,2	-0,54286	**-0,71429**	**-0,65714**	**-0,65714**	**-0,88571**	-0,02857	-0,02857
ΓΜ	**0,885714**	-0,42857		-0,02857	0,2	**1**	**-0,88571**	0,485714	-0,25714	**0,714286**	0,2	0,2	0,542857	**0,828571**	0,257143
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ															
	ΥΨ	ΓΠ	ΓΜ	ΗΠ_ΦΘ	ΗΠ_ΑΝ	ΗΠ_ΚΑ	ΗΠ_ΧΕ	ΠΟ_ΦΘ	ΠΟ_ΑΝ	ΠΟ_ΚΑ	ΠΟ_ΧΕ	ΓΕ_ΦΘ	ΓΕ_ΑΝ	ΓΕ_ΚΑ	ΓΕ_ΧΕ
ΥΨ		**-0,54286**	**0,885714**	**-0,94286**	0,028571	0,028571	0,028571	0,028571	-0,02857	-0,02857	-0,02857	-0,02857	-0,02857	-0,02857	0,428571
ΓΠ	**-0,54286**		-0,42857	**0,714286**	-0,48571	-0,48571	-0,48571	-0,48571	**-0,65714**	**-0,65714**	**-0,65714**	**-0,65714**	**-0,65714**	**-0,65714**	**-0,88571**
ΓΜ	**0,885714**	-0,42857		**-0,71429**	0,371429	0,371429	0,371429	0,371429	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	**0,542857**
ΝΕΡΟ															
	ΥΨ	ΓΠ	ΓΜ	ΗΠ_ΦΘ	ΗΠ_ΑΝ	ΗΠ_ΚΑ	ΗΠ_ΧΕ	ΠΟ_ΦΘ	ΠΟ_ΑΝ	ΠΟ_ΚΑ	ΠΟ_ΧΕ	ΓΕ_ΦΘ	ΓΕ_ΑΝ	ΓΕ_ΚΑ	ΓΕ_ΧΕ
ΥΨ		**-0,54286**	**0,885714**	-0,48571	**0,714286**	**-0,88571**	**-0,94286**	**-0,82857**	**0,542857**	**-0,82857**	-0,42857	0,028571	-0,37143	-0,88571	**0,542857**
ΓΠ	**-0,54286**		-0,42857	**0,714286**	**-0,94286**	0,2	**0,714286**	0,371429	**-1**	0,371429	**0,885714**	-0,48571	**-0,54286**	0,2	**-1**
ΓΜ	**0,885714**	-0,42857	1	**-0,71429**	0,485714	**-0,65714**	**-0,71429**	-0,48571	0,428571	-0,48571	**-0,54286**	0,371429	-0,25714	**-0,65714**	0,428571
LDH															
	ΥΨ	ΓΠ	ΓΜ	ΗΠ_ΦΘ	ΗΠ_ΑΝ	ΗΠ_ΚΑ	ΗΠ_ΧΕ	ΠΟ_ΦΘ	ΠΟ_ΑΝ	ΠΟ_ΚΑ	ΠΟ_ΧΕ	ΓΕ_ΦΘ	ΓΕ_ΑΝ	ΓΕ_ΚΑ	ΓΕ_ΧΕ
ΥΨ		**-0,54286**	**0,885714**	**0,828571**	**0,885714**	**0,828571**	-0,02857	**0,828571**	**0,828571**	**0,885714**	**0,828571**	**0,828571**	0,485714	**0,828571**	0,485714
ΓΠ	**-0,54286**		-0,42857	-0,37143	-0,2	-0,37143	**-0,65714**	-0,37143	-0,37143	-0,2	-0,37143	-0,37143	-0,25714	-0,37143	-0,25714
ΓΜ	**0,885714**	-0,42857		0,485714	**0,657143**	0,485714	0,2	0,485714	0,485714	**0,657143**	0,485714	0,485714	0,028571	0,485714	0,028571

4.3.1.6. Υψομετρική διαφοροποίηση

Οι δύο ομάδες ζώων που βρίσκονται σε διαφορετικά υψόμετρα, διαφέρουν μεταξύ τους στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών ($F_{2,24}$=13,751 p=0,000105) και στη δραστικότητα της LDH ($F_{2,12}$=35,85 p=0,00001) και για τους τρεις ιστούς. Τα λιπίδια διαφέρουν $F_{2,24}$=5,92 p=0,00811) μόνο στο ηπατοπάγκρεας ενώ σταθερά παραμένουν τα επίπεδα του γλυκογόνου ($F_{2,24}$=0,10613 p=0,89973) (Εικόνα 4.13.Β) και του υδατικού περιεχομένου των ιστών ($F_{2,18}$=0,92013 p=0,4164) (Εικόνα 4.13.Δ).

4.3.2. Υδατικό περιεχόμενο και ρυθμός απώλειας νερού

Στην Εικόνα 4.14 φαίνεται η εποχική μεταβολή του υδατικού περιεχομένου των ιστών σε 3 είδη *Codringtonia* (*C. eucineta*, *C. parnassia* και *C. intusplicata*) ενώ στην Εικόνα 4.17 απεικονίζεται η απώλεια νερού (gr νερού που χάνεται ανά λεπτό έκθεσης και η ποσότητα νερού που χάνεται ανά λεπτό αν αυτή εκφραστεί ως ποσοστό του αρχικού βάρους των ζώων) σε 6 είδη *Codringtonia* όπως αυτή καταγράφηκε κατά τη διάρκεια έκθεσης των ατόμων σε θερμοκρασία 50 °C για 15 λεπτά. Ο έλεγχος για την ύπαρξη διαφοράς στον ρυθμό απώλειας νερού ανάμεσα σε ζώα που ήταν ενεργά και σε ζώα που βρίσκονταν σε διάπαυση έδειξε ότι οι δύο ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους αν ο ρυθμός απώλειας νερού ληφθεί υπ' όψιν ως απόλυτη τιμή δηλαδή ως ποσότητα νερού που χάθηκε ανά λεπτό (t-test: 3,192 p=0,015) αλλά αν η απώλεια του νερού εκφραστεί ως ποσοστό του νωπού βάρους των ατόμων τότε δεν παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα σε ενεργά και μη ζώα (t test: -0,93 p=0,38). Επομένως η κατάσταση των ζώων (ενεργά ή μη) δεν επηρεάζει τον ρυθμό απώλειας νερού και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν αρχικά οφείλονται στο διαφορετικό μέγεθος των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν. Αναλυτικά τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις διακύμανσης (ANOVA) για την εποχική μεταβολή του υδατικού περιεχομένου, φαίνονται στους Πίνακες 4.6-4.8. Στις παραγράφους που ακολουθούν παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

4.3.2.1. Εποχική μεταβολή στο υδατικό περιεχόμενο

C. intusplicata

Διατηρεί σταθερά τα επίπεδα του νερού των ιστών (Εικόνα 4.14.Α) του καθ' όλη τη διάρκεια του έτους καθώς δεν υπάρχουν διαφορές στην αλληλεπίδραση ιστών και εποχών ($F_{6,52}$=1,735 p=1,1313). Επίσης δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των εποχών ($F_{3,52}$=0,211 p=0,8885) ωστόσο παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ιστών

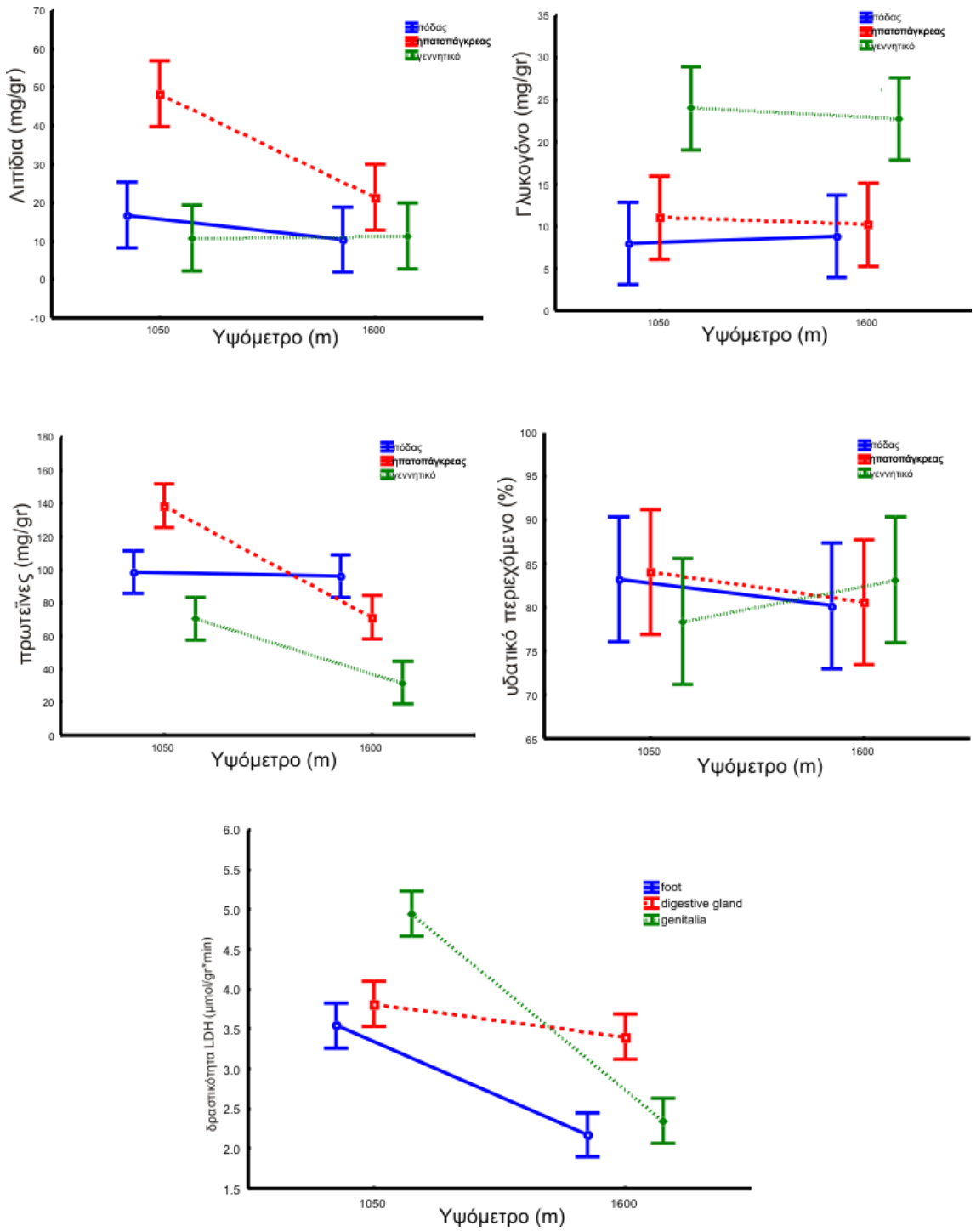
($F_{2,52}$=6,038 p=0,0043) που οφείλονται στα υψηλότερα επίπεδα νερού του πόδα κατά το χειμώνα σε σχέση με τα χαμηλά επίπεδα του γεννητικού κατά το φθινόπωρο (Tukey test).

C. eucineta

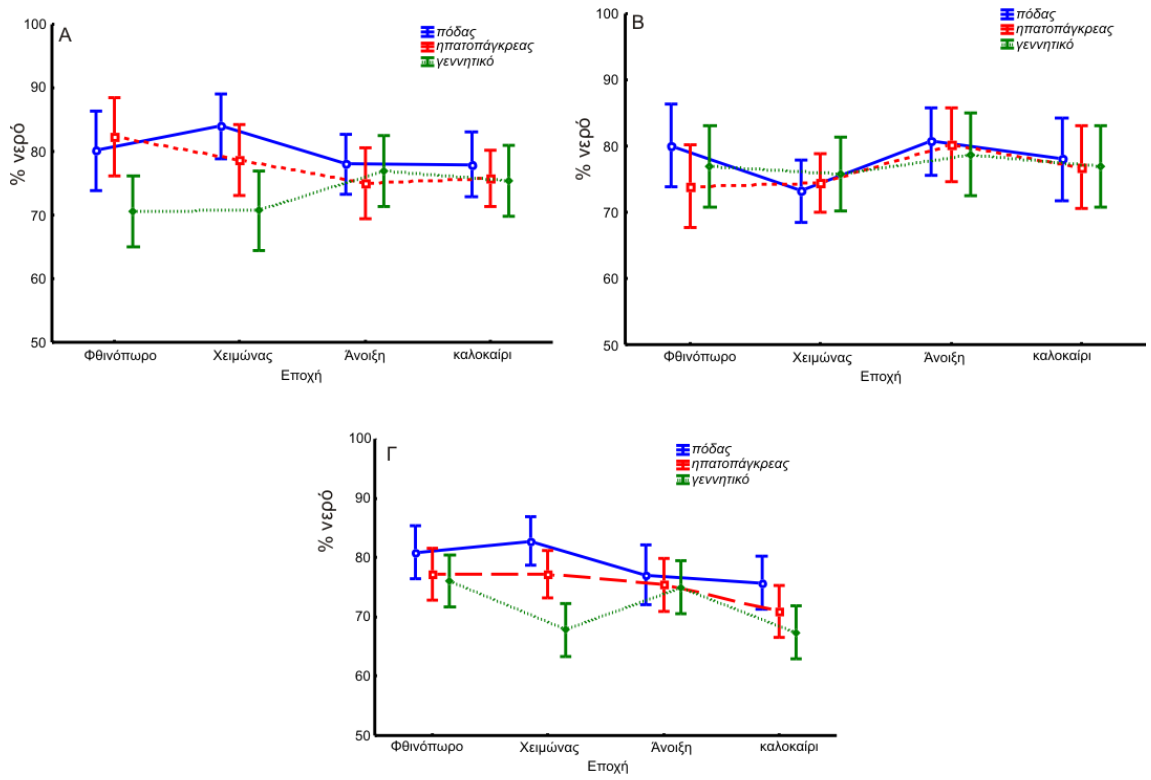
Φαίνεται επίσης να διατηρεί σταθερά τα επίπεδα του νερού των ιστών (Εικόνα 4.14.Β) του καθ' όλη τη διάρκεια του έτους ($F_{6,47}$=0,409 p=0,8691), και σε αυτό το είδος δεν παρατηρούνται διαφορές ούτε μεταξύ των ιστών ($F_{2,47}$=0,359 p=0,7004) ούτε μεταξύ των εποχών ($F_{3,47}$=2,163 p=0,10485).

C. parnassia

Στο είδος αυτό διαφορές καταγράφονται μεταξύ των ιστών ($F_{2,49}$=11,60 p<0,00001) αλλά όχι στην αλληλεπίδραση ιστών και εποχών ($F_{6,49}$=1,73 p=0,1337), που σημαίνει ότι η επίδραση που έχει ο τύπος του ιστού στη μεταβολή του υδατικού περιεχομένου ανάμεσα στις εποχές δεν διαφέρει από εποχή σε εποχή. Γενικά παρατηρείται σταθερότητα στο υδατικό περιεχόμενο των ιστών (Εικόνα 4.14.Γ) κατά τη διάρκεια του έτους, καθώς οι διαφορές ($F_{3,49}$=4,89 p=0,00473) οφείλονται στα διαφορετικά επίπεδα νερού στους διαφορετικούς ιστούς σε διαφορετικές εποχές και αν εξετάσουμε τους ιστούς χωριστά τον καθένα (Πίνακας 4.8) τότε δεν παρατηρούνται μεταβολές κατά τη διάρκεια του έτους (Tukey test).



Εικόνα 4.13. Υψομετρική μεταβολή στη συγκέντρωση των λιπιδίων (Α), του γλυκογόνου (Β), των πρωτεϊνών (Γ), του υδατικού περιεχομένου των ιστών (Δ) και τη δραστικότητα της LDH (Ε) στον πόδα, το ηπατοπάγκρεας και το γεννητικό σύστημα στο είδος *C. helenae* σε υψόμετρο 1053m και 1633m. Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

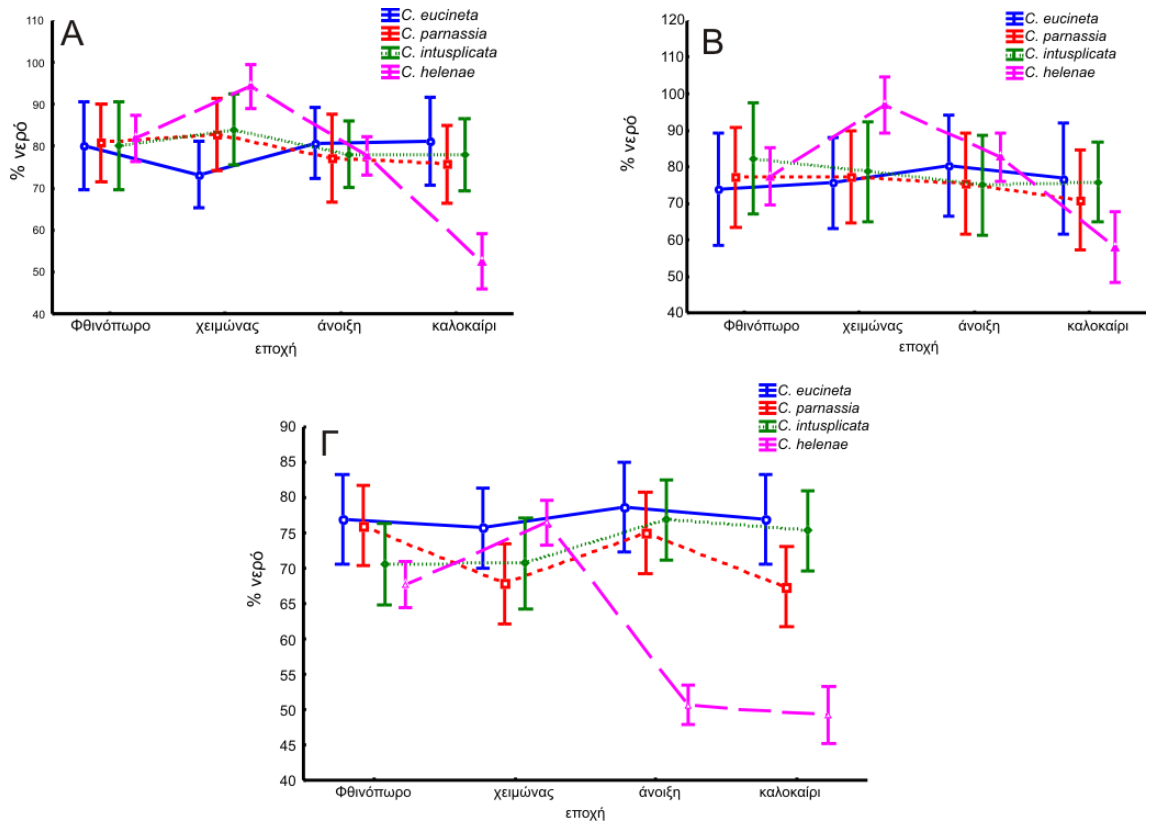


Εικόνα 4.14. Εποχικές μεταβολές στο υδατικό περιεχόμενο στα είδη *C. intusplicata* (Α), *C. eucineta* (Β) και *C. parnassia* (Γ) και σε τρεις ιστούς (πόδα, ηπατοπάγκρεας και γεννητικό σύστημα). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

Δια-ειδική σύγκριση

Από τη σύγκριση των τεσσάρων ειδών, ως προς τη μεταβολή του υδατικού περιεχομένου κατά τη διάρκεια του έτους φαίνεται ότι το *C. helenae* εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο μεταβολής του υδατικού περιεχομένου και στους τρεις ιστούς που μελετήθηκαν, ενώ τα άλλα τρία είδη διατηρούν σταθερά επίπεδα νερού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Εικόνα 4.15). Αναλυτικά, οι διαφορές που καταγράφονται στον πόδα και το ηπατοπάγκρεας (Εικόνα 4.15.Α και 4.15.Β) για τα 4 είδη ($F_{9,110}$=6,244 p<0,00001 και $F_{9,108}$=2,341 p=0,01879 για τον πόδα και το ηπατοπάγκρεας αντίστοιχα) οφείλονται αφ' ενός στα χαμηλά επίπεδα νερού του *C. helenae* κατά τη θερινή περίοδο (η διαφορά αυτή είναι ιδιαίτερα έντονη στον πόδα και λιγότερο στο ηπατοπάγκρεας) και αφ' ετέρου στα υψηλότερα επίπεδα κατά το χειμώνα σε σχέση με τα άλλα είδη (Tukey test). Τα 4 είδη γενικά δεν διαφέρουν στην εκατοστιαία περιεκτικότητα των ιστών τους σε νερό ($F_{3,110}$=0,725 p=0,5394 και $F_{3,108}$=0,295 p=0,8291 για τον πόδα και το ηπατοπάγκρεας αντίστοιχα) από το φθινόπωρο ως και την άνοιξη. Για το γεννητικό σύστημα (Εικόνα 4.15.Γ), οι διαφορές που καταγράφονται ($F_{9,102}$=13,85 p<0,00001) οφείλονται και πάλι στα πολύ χαμηλά επίπεδα νερού στο *C. helenae* κατά την άνοιξη

και το καλοκαίρι, ενώ δεν παρατηρούνται διαφορές στην εκατοστιαία περιεκτικότητα σε νερό ανάμεσα στα 4 είδη κατά το φθινόπωρο και το χειμώνα, αλλά ούτε και μεταξύ των *C. eucineta*, *C. parnassia* και *C. intusplicata* καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Tukey test).

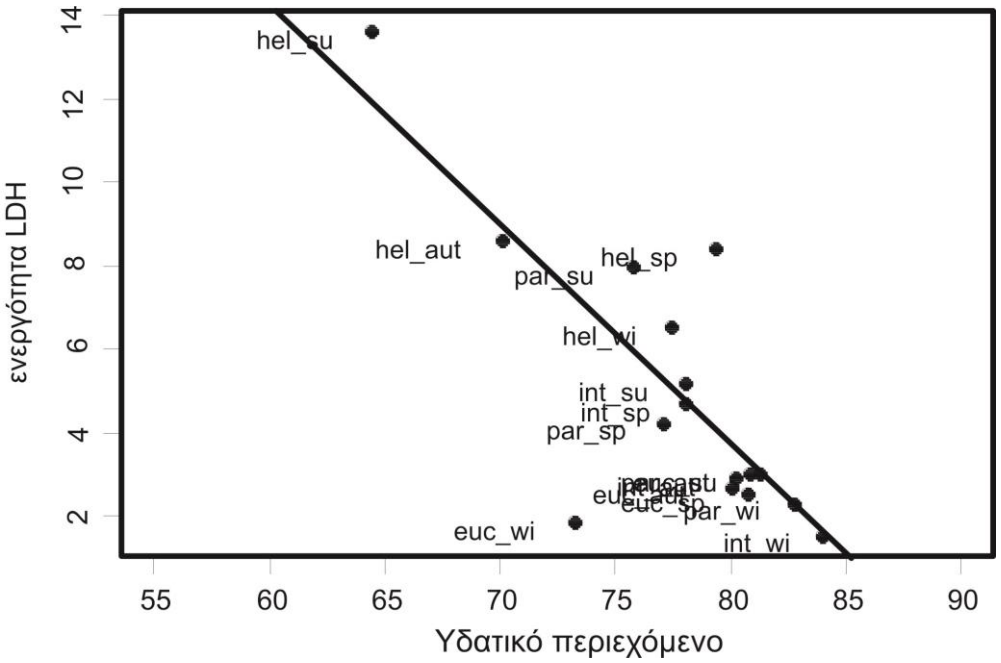


Εικόνα 4.15. Εποχικές μεταβολές στο υδατικό περιεχόμενο στον πόδα (Α), το ηπατοπάγκρεας (Β), το γεννητικό σύστημα (Γ) σε 4 είδη του γένους *Codringtonia* (*C. eucineta*, *C. parnassia*, *C. intusplicata* και *C. helenae*). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων.

Σχέση δραστικότητας LDH και υδατικού περιεχομένου

Φαίνεται να υπάρχει (αρνητική) γραμμική σχέση μεταξύ του υδατικού περιεχομένου (ανεξάρτητα από την εποχή που έγινε η μέτρηση) και της ενεργότητας του ενζύμου LDH στον πόδα (R^2=0,627 και p=0,0002 για τις μετρήσεις της LDH στον νωπό ιστό και R^2=0,302, p=0,027 όταν γίνει αναγωγή ανά μονάδα ξηρού βάρους ιστού) ενώ η σχέση αποδυναμώνεται όταν η συσχέτιση πραγματοποιείται με τις μετρήσεις της LDH μετά από την αναγωγή των τιμών ανά μονάδα ξηρού βάρους ιστού αλλά παραμένει στατιστικά σημαντική. Στους άλλους ιστούς παρατηρείται μόνο μια τάση (ηπατοπάγκρεας: R^2=0,34 και p=0,017 για τον νωπό ιστό και R^2=0,11 και p=0,2 για τον ξηρό ιστό) η οποία γίνεται στατιστικά μη σημαντική όταν ληφθεί υπ' όψιν η

ενεργότητα της LDH μετά από την αναγωγή των τιμών ανά μονάδα ξηρού βάρους ιστού.



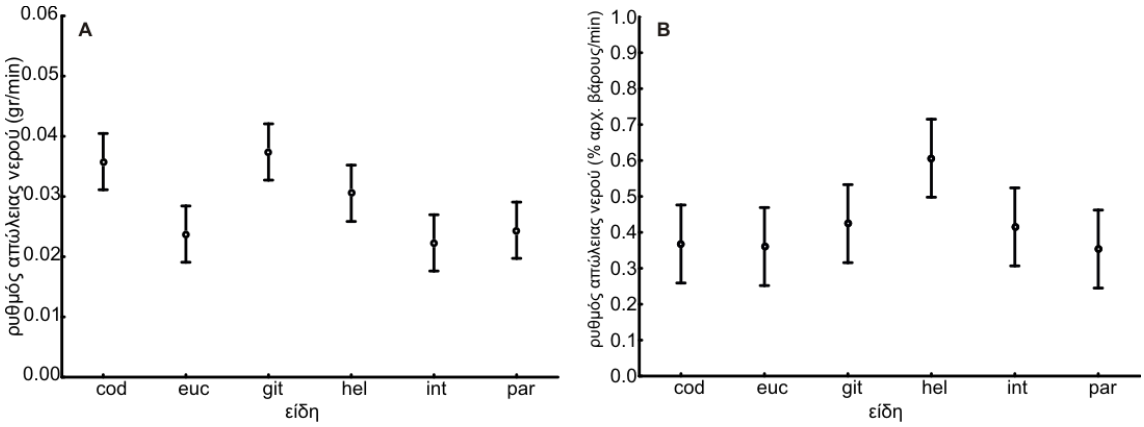
Εικόνα 4.16. Σχέση μεταξύ της ενεργότητας τους ενζύμου LDH και του υδατικού περιεχομένου σε 4 είδη *Codringtonia*. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή για τις δυο μεταβλητές που εξετάστηκαν. Συμβολισμοί: τα τρία πρώτα γράμματα του ονόματος στο κάθε σημείο δηλώνουν το είδος και συγκεκριμένα hel: *C. helenae*, euc: *C. eucineta*, int: *C. intusplicata* και par: *C. parnassia* και το δεύτερο σκέλος του ονόματος είναι χαρακτηριστικό για την εποχή και συγκεκριμένα su: καλοκαίρι, sp: άνοιξη, wi: χειμώνας και aut: φθινόπωρο.

4.3.2.2. Ρυθμός απώλειας νερού

Ως προς τον ρυθμό απώλειας νερού φαίνεται να υπάρχουν διαφορές (Εικόνα 4.17.Α) ανάμεσα στα είδη ($F_{5,24}$=8,2921 p=0,0001). Αναλυτικότερα, το είδος *C. intusplicata* έχει υποστεί τις μικρότερες απώλειες σε νερό (0,0223±0,00073 gr/min) σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους, ενώ τις μεγαλύτερες απώλειες φαίνεται να υφίστανται τα είδη *C. gittenbergeri* (0,0374±0,0023 gr/min) και *C. codringtonii* (0,0358±0,0035 gr/min) και ακολουθούν το *C. helenae* (0,0305±0,0025 gr/min) και τα *C. eucineta* και *C. parnassia* (0,0237±0,0023 και 0,0244±0,0014 gr/min αντίστοιχα). Η μετά-ανάλυση (Tukey test) έδειξε να σχηματίζονται δύο ομάδες, η πρώτη αποτελείται από τα *C. gittenbergeri*, *C. codringtonii* και *C. helenae* που υφίστανται τις μεγαλύτερες απώλειες, ενώ η δεύτερη από τα εναπομείναντα είδη που δείχνουν μικρότερες απώλειες σε νερό.

Ωστόσο, η Εικόνα 4.17.Α μπορεί να οδηγήσει σε παρερμηνείες αν δεν ληφθεί υπ' όψιν το μέγεθος των ατόμων, καθώς ορισμένα είδη του γένους διαφέρουν σημαντικά

ως προς το μέγεθος σε σχέση με κάποια άλλα (βλ. κεφάλαιο 1, Εικόνες 1.15-1.12 και κεφάλαιο 2, αποτελέσματα). Η Εικόνα 4.17.Β απεικονίζει τις απώλειες του νερού στα είδη *Codringtonia* ως ποσοστό του αρχικού βάρους των ατόμων (έχει αφαιρεθεί το βάρους του κελύφους). Παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα είδη ($F_{5,24}$=3,2878, p=0,02112) οι οποίες όμως οφείλονται στις πολύ μεγαλύτερες απώλειες νερού του *C. helenae* (0,6065±0,0763) σε σχέση με τα *C. codringtonii* (0,3677±0,0716), *C. eucineta* (0,3606±0,0208) και *C. parnassia* (0,3535±0,0362) (Tukey test), ενώ ο έλεγχος του Fisher (Fisher LSD test) έδειξε ότι οι απώλειες νερού του *C. helenae* διαφέρουν από αυτές όλων των υπολοίπων ειδών (για τα είδη *C. gittenbergeri* και *C. intusplicata* καταγράφονται απώλειες 0,4243±0,0529 και 0,4152±0,0429 αντίστοιχα).



Εικόνα 4.17. Απώλεια νερού όταν εκφράζεται ως ποσότητα (gr) ανά λεπτό (A) και ως ποσοστό επί του αρχικού νωπού βάρους των οργανισμών ανά λεπτό (B) μετά από έκθεση των ζώων σε υψηλή θερμοκρασία. Συμπεριλαμβάνονται και τα 6 είδη του γένους *Codringtonia*. Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων. Συντμήσεις: int: *C. intusplicata*, hel: *C. helenae*, git: *C. gittenbergeri*, par: *C. parnassia*, euc: *C. eucineta*, cod: *C. codringtonii*.

Ακόμη, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού απώλειας νερού (όταν εκφράζεται ως ποσοστό επί του αρχικού βάρους των ατόμων) και των διάφορων γεωγραφικών μεταβλητών που εξετάστηκαν (R^2=0,0, p=0,959 για το υψόμετρο, R^2=0,08 και p=0,58 για το γεωγρ. πλάτος και R^2=0,03 και p=0,74 για το γεωγρ. μήκος). Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι δεν πραγματοποιήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον ρυθμό απώλειας νερού (gr νερού ανά λεπτό) και το γεωγρ. πλάτος, γιατί το μέγεθος των ατόμων έχει βρεθεί (βλ. κεφάλαιο 3) να μεταβάλλεται με το γεωγρ. πλάτος (μεγαλύτερα είδη στα νότια και μικρότερα στα βόρεια της κατανομής), που σημαίνει ότι η ανάλυση θα ήταν κυκλική καθώς η όποια συσχέτιση δεν θα οφειλόταν στην επίδραση του γεωγρ. πλάτους αλλά στη διαφορά μεγέθους των ειδών.

Η ανάλυση επαναλήφθηκε λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών, καθώς είναι λογικό όταν μελετώνται είδη που είναι πιο συγγενικά μεταξύ

τους να μοιάζουν περισσότερο και ως προς τις αποκρίσεις τους (π.χ. ρυθμός απώλειας νερού). Όταν λοιπόν, λήφθηκε υπ' όψιν και αυτός ο παράγοντας φάνηκε να υπάρχει γραμμική (αρνητική) σχέση μεταξύ του ρυθμού απώλειας νερού και του γεωγρ. πλάτους καθώς και του υψομέτρου αλλά δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 4.17).

4.3.3. Επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Καθαρό RNA απομονώθηκε από 42 συνολικά άτομα τα οποία είτε είχαν εκτεθεί σε συνθήκες αφυδάτωσης είτε όχι και λειτούργησαν σαν ομάδα ελέγχου (4-5 άτομα εκτεθειμένα και 3 άτομα στην ομάδα ελέγχου ανά είδος). Στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, ο λόγος των απορροφήσεων A_{260nm}/A_{280nm} κυμαινόταν από 1,8 ως 2,1 (στα περισσότερα ήταν περίπου 2).

Σε όλα τα είδη φαίνεται να αυξάνονται τα επίπεδα του mRNA για τις Hsp70 (Εικόνα 4.18.Α) μετά από έκθεση των ατόμων σε υψηλή θερμοκρασία. Η στατιστική δοκιμασία (t test) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου και στα άτομα που εκτέθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία (Πίνακας 4.15) με εξαίρεση δύο είδη, το *C. gittenbergeri* στο οποίο παρατηρείται αύξηση κατά μέσο όρο 71,8%, ωστόσο λόγω των μεγάλων αποκλίσεων που παρατηρούνται ανάμεσα στα άτομα η αύξηση αυτή στατιστικά θεωρείται μη σημαντική, και το *C. helenae* στο οποίο παρατηρείται αύξηση κατά μέσο όρο 84,8%, ωστόσο η διαφορά αυτή θεωρείται οριακά μη σημαντική (Πίνακας 4.15). Τη μεγαλύτερη αύξηση εμφανίζει το είδος *C. intusplicata* με κατά μέσο όρο 110,5% αύξηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ακολουθούν τα *C. codringtonii* με 68,5%, *C. eucineta* με 60% και τέλος τη μικρότερη αύξηση εμφανίζει το *C. parnassia* με 57,9%. Παρ' όλα αυτά όμως δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 (στην ομάδα που υπέστη τεχνητά αφυδάτωση) ανάμεσα στα είδη ($F_{5,19}$=0,855, p=0,528). Να σημειωθεί επίσης ότι, όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρατηρείται καμία διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες ζώων (εκτεθειμένα-μη εκτεθειμένα άτομα) ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς, της α-ακτίνης (Πίνακας 4.15).

Πίνακας 4.15. Αποτελέσματα της δοκιμασίας t (t test) για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφορά ως προς τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 και της ακτίνης α (επίπεδο mRNA) ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα των ζώων που εκτέθηκαν σε συνθήκες αφυδάτωσης.

	Hsp70		Ακτίνη α	
Είδη	t-test	p value	t-test	p value
C. codringtonii	2,757	0,039	0,199	0,851
C. eucineta	2,631	0,038	0,691	0,509
C. gittenbergeri	1,752	0,140	0,401	0,708
C. helenae	4,227	0,055	0,381	0,722
C. intusplicata	2,601	0,048	0,002	0,998
C. parnassia	2,481	0,023	2,217	0,068

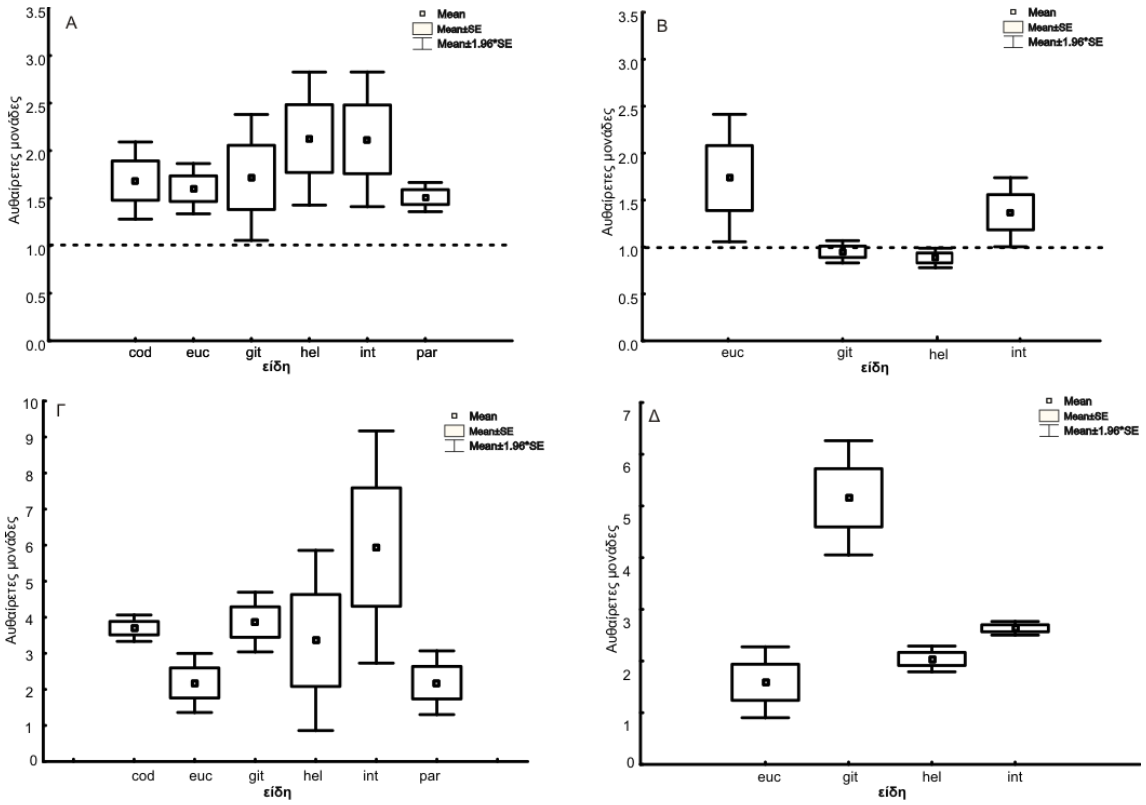
Με ανάλυση κατά Western (Εικόνα 4.18.Β), όταν πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων των Hsp70 (σε επίπεδο πρωτεΐνης) ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στα άτομα που υπέστησαν αφυδάτωση αύξηση φάνηκε μόνο σε δύο είδη, τα *C. intusplicata* και *C. eucineta*, με μέση αύξηση 37,03% και 73,43% αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όμως το Wilcoxon sum test υπέδειξε ότι οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 4.16). Σε δια-ειδικό επίπεδο και σε αυτή την περίπτωση, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές (Kruskal-Wallis: H (3, N=14)=5,16 p=0,1605) ως προς τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70. Φυσικά, δεν παρατηρείται καμία διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες ως προς τα επίπεδα έκφρασης της α-ακτίνης (Πίνακας 4.16).

Πίνακας 4.16. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Wilcoxon rank sum για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφορά ως προς τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 και της ακτίνης α (επίπεδο πρωτεΐνης) ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα των ζώων που εκτέθηκαν σε συνθήκες αφυδάτωσης.

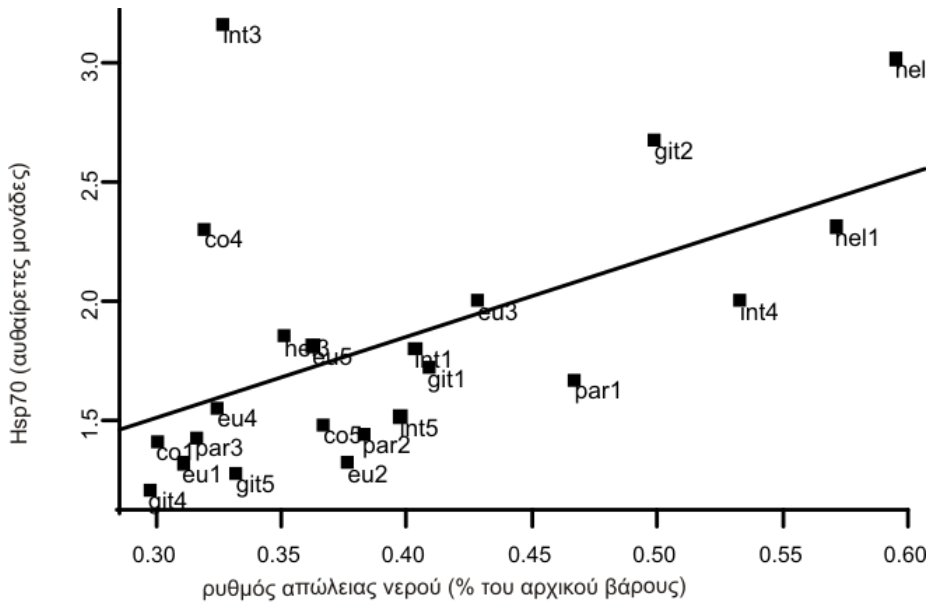
	Hsp70		Ακτίνη α	
Είδη	W	p value	W	p value
C. eucineta	12	0,25	4	0,99
C. gittenbergeri	2	0,8	4	0,8
C. helenae	2	0,8	2	0,8
C. intusplicata	5	0,4	3	0,99

Ως προς τα επίπεδα του mRNA για τις Hsp70 στην ομάδα ελέγχου (Εικόνα 4.18.Γ), δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικά διαφορές ανάμεσα στα είδη (Kruskal-Wallis: H (5, N=17)=8,9412 p=0,111), ενώ σε επίπεδο πρωτεΐνης (Εικόνα 4.18.Δ), παρατηρούνται οριακά μη σημαντικές διαφορές (Kruskal-Wallis: H (3, N=9)=6,9778

p=0,072) καθώς το *C. gittenbergeri* εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα Hsp70 σε σχέση με τα άλλα τρία είδη που μελετήθηκαν. Με την ανάλυση κατά Western παρατηρείται δηλαδή ένα γεωγραφικό πρότυπο ως προς τα επίπεδα Hsp70 στην ομάδα ελέγχου (το οποίο όμως δεν στηρίζεται σημαντικά από στατιστικής πλευράς λόγω του ότι χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρική δοκιμασία που λαμβάνει υπ' όψιν τη διάταξη των τιμών και όχι τις απόλυτες τιμές των μετρήσεων). Για τον λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθούν αναλύσεις συσχέτισης των ενδογενών επιπέδων Hsp70 με κλιματικά χαρακτηριστικά και χωρικές μεταβλητές των σταθμών δειγματοληψίας για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη κάποιου γεωγραφικού προτύπου.

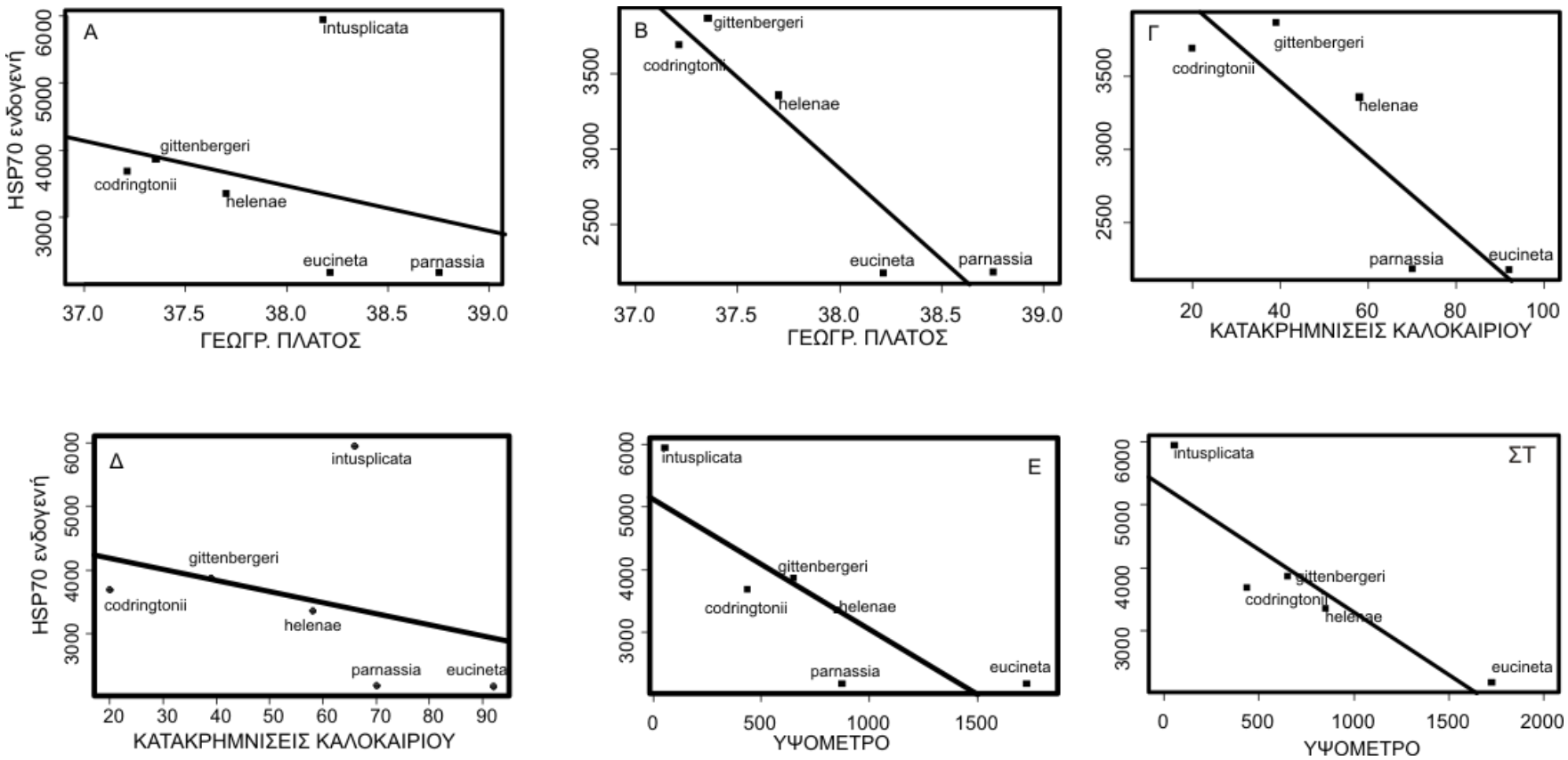


Εικόνα 4.18. Επίπεδα έκφρασης των Hsp70 (εκφρασμένα σε αυθαίρετες μονάδες σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των Hsp70 στην ομάδα ελέγχου) μετά από έκθεση των ζώων σε υψηλή θερμοκρασία με RT-PCR (A) και με ανάλυση κατά Western (B). Η στικτή γραμμή δηλώνει το μέσο όρο των επιπέδων έκφρασης Hsp70 στα άτομα που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου (controls). Ενδογενή επίπεδα έκφρασης των Hsp70 όπως μετρήθηκαν με RT-PCR (Γ) και με ανάλυση κατά Western (Δ). Φαίνεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων. Συντμήσεις: int: *C. intusplicata*, hel: *C. helenae*, git: *C. gittenbergeri*, par: *C. parnassia*, euc: *C. eucineta*, cod: *C. codringtonii*.



Εικόνα 4.19. Σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 (επαγόμενη έκφραση) και της εκατοστιαίας απώλειας νερού που υπέστησαν τα άτομα. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις κατ' άτομο για όλα τα είδη. Συντμήσεις: int: *C. intusplicata*, hel: *C. helenae*, git: *C. gittenbergeri*, par: *C. parnassia*, euc: *C. eucineta*, co: *C. codringtonii*.

Φαίνεται ότι υπάρχει γραμμική (θετική) σχέση ανάμεσα στον ρυθμό απώλειας νερού και στα επίπεδα έκφρασης Hsp70 (Εικόνα 4.19). Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι δεν υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στο νερό (σαν απόλυτη τιμή) που χάνει το είδος και τα επίπεδα των Hsp70 αλλά στο ποσοστό του νωπού βάρους που χάνεται (ανά είδος) και στα επίπεδα των Hsp70. Στην ανάλυση αυτή περιλήφθηκαν όλα τα είδη αντιπροσωπευόμενα από τις μετρήσεις κατά άτομο, η γραμμική σχέση των δυο μεταβλητών δεν είναι τόσο εμφανής (R^2=0.29, p=0.009) αν και είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό οφείλεται στο ότι ένα άτομο *C. intusplicata* εκφράζει πολύ υψηλά επίπεδα Hsp70 σε σχέση με το ποσοστό νερού που έχασε. Αν όμως αφαιρέσουμε το άτομο αυτό από την ανάλυση η γραμμικότητα της σχέσης γίνεται πιο εμφανής (R^2=0,5745 και p<0,0001). Τέλος, όταν επαναλήφθηκε η ανάλυση λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών, η γραμμική (θετική) σχέση ανάμεσα στο ποσοστό νερού που χάθηκε και την έκφραση των Hsp70, συνέχισε να υπάρχει, μάλιστα ενισχύθηκε και συνεχίζει να είναι στατιστικά σημαντική (Πίνακας 4.17).



Εικόνα 4.20. Σχέση των ενδογενών επιπέδων των Hsp70 (επίπεδο mRNA) με το γεωγρ. πλάτος συμπεριλαμβάνοντας όλα τα είδη *Codringtonia* (Α) και χωρίς το *C. intusplicata* (Β), με τη μέση τιμή των κατακρημνίσεων του καλοκαιριού συμπεριλαμβάνοντας όλα τα είδη (Δ) και χωρίς το *C. intusplicata* (Γ) και με το υψόμετρο συμπεριλαμβάνοντας όλα τα είδη *Codringtonia* (Ε) και συμπεριλαμβάνοντας μόνο τα είδη της Πελοποννήσου (ΣΤ). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων για το κάθε είδος. Συντμήσεις: int: *C. intusplicata*, hel: *C. helenae*, git: *C. gittenbergeri*, par: *C. parnassia*, euc: *C. eucineta*, cod: *C. codringtonii*.

Αν συσχετίσει κανείς τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 στην ομάδα ελέγχου με το υψόμετρο της περιοχής προέλευσής τους συμπεριλαμβάνοντας όλα τα είδη *Codringtonia* (εικόνα 4.20.Ε) φαίνεται να υπάρχει γραμμική (αρνητική) σχέση μεταξύ των δύο αυτών μεταβλητών (R^2=0,705 και p=0,036) η οποία γίνεται ακόμη πιο ισχυρή (Εικόνα 4.20.ΣΤ) αν επικεντρωθούμε στα είδη της Πελοποννήσου (R^2=0,825 και p=0,0328). Επίσης γραμμική σχέση φαίνεται να υπάρχει μεταξύ των ενδογενών επιπέδων έκφρασης των Hsp70 και του γεωγρ. πλάτους (Εικόνα 4.20.Α και 4.20.Β) καθώς και της μέσης τιμής των κατακρημνίσεων του καλοκαιριού (Εικόνα 4.20.Γ και 4.20.Δ) (R^2=0,8812, p=0.018 και R^2=0,771, p=0,0508 αντίστοιχα) αν και η δεύτερη σχέση είναι στατιστικά οριακά μη σημαντική. Επίσης, όταν η ανάλυση επαναλήφθηκε λαμβάνοντας υπ' όψιν τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών συνεχίζει να υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των ενδογενών επιπέδων Hsp70 και των κατακρημνίσεων του καλοκαιριού (Πίνακας 4.16), ενώ η σχέση των Hsp70 με το γεωγρ. πλάτος δεν είναι πλέον στατιστικά σημαντική. Αντίθετα εμφανίζεται απόλυτη αρνητική συσχέτιση των Hsp70 με το υψόμετρο (Πίνακας 4.16).

Πίνακας 4.17. Συντελεστής συσχέτισης του Spearman για τις μετρήσεις του ρυθμού απώλειας νερού και των επιπέδων έκφρασης Hsp70 και των χωρικών και κλιματικών μεταβλητών μετά από εφαρμογή της μεθόδου των ανεξάρτητων αντιθέσεων. Με έντονα γράμματα επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές σχέσεις, όπου p<0,05. Η θερμοκρασία και η τιμή των κατακρημνίσεων αφορούν τη μέση τιμή σε κάθε περίπτωση. Συντμήσεις: ΕΚΤ: ομάδα ζώων που υπέστη αφυδάτωση, ΕΛΕΓΧ: ομάδα ελέγχου, ΡΥΘ. ΑΠ: ρυθμός απώλειας νερού (ως ποσοστό %).

Μεταβλητή	Hsp70 ΕΚΤ	Hsp70 ΕΛΕΓΧ	ΡΥΘ. ΑΠ. (%)
Υψόμετρο	-0,68485	**-1**	-0,63636
Γεωγρ. πλάτος	-0,29697	-0,66061	-0,58788
Γεωγρ. μήκος	-0,15152	-0,24848	-0,12727
Ετήσια θερμοκρασία	-0,41818	-0,00606	-0,39394
Θερμοκρασία καλοκαιριού	-0,29697	0,018182	-0,34545
Θερμοκρασία χειμώνα	-0,41818	-0,00606	-0,39394
Ετήσια κατακρημνίσεις	0,248485	0,006061	0,272727
Κατακρημνίσεις καλοκαιριού	-0,29697	**-0,8303**	-0,34545
Κατακρημνίσεις χειμώνα	0,272727	0,054545	0,345455
Hsp70 μετά από έκθεση (ΕΚΤ)		0,684848	**0,878788**
Hsp70 ομάδας ελέγχου (ΕΛΕΓΧ)			0,636364

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μαλάκια αν και προέρχονται από το νερό, η τάξη πνευμονοφόρα έχει καταφέρει να εποικίσει πολλά και διαφορετικά περιβάλλοντα και μάλιστα κάποια από αυτά χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ικανότητα των χερσαίων γαστεροπόδων να καταλαμβάνουν τόσο μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι έχουν αναπτύξει μια μεγάλη ποικιλία μορφολογικών, συμπεριφορικών και φυσιολογικών προσαρμογών, ώστε να αντιμετωπίζουν προβλήματα όπως είναι η διατήρηση του νερού και η διατήρηση της ιονικής και θερμικής ισορροπίας *(Riddle, 1983)*. Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνονται αντίξοες, τα σαλιγκάρια εισέρχονται σε μια κατάσταση αερόβιας νάρκης, τη διάπαυση *(Cook, 2001)*. Τα βασικά στοιχεία για την επιβίωση κατά τη διάπαυση είναι η διατήρηση του υδατικού περιεχομένου και η επάρκεια σε μεταβολίτες με τη διάσπαση των οποίων μπορεί να παραχθεί ενέργεια *(Storey, 2002)*. Τα σαλιγκάρια κατά τη διάπαυση μειώνουν κατά πολύ τον μεταβολικό τους ρυθμό (metabolic depression) κάτι που είναι απαραίτητο προκειμένου να εξοικονομήσουν ενέργεια και να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους. Συνήθως ο μεταβολικός ρυθμός ατόμων που βρίσκονται σε διάπαυση αντιστοιχεί στο 10%-30% του μεταβολικού ρυθμού ενεργού ατόμου *(Pedler και συν., 1996)*. Φυσικά, όσο μεγαλύτερη είναι η μείωση του μεταβολικού ρυθμού τόσο μεγαλύτερο μπορεί να είναι το διάστημα εκείνο που τα άτομα μπορούν να παραμείνουν ανενεργά. Κατά τη διάπαυση, παρατηρούνται αλλαγές στο σύνολο σχεδόν της φυσιολογίας του οργανισμού *(Fields, 1992; Pakay και συν., 2002; Storey, 2002; Storey & Storey, 2010; Withers, Pedler & Guppy, 1997)*, έτσι και στα είδη που μελετήθηκαν, κάποια από τα οποία φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ τους σε διάφορες πτυχές των φυσιολογικών τους προσαρμογών.

Βιοχημικές αναλύσεις

Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ο πρώτος μεταβολίτης που καταναλώνεται για την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάπαυση και μόνο μετά την κατανάλωση αυτού αρχίζει ο καταβολισμός των πρωτεϊνών *(Rees & Hand, 1993)*, για τον λόγο αυτόν πολλά είδη χερσαίων σαλιγκαριών όπως το *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007), *Albinaria caerulea* (Giokas *και συν.*, 2005), *Helix aspersa* και *Helix figulina* (Kotsakiozi *και συν.*, 2012a) συσσωρεύουν γλυκογόνο πριν τη διάπαυση για να το καταναλώσουν στη συνέχεια. Στα είδη που μελετήθηκαν, ωστόσο, η συγκέντρωση του γλυκογόνου ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο μεταβολής. Το *C. intusplicata* εμφανίζει τα

υψηλότερα επίπεδα γλυκογόνου το χειμώνα στο ηπατοπάγκρεας και στο γεννητικό σύστημα ενώ στον πόδα η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται την άνοιξη, γεγονός που ίσως σχετίζεται με την αναπαραγωγική περίοδο. Με τον όρο αναπαραγωγική περίοδος νοείται το χρονικό διάστημα εκείνο που τα ζώα ζευγαρώνουν και ωαποθέτουν και αρχίζει περίπου 2 εβδομάδες μετά την αφύπνιση των ζώων, η οποία ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες του εκάστοτε έτους και της κάθε γεωγραφικής περιοχής μπορεί να πραγματοποιηθεί από το τέλος Φεβρουαρίου ως τα μέσα Μαρτίου. Πριν το ζευγάρωμα προηγείται περίοδος έντονης τροφικής δραστηριότητας προκειμένου να αποκτήσουν τα απαραίτητα ενεργειακά αποθέματα *(Hadjicharalambous, 1996)*. Η δειγματοληψία της άνοιξης πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο, αφού είχε ολοκληρωθεί το ζευγάρωμα, για τον λόγο αυτόν στο γεννητικό και στο ηπατοπάγκρεας παρατηρούμε πολύ μικρή ποσότητα γλυκογόνου καθώς έχει ήδη καταναλωθεί για να υποστηριχθεί η ενεργοβόρα διαδικασία της αναπαραγωγής, ενώ στον μυώδη ιστό του πόδα η συγκέντρωση του γλυκογόνου διατηρείται σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Στα είδη *C. parnassia* και *C. eucineta* το γλυκογόνο δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από εποχή σε εποχή (σε κανέναν ιστό) σε αντίθεση με το αυστηρό εποχικό πρότυπο μεταβολής που καταγράφηκε στο *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007), αν και μπορούμε να παρατηρήσουμε ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα το καλοκαίρι σε σχέση με αυτά που καταγράφονται άνοιξη-χειμώνα και αρκετά υψηλότερα το φθινόπωρο (για το *C. parnassia*). Αυτό πιθανόν να οφείλεται και πάλι στην περίοδο που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία της άνοιξης (Απρίλιος), αφ' ενός λόγω της περιόδου αναπαραγωγής και αφ' ετέρου λόγω του ότι τα σαλιγκάρια συνήθως αυξάνουν τα επίπεδα του γλυκογόνου τον τελευταίο μήνα της άνοιξης πριν εισέλθουν στη διάπαυση, καθώς σε αρκετά είδη όπως το *H. aspersa*, το *H. figulina* αλλά και το *C. helenae* τα υψηλότερα επίπεδα γλυκογόνου καταγράφονται τον Μάιο *(Giokas και συν., 2007; Giokas και συν., 2005; Kotsakiozi και συν., 2012a)*. Όντως με δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν για τα είδη *C. eucineta* και *C. intusplicata* τον Μάιο (Εικόνες 4.8.Γ και 4.6.Γ) βρέθηκε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση γλυκογόνου σε σχέση με τους μήνες Απρίλιο και Ιούλιο, πράγμα που υποδεικνύει ότι τα ζώα καταναλώνουν το γλυκογόνο κατά την αναπαραγωγική περίοδο, τον Απρίλιο, και αμέσως μετά αρχίζουν να αποθηκεύουν εκ νέου γλυκογόνο για να έχουν αποθέματα για τη διαθέριση. Τέλος, η συγκέντρωση του γλυκογόνου το καλοκαίρι είναι περίπου στα ίδια επίπεδα με αυτή του χειμώνα (περίοδος διαχείμασης) παρά το ότι η θερινή διάπαυση είναι ιδιαίτερα στρεσογόνα κατάσταση για τα ζώα κατά τη διάρκεια της οποίας καταφεύγουν σε οποιαδήποτε διαθέσιμη πηγή ενέργειας

(Kotsakiozi *και συν.*, 2012a). Το ότι η συγκέντρωση του γλυκογόνου δεν πέφτει σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα κατά τη διάπαυση εξηγείται από τη μείωση του μεταβολικού ρυθμού κατά την περίοδο αυτή. Έχει βρεθεί (σε άλλο είδος χερσαίου σαλιγκαριού, το *Helix aspersa*) ότι μετά από 90 ημέρες διάπαυσης, η συγκέντρωση του γλυκογόνου και της γλυκόζης σταθεροποιούνται γεγονός που δείχνει και την έναρξη του υπομεταβολισμού (Borges *και συν.*, 2004).

Πρωτεΐνες

Το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και στα 3 είδη που εξετάστηκαν είναι ίδιο (για τον πόδα και το ηπατοπάγκρεας) με αυτό που καταγράφηκε για το *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007) καθώς και στα 4 είδη παρατηρείται σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών από το φθινόπωρο ως την άνοιξη (περίοδος δραστηριότητας και προετοιμασίας για τη διάπαυση) κατά την οποία φτάνουν στο μέγιστο της συγκέντρωσης τους και στη συνέχεια καταναλώνονται το καλοκαίρι (διάπαυση). Όσον αφορά τη μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο γεννητικό σύστημα, τα είδη *C. eucineta* και *C. intusplicata* αποκλίνουν από το πρότυπο των *C. helenae*-*C. parnassia* μειώνοντας τα επίπεδα των πρωτεϊνών τον χειμώνα (διαχείμαση), για να ακολουθήσει αύξηση την άνοιξη και στη συνέχεια εκ νέου μείωση το καλοκαίρι. Τα χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών κατά τις περιόδους που τα ζώα δεν είναι ενεργά (καλοκαίρι: σε όλα τα είδη, χειμώνας: για τα *C. eucineta* και *C. intusplicata*) εξηγούνται εν μέρει από τη μειωμένη σύνθεση των πρωτεϊνών κατά τις περιόδους που τα ζώα βρίσκονται σε κατάσταση υπομεταβολισμού (διάπαυση/ διαχείμαση). Ο Pakay και οι συνεργάτες του (2002) αναφέρουν μείωση στον ρυθμό σύνθεσης πρωτεϊνών κατά 23% και 53% στο ηπατοπάγκρεας και στον πόδα αντίστοιχα σε άτομα του είδους *H. aspersa* που βρίσκονταν σε διάπαυση. Παρόμοιο πρότυπο καταστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης κατά περίπου 80% βρέθηκε και σε ένα άλλο είδος χερσαίου σαλιγκαριού το *Otala lactea*, μετά από δύο μόλις ημέρες σε διάπαυση (Ramnanan *και συν.*, 2009). Όπως ήδη αναφέρθηκε, δεδομένου ότι μειώνεται η ρυθμός σύνθεσης των πρωτεϊνών είναι λογικό να μειώνεται αντίστοιχα και ο ρυθμός αποικοδόμησης τους, όντως αυτό έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετά είδη οργανισμών που βρίσκονταν σε διάπαυση (Storey & Storey, 2004). Κάποιες φορές όμως παρατηρείται αυξημένη διάσπαση πρωτεϊνών κατά τη διάπαυση. Τα άνουρα αμφίβια για παράδειγμα, μπαίνουν στη διάπαυση με μεγάλα αποθέματα νερού αλλά μετά από μερικές εβδομάδες ή μήνες βρίσκονται σε κατάσταση υδατικού στρες, τότε αρχίζει η οξείδωση των πρωτεϊνών (χρησιμεύουν

συμπληρωματικά στα λιπίδια σαν μεταβολικό καύσιμο) και το άζωτο που απελευθερώνεται χρησιμεύει για τη σύνθεση ουρίας, έτσι ώστε με την αύξηση της ουρίας να περιοριστούν οι απώλειες νερού από το σώμα (Storey & Storey, 2010). Μάλιστα, έχει υπολογιστεί ότι σε κάποια είδη άνουρων αμφιβίων το 80% του συνόλου των πρωτεϊνών του σώματος καταβολίζεται για τον σκοπό αυτόν (Jones, 1980). Η διάσπαση των πρωτεϊνών για τη διατήρηση του υδατικού περιεχομένου των ιστών έχει υποτεθεί και για χερσαία σαλιγκάρια όπως στην περίπτωση του *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007). Είναι πιθανόν λοιπόν ότι και η μείωση που παρατηρήθηκε στα είδη *Codringtonia* το καλοκαίρι να σχετίζεται με τις αυξημένες απαιτήσεις για σύνθεση ουρίας (για τη διατήρηση του υδατικού περιεχομένου) και δευτερευόντως με την παραγωγή ενέργειας. Παρ΄όλα αυτά, η διάσπαση των πρωτεϊνών μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να συνεισφέρει στην παραγωγή ενέργειας. Τα αμινοξέα που προέρχονται από τη διάσπαση των πρωτεϊνών τροφοδοτούν τον κύκλο του Krebs σε διάφορα σημεία αλλά η παραγωγή ενέργειας (ATP) σε αυτή την περίπτωση είναι σχετικά χαμηλή ανά mol υποστρώματος (Willmer *και συν.*, 2000). Συνοψίζοντας, η μείωση των πρωτεϊνών, φαίνεται να ξεκινάει από τον Μάιο (Εικόνες 4.6.Β και 4.8.Β), αν και η συγκέντρωση τους δεν διαφέρει στατιστικά από Απρίλιο σε Μάιο (εξαίρεση ο πόδας), ούτε από Μάιο σε Ιούλιο, αλλά από Απρίλιο σε Ιούλιο. Αυτό σημαίνει ότι μετά την αναπαραγωγική περίοδο, τα ζώα δεν προλαβαίνουν να αναπληρώνουν την ποσότητα πρωτεϊνών που κατανάλωσαν για την ωαπόθεση αλλά συνεχίζει μια βαθμιαία και σχετικά μικρή μείωση ως και τη θερινή διάπαυση. Το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, ερμηνεύεται (ανεξάρτητα από ιστό και την εποχή που έγινε η μέτρηση) από τις γεωγραφικές μεταβλητές των σταθμών δειγματοληψίας (στην ανάλυση αυτή συμπεριλαμβάνονται και τα 4 είδη) και μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις χρειάζονται και οι τρεις μεταβλητές (υψόμετρο, γεωγρ. πλάτος και μήκος) για να ερμηνευτούν οι διαφορές (Πίνακας 4.10) που παρατηρούνται. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής (οι γεωγραφικές μεταβλητές που αναφέρθηκαν ουσιαστικά είναι μια άλλη έκφραση των κλιματικών συνθηκών) και μάλιστα φαίνεται να επηρεάζονται όχι από έναν αλλά από αρκετούς κλιματικούς παράγοντες (Πίνακες 4.11-4.13).

Λιπίδια

Το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των λιπιδίων για τον πόδα είναι πανομοιότυπο για όλα τα είδη και όμοιο με αυτό της μεταβολής των πρωτεϊνών. Στο ηπατοπάγκρεας, το κοινό στοιχείο για όλα τα είδη, είναι η μείωση των λιπιδίων κατά τη θερινή διάπαυση ενώ στο γεννητικό τα τρία είδη που μελετήθηκαν μειώνουν τα επίπεδα των λιπιδίων την άνοιξη (σε αντίθεση με το *C. helenae*) και διατηρούν τα ίδια περίπου επίπεδα και το καλοκαίρι. Τα χερσαία σαλιγκάρια συνήθως χρησιμοποιούν τα λίπη για να στηρίξουν την αναπαραγωγή (Borges *και συν.*, 2004). Τα είδη που μελετήθηκαν αναπαράγονται την άνοιξη και συγκεκριμένα η αναπαραγωγική περίοδος ξεκινάει στις αρχές Μαρτίου και ολοκληρώνεται πριν το τέλος Απριλίου (Hadjicharalambous, 1996), για τον λόγο αυτόν, παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση λιπιδίων στο γεννητικό σύστημα την περίοδο αυτή. Μάλιστα, για το είδος *C. intusplicata* είναι ιδιαιτέρως εμφανές (το ίδιο πρότυπο παρατηρείται και στο *C. eucineta* αλλά οι διακυμάνσεις είναι μικρότερες και επομένως όχι τόσο εμφανείς) ότι τα λιπίδια ως πηγή ενέργειας εξυπηρετούν διπλό ρόλο. Αφενός χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της αναπαραγωγικής διαδικασίας (Borges *και συν.*, 2004), έτσι παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση τους την άνοιξη (Απρίλιος) σε ηπατοπάγκρεας και γεννητικό (Εικόνα 4.5.Γ), ενώ στον πόδα όχι, στη συνέχεια τον Μάιο η συγκέντρωση των λιπιδίων σε ηπατοπάγκρεας και γεννητικό αυξάνεται (Εικόνα 4.6.Γ) για να είναι προετοιμασμένα για τη διάπαυση που έρχεται. Έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη χερσαίων σαλιγκαριών ότι κατά τη διάπαυση, μετά την κατανάλωση του γλυκογόνου, τα ζώα καταφεύγουν στη διάσπαση των λιπιδίων προκειμένου να αποκτήσουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση τους (Kotsakiozi *και συν.*, 2012a). Η συνεισφορά των λιπιδίων για την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάπαυση επιβεβαιώνεται επίσης από το ότι έχει υπολογιστεί ότι μετά από 2 μήνες διάπαυσης το 25% της παραγωγής ATP αποκτάται από τον καταβολισμό των λιπών και μάλιστα η συνεισφορά των λιπών αυξάνεται όσο επεκτείνεται η διάρκεια της διάπαυσης (Stuart, Ooi & Ballantyne, 1998). Τέλος, όπως αναλύθηκε και στην περίπτωση των πρωτεϊνών, το πρότυπο μεταβολής των λιπιδίων στα 4 είδη που μελετήθηκαν, ερμηνεύεται από τις γεωγραφικές μεταβλητές των σταθμών δειγματοληψίας (Πίνακας 4.10) και πιο συγκεκριμένα επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής (Πίνακες 4.11-4.13).

Δραστικότητα LDH

Όλα τα είδη που μελετήθηκαν αυξάνουν τη δραστικότητα της LDH κατά τη θερινή διάπαυση (η αύξηση αυτή είναι πολύ πιο έντονη στον πόδα (είναι κυρίως μυς) αλλά σε γενικές γραμμές η ίδια τάση παρατηρείται και στους τρεις ιστούς που μελετήθηκαν) που αποτελεί ένδειξη ότι τα ζώα (και στα τρία είδη που μελετήθηκαν), βασίζουν τουλάχιστον κατά ένα μέρος, την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάπαυση σε αναερόβιες διαδικασίες. Αύξηση της δραστικότητας της LDH γενικά παρατηρείται, όταν τα ζώα βρεθούν σε ανοξικές συνθήκες (Michaelidis, Pallidou & Vakouftsi, 1999a) ή άλλες περιβαλλοντικές στρεσογόνες καταστάσεις όπως κατά τη διάρκεια της διαχείμασης (Wieser & Wright, 1978) ή όταν εκτεθούν σε αυξημένα επίπεδα CO_2 (Michaelidis *και συν.*, 2007). Ο μεταβολισμός στα χερσαία σαλιγκάρια κατά τη διάπαυση θεωρείται αερόβιος με μικρή συμμετοχή αναερόβιων μονοπατιών (Brooks & Storey, 1997a; Brooks & Storey, 1997b; Michaelidis, 2002; Rees & Hand, 1990) και συνήθως δεν δείχνουν αυξημένα επίπεδα δραστικότητας LDH καθώς οξειδώνουν πλήρως τους υδατάνθρακες (Brooks & Storey, 1997a; Brooks & Storey, 1997b; Churchill & Storey, 1989). Ωστόσο, υπάρχουν πολλά δεδομένα που υποστηρίζουν τη σημασία των αναερόβιων μονοπατιών στην παραγωγή ενέργειας κατά τη διάπαυση (Michaelidis, Rofalikou & Grieshaber, 1999b; Wieser, 1978; Wieser & Wright, 1978; Wieser & Wright, 1979). Οι διαφορές που παρατηρούνται στη δραστικότητα του ενζύμου στα 4 είδη *Codringtonia* (καθ᾽όλη τη διάρκεια του έτους) ερμηνεύονται από τις ακριβείς συντεταγμένες της περιοχής δειγματοληψίας δηλαδή το γεωγρ. μήκος και πλάτος καθώς και το υψόμετρο (Πίνακας 4.10). Δεδομένου ότι σε αρκετά είδη χερσαίων σαλιγκαριών έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου κατά τη διάρκεια της θερινής διάπαυσης (Giokas *και συν.*, 2007; Giokas *και συν.*, 2005; Kotsakiozi *και συν.*, 2012a; Michaelidis *και συν.*, 1999a), όπως ακριβώς συμβαίνει και για τα τρία είδη *Codringtonia* που μελετήθηκαν, αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα δραστικότητας της LDH συνδέονται με την κατάσταση των ζώων (διάπαυση, διαχείμαση, δραστηριότητα). Η κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα ζώα, όμως, εξαρτάται άμεσα από τις κλιματικές συνθήκες καθώς τα ζώα εισέρχονται στη διάπαυση όταν οι κλιματικές συνθήκες γίνονται αντίξοες (π.χ. χαμηλή διαθεσιμότητα νερού). Παράγοντες όπως το υψόμετρο, το γεωγρ. πλάτος και μήκος επηρεάζουν άμεσα τις κλιματικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής και μάλιστα αθροιστικά, άρα επηρεάζουν και την κατάσταση των ζώων και επομένως και τα επίπεδα δραστικότητας της LDH. Μάλιστα η επίδραση των κλιματικών συνθηκών στις μεταβολές της δραστικότητας της LDH, φαίνεται και από το ότι για να ερμηνευτεί το πρότυπο μεταβολής που καταγράφεται (ανεξάρτητα από το είδος και τον ιστό και την

εποχή), χρειάζεται να συμπεριλάβουμε στο μοντέλο μας τουλάχιστον τρεις (συνήθως τέσσερις) κλιματικούς παράγοντες, όπως τη θερμοκρασία (ετήσια και εποχική) και τις κατακρημνίσεις (ετήσιες και εποχικές) (Πίνακες 4.11-4.13). Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι το πρότυπο μεταβολής της δραστικότητας της LDH που καταγράφηκε, με κοινό στοιχείο σε όλα τα είδη την αύξηση της δραστικότητας κατά τη θερινή διάπαυση, είναι πραγματική αύξηση και δεν οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα νερού των ιστών (Εικόνα 4.4), ωστόσο αυτό που αποκαλύφθηκε όταν λήφθηκε υπ΄ όψιν το υδατικό περιεχόμενο των ιστών είναι αφενός ότι οι διακυμάνσεις στη δραστικότητα του ενζύμου μεταξύ των εποχών είναι ελαφρώς μικρότερες από ότι φαινόταν αρχικά και αφετέρου ότι τα ζώα συνεχίζουν να διατηρούν υψηλά επίπεδα δραστικότητας της LDH ακόμη και το φθινόπωρο. Αυτό οφείλεται, όπως έγινε φανερό και παραπάνω, στις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν το φθινόπωρο στις περιοχές δειγματοληψίας (τουλάχιστον για ένα μήνα κατά το φθινόπωρο οι κλιματικές συνθήκες είναι παρόμοιες με αυτές του καλοκαιριού και τα ζώα παραμένουν σε διάπαυση). Τέλος, όταν επαναλήφθηκαν οι αναλύσεις αυτές (συσχέτιση κλιματικών και χωρικών μεταβλητών με τη δραστικότητας της LDH) λαμβάνοντας υπ' όψιν και τη φυλογένεση (Πίνακας 4.14), παρατηρήθηκαν και πάλι συσχετίσεις ανάμεσα στη δραστικότητα της LDH και τις κλιματικές και χωρικές μεταβλητές αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (λόγω του μικρού αριθμού ειδών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση).

Υψομετρική διαφοροποίηση

Πολλές φορές εξετάζονται τα υψομετρικά πρότυπα αντί των γεωγραφικών καθώς οι διαφορές στις κλιματικές συνθήκες μεταξύ κάποιων μέτρων σε υψόμετρο μπορεί να είναι ίδιας τάξης με τις διαφορές στις κλιματικές συνθήκες ανάμεσα σε περιοχές που απέχουν αρκετά χιλιόμετρα μεταξύ τους (Hausdorf, 2003). Οι διαφορές που καταγράφηκαν στη συγκέντρωση των λιπιδίων, πρωτεϊνών, γλυκογόνου αλλά και στη δραστικότητα του ενζύμου LDH, οφείλονται στις διαφορές των κλιματικών συνθηκών στις δύο περιοχές διαφορετικού υψομέτρου (1053m και 1633m). Τον μήνα Μάιο που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία τα ζώα γενικά, είναι δραστήρια, έχουν αναπαραχθεί και ετοιμάζονται για τη θερινή διάπαυση, συσσωρεύοντας λιπίδια, πρωτεϊνες και γλυκογόνο. Είναι λογικό όμως η ενεργοποίηση των ζώων που βρίσκονται σε χαμηλότερο υψόμετρο να έγινε νωρίτερα από ότι στα ζώα που βρίσκονται στην κορυφή του όρους και αναλογικά να πραγματοποιήθηκε νωρίτερα και η αναπαραγωγική διαδικασία αλλά και να επέλθει νωρίτερα η έναρξη της θερινής

διάπαυσης λόγω των κλιματικών συνθηκών. Όλες αυτές οι διαδικασίες επηρεάζουν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τις συγκεντρώσεις των λιπιδίων, πρωτεϊνών και γλυκογόνου καθώς και τα επίπεδα της δραστικότητας της LDH, για αυτό και καταγράφονται διαφορές στους παραπάνω παράγοντες ανάμεσα στους πληθυσμούς των δυο υψομέτρων. Τα ζώα των 1053m, έχουν αυξημένη συγκέντρωση λιπιδίων και πρωτεϊνών αλλά και αυξημένη δραστικότητα της LDH ενώ τα ζώα των 1633m, έχοντας ενεργοποιηθεί αργότερα και έχοντας αναπαραχθεί και αργότερα, δεν έχουν προλάβει ακόμη να αναπληρώσουν τις ποσότητες των λιπιδίων και των πρωτεϊνών που κατανάλωσαν κατά την αναπαραγωγική περίοδο που προηγήθηκε, ούτε οι κλιματικές συνθήκες είναι τόσο αντίξοες ώστε να αυξήσουν τη δραστικότητα της LDH. Ως προς το υδατικό περιεχόμενο και τη συγκέντρωση του γλυκογόνου δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς. Η ποσότητα του γλυκογόνου είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη δραστηριότητα του ζώου και επειδή τα άτομα είναι δραστήρια και τρέφονται κανονικά και στους δύο πληθυσμούς η ποσότητα του γλυκογόνου είναι περίπου στα ίδια επίπεδα. Όσο για το νερό, επίσης διατηρείται σε σχεδόν σταθερά επίπεδα και στους δύο πληθυσμούς (ελάχιστα αυξημένο στα 1533m), κάτι που είναι αναμενόμενο καθώς και από προηγούμενη μελέτη που αφορά το είδος αυτό φάνηκε ότι το υδατικό περιεχόμενο διατηρείται σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, με εξαίρεση τη θερινή διάπαυση που είναι η μοναδική περίοδος που φαίνεται να χάνει νερό.

Εποχική μεταβολή υδατικού περιεχομένου και ρυθμός απώλειας νερού

Στα μεσογειακά είδη είναι σύνηθες να παρατηρείται απώλεια νερού κατά το καλοκαίρι όπως συμβαίνει στο *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007), η ίδια συμπεριφορά αναφέρεται επίσης για το *Cantareus apertus* (Reuner *και συν.*, 2008), το *Cristataria genezarethana*, το *Rupestrella rhodia* (Arad, Goldenberg & Heller, 1995) και το *Helix figulina* (Kotsakiozi *και συν.*, 2012a). Αντίθετα, σε αρκετά άλλα είδη έχει παρατηρηθεί διατήρηση του υδατικού περιεχομένου των ιστών όπως στην περίπτωση του *Helix aspersa* στη Δ. Αυστραλία στο οποίο μετά από 1-3 μήνες διάπαυσης δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αύξηση στην οσμομοριακότητα της αιμολέμφου (Pedler *και συν.*, 1996). Ακόμη, το ίδιο είδος φαίνεται να διατηρεί σταθερό το υδατικό περιεχόμενο τόσο σε πληθυσμούς της Γαλλίας (Klein-Rollais & Daguzan, 1990) όσο και της Ελλάδας (Kotsakiozi *και συν.*, 2012a). Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη *Helix* (Nowakowska, Caputa & Rogalska, 2006). Επίσης το είδος *Albinaria caerulea* (Giokas et al., 2005), ενώ φαίνεται να μειώνεται το

υδατικό του περιεχόμενο, οι μεταβολές που παρατηρούνται είναι στατιστικά μη σημαντικές. Τα σαλιγκάρια διαθέτουν προσαρμογές που εμποδίζουν την απώλεια νερού κατά τις περιόδους που δεν είναι ενεργά. Το νερό χάνεται κατά την αναπνοή αλλά και κατά μήκος του επιθηλιακού στρώματος, για αυτόν τον λόγο, συχνά παρατηρείται να εισέρχονται στη διάπαυση με μεγάλα αποθέματα νερού ώστε να διατηρήσουν ενυδατωμένους τους ιστούς τους κατά την περίοδο αυτή *(Storey, 2002)*. Στη μελέτη αυτή, οι διαφορές στα επίπεδα του νερού που καταγράφηκαν ανάμεσα στις εποχές του έτους δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (για τα 3 είδη που μελετήθηκαν) και επομένως θεωρείται ότι διατηρούν σταθερό το υδατικό περιεχόμενο των ιστών καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Παρ' όλα αυτά, για το *C. eucineta* (πόδα, ηπατοπάγκρεας, γεννητικό) και το *C. parnassia* (ηπατοπάγκρεας, γεννητικό) είναι εμφανής η τάση που περιγράφηκε παραπάνω, ότι δηλαδή τα επίπεδα του νερού κατά την άνοιξη (προετοιμασία για διάπαυση) είναι ελαφρώς υψηλότερα από αυτά του καλοκαιριού. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για να εξηγήσουν τη μείωση της απώλειας του νερού κατά τη διάπαυση και περιλαμβάνουν απνοϊκό πρότυπο αναπνοής που μειώνει την απώλεια του νερού λόγω εξάτμισης (Barnhart, 1983; Barnhart & Mcmahon, 1987), και αύξηση της οσμωμοριακότητας των υγρών του σώματος εξαιτίας της αύξησης της συγκέντρωσης ουσιών όπως είναι η ουρία κατά τη διάρκεια μακράς διάπαυσης (Arad, 2001; Rees & Hand, 1993). Ακόμη, πιστεύεται ότι κατά τη μακρά διάπαυση η εξοικονόμηση του νερού επιτυγχάνεται και με μηχανισμούς που σχετίζονται με τη μείωση του μεταβολισμού (Arad, 2001; Arad & Avivi, 1998). Οι Arad and Avivi (1998) προτείνουν ότι εξοικονομείται νερό μέσα από την οξείδωση υποστρωμάτων που συνεισφέρουν σε επιπλέον μεταβολικό νερό. Μάλιστα, έχει υπολογιστεί ότι το μεταβολικό νερό συνεισφέρει περίπου κατά 8% στη συνολική οικονομία νερού κατά τη διάπαυση στο *Sphincterochila prophetarum* και έτσι οι απώλειες νερού κατά την περίοδο αυτή, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, αντισταθμίζονται (Steinberger, Grossman & Dubinsky, 1982). Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα σαλιγκάρια των βράχων (όπως είναι τα είδη που μελετήθηκαν) είναι ανθεκτικότερα στην αφυδάτωση σε σχέση με τα εδαφόβια σαλιγκάρια και σε αυτό βοηθάει η διαβίωση στα βράχια. Τα σαλιγκάρια βρίσκοντας καταφύγιο σε σχισμές βράχων ή/και με την προσκόλληση τους στην επιφάνεια του βράχου (όπως ακριβώς κάνουν και τα είδη που μελετήθηκαν) εκμεταλλεύονται καλύτερα το διαθέσιμο νερό και αποφεύγουν την αφυδάτωση (Arad *και συν.*, 1995). Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορές των κλιματικών συνθηκών στις περιοχές δειγματοληψίας φαίνεται κατά κύριο λόγο, να μην επηρεάζουν το υδατικό περιεχόμενο των ιστών (Πίνακες 4.10-

4.13) παρά μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς και αποχές του έτους (Πίνακες 4.11-4.13). Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη αν σκεφτεί κανείς ότι στα 3 από τα 4 είδη δεν παρατηρούνται διαφορές στο υδατικό περιεχόμενο των ιστών μεταξύ των εποχών και ότι για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα του χρόνου δεν παρατηρούνται ούτε διαφορές μεταξύ των ειδών, εξαίρεση αποτελεί το καλοκαίρι (βλ. Εικόνα 4.15) όπου το *C. helenae* εμφανίζει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα νερού σε σχέση με τα άλλα είδη. Μάλιστα δεδομένου του ότι το συγκεκριμένο είδος διαφοροποιείται σε σχέση με τα υπόλοιπα και στα επίπεδα της δραστικότητας της LDH, μας έκανε να συσχετίσουμε τους δύο αυτούς παράγοντες (Εικόνα 4.16) και βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική γραμμική σχέση μεταξύ τους, γεγονός που δείχνει ότι τις περιόδους που παρατηρείται υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου παρατηρούνται επίσης και χαμηλότερα επίπεδα νερού, αν και η τάση αυτή οφείλεται κυρίως στις μεταβολές που καταγράφονται στο *C. helenae* .

Άρα, από τα μέχρι τώρα δεδομένα προκύπτει ότι η απώλεια νερού κατά τη θερινή διάπαυση που παρατηρήθηκε στο *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007) δεν αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των ειδών *Codringtonia* καθώς άλλα τρία είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή δεν εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα νερού κατά τη διάπαυση σε σχέση με τις περιόδους δραστηριότητας τους. Για να εξηγηθεί αυτή η απώλεια νερού το καλοκαίρι, είχε υποτεθεί ότι ίσως η οικολογία της συμπεριφοράς του είδους αυτού να είναι υπολειμματική και να διαμορφώθηκε σε πιο υγρές και ψυχρές κλιματικές συνθήκες (Giokas *και συν.*, 2007). Αργότερα όμως όταν επιλύθηκε η φυλογένεση (Kotsakiozi *και συν.*, 2012b), αποκαλύφθηκε ότι τα είδη που μελετήθηκαν στη διατριβή αυτή και βρέθηκε να διατηρούν σχεδόν σταθερό το υδατικό τους περιεχόμενο, είναι προγενέστερα του *C. helenae* και επομένως είναι λίγο δύσκολο να εξηγηθεί πως ένα είδος που διαφοροποιήθηκε περίπου πριν από 1,52 εκατ. χρόνια, δηλαδή αφού επικράτησε το μεσογειακό κλίμα στην περιοχή, δεν είναι καλά προσαρμοσμένο στις κλιματικές συνθήκες του μεσογειακού καλοκαιριού ενώ πιο παλιά διαφοροποιημένα είδη είναι. Βέβαια, η υπόθεση δεν μπορεί να απορριφθεί καθώς το γεγονός ότι είναι το πιο πρόσφατα διαφοροποιημένο είδος δεν αποκλείει από μόνο του το να είναι και κακώς προσαρμοσμένο στις κλιματικές συνθήκες της νότιας Ελλάδας.

Σε μια προσπάθεια να επαναξιολογηθούν τα αποτελέσματα αυτά στο σύνολο τους, αλλά και να διαπιστωθεί αν για κάποιο λόγο, το *C. helenae* εμφανίζει υψηλότερο ρυθμό απώλειας νερού σε σχέση με τα άλλα είδη, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ρυθμού απώλειας υπό εργαστηριακές συνθήκες, με έκθεση των ατόμων

σε υψηλή θερμοκρασία. Από τη μέτρηση αυτή φαίνεται ότι τα είδη *C. codringtonii* και *C. gittenbergeri* υφίστανται τις μεγαλύτερες απώλειες νερού (σε απόλυτη τιμή) σε αντίθεση με τα είδη *C. intusplicata* και *C. eucineta* που δείχνουν τους μικρότερους ρυθμούς απώλειας νερού. Βέβαια πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορές στην απώλεια νερού οφείλονται στο διαφορετικό μέγεθος των ειδών (βλ. κεφάλαιο 3). Στην προσπάθεια να εξαλειφθεί ο παράγοντας «διαφορά μεγέθους των ειδών» που σαφώς επηρεάζει τις μετρήσεις, η απώλεια του νερού εκφράστηκε ως εκατοστιαία απώλεια του νωπού βάρους των οργανισμών ανά λεπτό (το βάρος υπολογίστηκε μετά από αφαίρεση του κελύφους). Αν εστιάσει κανείς στον ρυθμό απώλειας νερού (ποσοστό του αρχικού νωπού βάρους), φαίνεται ότι το μόνο είδος που διαφέρει ως προς τον ρυθμό απώλειας νερού συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη, υφιστάμενο τις μεγαλύτερες απώλειες, είναι το *C. helenae*.

Θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει ότι η απώλεια νερού στο *C. helenae* το καλοκαίρι οφείλεται στην οικολογία της συμπεριφορά του είδους αυτού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα χερσαία σαλιγκάρια υπόκεινται σε ημερήσιες και εποχικές μεταβολές των κλιματικών συνθηκών και προκειμένου να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της διατήρησης του νερού και της ιονικής ισορροπίας έχουν αναπτύξει διάφορες φυσιολογικές, μορφολογικές και συμπεριφορικές προσαρμογές (π.χ. βρίσκουν καταφύγια όπου η θερμοκρασία είναι ευνοϊκότερη). Επομένως ένα είδος με περιορισμένο εύρος τέτοιων αποκρίσεων (π.χ. επιλογή κατάλληλου καταφυγίου, πάχος επιφράγματος κ.ά.), έχει μικρότερες πιθανότητες επιβίωσης σε αντίξοες συνθήκες. Παρ 'όλα αυτά λόγω έλλειψης δημογραφικών στοιχείων (π.χ. ρυθμοί επιβίωσης και θανάτων) καθώς και αναλυτικών δεδομένων που αφορούν τη συμπεριφορά του, δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για το αν είναι κακώς προσαρμοσμένο ή έχει περιορισμένο εύρος αποκρίσεων. Επιπλέον, ακόμη και αν υποθέσουμε ότι το περιορισμένο εύρος συμπεριφορικών ή/και φυσιολογικών αποκρίσεων, μπορεί να εξηγήσει την εποχική μεταβολή στο υδατικό περιεχόμενο, δεν μπορεί να ερμηνεύσει τον υψηλότερο ρυθμό απώλειας νερού του *C. helenae* σε σχέση με άλλα είδη του γένους, υπό συνθήκες τεχνητής αφυδάτωσης, εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούσαν την εποχική μεταβολή του νερού (Giokas *και συν.*, 2007) και αναλύθηκαν παραπάνω. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί, ότι η αφυδάτωση που υπέστησαν τα άτομα εκτεθειμένα σε υψηλή θερμοκρασία ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτή που υφίστανται στο πεδίο. Οι συνθήκες του πειράματος ήταν ακραίες σε σχέση με τις συνθήκες που επικρατούν στο πεδίο καθώς αφ' ενός η θερμοκρασία έκθεσης ήταν

πολύ υψηλή (αν και εντός των θερμοκρασιακών ορίων που αποκτούν οι βράχοι στη νότια Ελλάδα τη θερινή περίοδο). Επομένως είναι πιθανό ότι κληρονομικά γνωρίσματα που αφορούν τη φυσιολογία του είδους (π.χ. η βιοχημική σύσταση) που ευθύνονται για το ότι το είδος αυτό δεν μπορεί να ελαχιστοποιήσει τις απώλειες νερού υπό αντίξοες συνθήκες. Ωστόσο, λόγω έλλειψης δεδομένων δεν η υπόθεση αυτή δεν μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι παρόμοιες μελέτες σε χερσαία σαλιγκάρια έχουν καταλήξει σε διάφορες πιθανές εκδοχές για τις διαφορές που παρατηρούνται ως προς την αντίσταση στην αφυδάτωση και τη διατήρηση του υδατικού περιεχομένου μεταξύ των ειδών (π.χ. η διαφορετική προέλευση (Arad, 1993), η διαφορετική ηλικιακή κλάση ή τα διαφορετικά ενδιαιτήματα (Arad & Avivi, 1998), το μέγεθος (Machin, 1967; Riddle, 1983), το σχήμα του κελύφους (Heller, 1987)), ωστόσο καμία από αυτές τις υποθέσεις δεν μπορεί να εφαρμοστεί στην περίπτωση των ειδών *Codringtonia* .

Επίπεδα έκφρασης HSP70

Η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (σε επίπεδο mRNA) αυξάνεται σε τέσσερα από έξι είδη όταν αυτά εκτίθενται σε συνθήκες αφυδάτωσης (Πίνακας 4.15). Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς, είναι γνωστό ότι η έκφραση των Hsp70 επάγεται κάτω από διάφορες συνθήκες στρες όπως είναι και η έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία και η αφυδάτωση (αν και στη μελέτη αυτή το δεύτερο ήταν αποτέλεσμα του πρώτου) και αυτό εξυπηρετεί στη μείωση των επιπτώσεων της αφυδάτωσης σε κυτταρικό επίπεδο *(Benoit και συν., 2010)*. Αύξηση των επιπέδων έκφρασης Hsp70 ως απόκριση στην αφυδάτωση έχει αναφερθεί επίσης και σε άλλα είδη οργανισμών όπως τα κουνούπια *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* και *Culex pipiens* (Benoit *και συν.*, 2010) και *Belgica antarctica* (Lopez-Martinez *και συν.*, 2009), το έντομο *Cimex lectularius* (Benoit *και συν.*, 2009), και οι μύγες του είδους *Sarcophaga crassipalpis* (Hayward, Rinehart & Denlinger, 2004) αλλά όχι στη *D. melanogaster* (Sinclair, Gibbs & Roberts, 2007). Μάλιστα, φάνηκε ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η αφυδάτωση που υπέστη το κάθε άτομο (απώλεια νερού ως ποσοστό του αρχικού βάρους) τόσο υψηλότερα είναι και τα επίπεδα mRNA των Hsp70. Σημειώνεται ότι φάνηκε να μην υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στο νερό (σαν απόλυτη τιμή) που χάνει το είδος και τα επίπεδα των Hsp70 πράγμα αναμενόμενο αν σκεφτεί κανείς ότι η απώλεια δεδομένης ποσότητας νερού δεν μπορεί να έχει την ίδια επίπτωση σε ένα μεγαλόσωμο και σε ένα μικρόσωμο ζώο, και η έκφραση των Hsp70 σχετίζεται με το

αποτέλεσμα της έκθεσης στις ακραίες συνθήκες δηλαδή τον βαθμό της αφυδάτωσης σαν ποσοστό του αρχικού βάρους που χάθηκε. Αυτή η γραμμική σχέση συνέχισε να υπάρχει και μάλιστα ενισχύθηκε όταν η ανάλυση επαναλήφθηκε λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών (Πίνακας 4.17). Αυτό δείχνει ότι το πρότυπο που περιγράφηκε παραπάνω δεν οφείλεται στο ότι απλά μελετάμε διαφορετικά είδη αλλά πρόκειται για καθαρή σχέση ανάμεσα σε «αίτιο» ή στον στρεσογόνο παράγοντα (ο βαθμός της αφυδάτωσης) και «αποτέλεσμα» δηλαδή έκφραση Hsp70. Η γραμμικότητα της σχέσης είναι αναμενόμενη καθώς είναι γνωστό ότι τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 εξαρτώνται τόσο από τη «δόση» του στρεσογόνου παράγοντα όσο και από το χρόνο έκθεσης (DiDomenico, Bugaisky & Lindquist, 1982). Στη μελέτη αυτή τόσο η «δόση» όσο και ο «χρόνος» έκθεσης ήταν σταθερά για όλα τα άτομα, αλλά το αποτέλεσμα της έκθεσης, δηλαδή το επίπεδο αφυδάτωσης (όταν εκφραστεί ως ποσοστό της αρχικής μάζας των ατόμων που χάνεται), διέφερε μεταξύ των ατόμων καθώς τα άτομα διέφεραν σε μέγεθος.

Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή των οργανισμών στην αφυδάτωση καθώς έχει βρεθεί ότι έντομα στα οποία αδρανοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί για τις Hsp70 ήταν λιγότερα ανθεκτικά στην αφυδάτωση σε σχέση με άτομα τα οποία μπορούσαν να κωδικοποιούν φυσιολογικά τις Hsp70 (Benoit *και συν.*, 2010). Επίσης έχει βρεθεί ότι οι Hsp70 συμβάλουν και στην αντοχή των οργανισμών στο ψύχος και τη ζέστη (Koštál & Tollarová-Borovanská, 2009). Σε δια-ειδικό επίπεδο, δεν φάνηκε να υπάρχουν διαφορές ως προς την έκφραση των Hsp70 (ούτε σε επίπεδο mRNA ούτε πρωτεΐνης) ανάμεσα στα διαφορετικά είδη *Codringtonia*, όπως δεν παρατηρηθήκαν διαφορές και στον ρυθμό απώλειας νερού σε δια-ειδικό επίπεδο (εξαίρεση το *C. helenae*). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι, ενώ το είδος *C. helenae* φάνηκε να έχει τον υψηλότερο ρυθμό απώλειας νερού σε σχέση με άλλα είδη, δεν εμφάνισε κάποια αντίστοιχη διαφοροποίηση του ως προς τα επίπεδα έκφρασης Hsp70. Μάλιστα, δεν φαίνεται ούτε καν να αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης των Hsp70 (ούτε σε επίπεδο mRNA ούτε σε επίπεδο πρωτεΐνης), μετά την έκθεση του σε υψηλή θερμοκρασία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 4.18), γεγονός που προκαλεί εντύπωση δεδομένης της αφυδάτωσης που έχει υποστεί. Υπάρχουν δύο υποθέσεις που θα μπορούσαν να εξηγήσουν του εύρημα αυτό. Η πρώτη υποστηρίζει ότι η διάρκεια της έκθεσης δεν ήταν αρκετή, για αυτό το είδος, για να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70. Κάποιοι οργανισμοί αρχίζουν να εκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές αρκετά μετά τη δράση του στρεσογόνου παράγοντα κατά τη

διάρκεια της ανάκαμψης από αυτόν. Για παράδειγμα το είδος υδρόβιου σαλιγκαριού *Tegula brunnea* αρχίζει να εκφράζει τις Hsp70 2-14 ώρες μετά την έκθεση του σε υψηλή (υποθανατηφόρα) θερμοκρασία (Tomanek & Somero, 2000). Η δεύτερη υπόθεση είναι ότι είναι ότι ο βαθμός της αφυδάτωσης που έχει υποστεί το είδος αυτό, ήταν «πολύ έντονο στρες», με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθούν πρώτα οι κυτταρικοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να αποτρέψουν τον θάνατο κυττάρων και όχι οι μηχανισμοί που αυξάνουν τη σύνθεση Hsp70, καθώς σε τόσο έντονο στρες το κόστος από την ενεργοποίηση των δεύτερων μηχανισμών θα ήταν μεγαλύτερο από το όφελος. Σε μια πρόσφατη εργασία ανασκόπησης από τον Morris *και συν.* (2013) αναφέρεται ότι «Όταν ένας στρεσογόνος παράγοντας είναι τόσο σοβαρός που μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο, ενεργοποιούνται κατά κύριο λόγο κυτταρικοί μηχανισμοί με σκοπό την αποφυγή του κυτταρικού θανάτου. Στο σημείο αυτό, το κόστος της αύξησης των επίπεδων του HSR αντισταθμίζει τα οφέλη, και όλη η διαθέσιμη ενέργεια διοχετεύεται προς την κυτταρική επιβίωση». Οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι εάν ο υπό μελέτη πληθυσμός (το δείγμα) υποβάλλεται σε μια σχεδόν θανατηφόρο έκθεση στον όποιο στρεσογόνο παράγοντα, είναι μάλλον ανέφικτο να καταγραφεί αύξηση της έκφρασης Hsp70, ακόμη και αν τα κύτταρα έχουν υποστεί σοβαρή πίεση (στρες). Είμαι υπέρ της δεύτερης υπόθεσης, ωστόσο καμία από της δύο υποθέσεις δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με βάση τα στοιχεία που είναι διαθέσιμα.

Το άλλο είδος που δεν εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης Hsp70 (ούτε σε επίπεδο mRNA ούτε πρωτεΐνης) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 4.18.Α και 4.18.Β) είναι το *C. gittenbergeri*. Οι παραπάνω υποθέσεις μπορούν να διατυπωθούν επίσης και στην περίπτωση του *C. gittenbergeri* αλλά στο είδος αυτό υπάρχουν ενδείξεις (οριακά μη σημαντικές) ότι διαθέτει υψηλότερα επίπεδα Hsp70 (κυρίως σε επίπεδο πρωτεΐνης) χωρίς να υποστεί κάποιο στρες σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη *Codringtonia* (Εικόνα 4.18.Δ). Μια άλλη υπόθεση που θα μπορούσε να διατυπωθεί για το *C. gittenbergeri* είναι ότι τα επίπεδα Hsp70 που διαθέτει χωρίς την ύπαρξη στρες ήταν αρκετά για να παρέχουν προστασία από τις βλαβερές συνέπειες της έκθεση σε ακραία θερμοκρασία. Τα άτομα *C. gittenbergeri* μετά την έκθεσή τους είχαν χάσει συνολικά 5,38 ± 0,62% της αρχικής μάζας του σώματός τους, αλλά ίσως αυτό να μην είναι αρκετό για το συγκεκριμένο είδος ώστε να αυξήσει τη σύνθεση Hsp70. Ο Mizrahi *και συν.* (2010) μελετώντας το είδος *Sphincterochila zonata* που είναι ερημικό είδος και ανθεκτικό στην αφυδάτωση, αναφέρουν ότι μετά από 3 ημέρες αφυδάτωσης δεν παρατηρήθηκε αύξηση της σύνθεσης Hsp70 παρ' όλο που τα ζώα είχαν χάσει κατά μέσο όρο περισσότερο από το 6% της αρχικής μάζας του σώματός

τους. Παρ' όλα αυτά όμως, και σε αυτή τη περίπτωση το σενάριο αυτό δεν μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα.

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι στη διατριβή αυτή μελετήθηκαν μόνο τα επίπεδα έκφρασης της Hsp70, καθώς η ομάδα αυτή είναι από τα πιο κοινές Hsps που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των αποκρίσεων στην αφυδάτωση και έχει χρησιμοποιηθεί για περισσότερο από δύο δεκαετίες ως δείκτης στρες (Benoit *και συν.*, 2010; Morris, Thatje & Hauton, 2013). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες Hsps (όπως είναι οι Hsp90, οι μικρές Hsps κλπ) που χρησιμεύουν στην επιβίωση των οργανισμών όταν αυτοί βρεθούν σε στρεσογόνες συνθήκες. Επομένως τα δύο είδη *Codringtonia* (*C. gittenbergeri* και *C. helenae*) θα μπορούσαν να έχουν ενεργοποιήσει κάποια/ες από αυτές τις ομάδες πρωτεϊνών. Τελικά αυτό που μπορεί να υποστηριχθεί με ασφάλεια είναι ότι το *C. gittenbergeri* και το *C. helenae* παρουσιάζουν καθυστερημένη απόκριση στο θερμικό σοκ (όσον αφορά τη σύνθεση της Hsp70), σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη *Codringtonia* και ίσως να χρειάζονται άλλες συνθήκες έκθεσης (π.χ. περισσότερο πιεστικές συνθήκες, μεγαλύτερος χρόνος έκθεσης) και /ή ένα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανάκαμψης πριν από τη μέτρηση, προκειμένου να παρατηρηθεί αύξηση στα επίπεδα Hsp70 και σε αυτά τα είδη.

Οι οργανισμοί όμως εκφράζουν τις Hsp70 ακόμη και χωρίς να προηγηθεί κάποιου είδους στρες, όταν πραγματοποιήθηκε σύγκριση αυτών των ενδογενών επιπέδων Hsp70 μεταξύ των ειδών δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ειδών αλλά παρ' όλα αυτά παρατηρείται μια τάση (Εικόνα 4.18.Δ) διαφοροποίησης με τα είδη που κατανέμονται νοτιότερα να έχουν και υψηλότερα επίπεδα Hsp70, όπως για παράδειγμα το *C. gittenbergeri*. Για τον λόγο αυτόν, κρίθηκε απαραίτητο να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση των επιπέδων Hsp70 και κάποιων χωρικών καθώς και κλιματικών μεταβλητών. Έτσι, φάνηκε να υπάρχει όντως αρνητική γραμμική σχέση μεταξύ των Hsp70 και του υψομέτρου, του γεωγρ. πλάτους αλλά και του ποσού των κατακρημνίσεων του καλοκαιριού. Αυτό σημαίνει ότι τα είδη που κατανέμονται σε πιο «ξηρές» και ζεστές περιοχές (χαμηλού υψομέτρου ή νότια της περιοχής εξάπλωσης του γένους) έχουν την τάση να εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα Hsp70 χωρίς να υποστούν την επίδραση κάποιου στρεσογόνου παράγοντα, σε σχέση με είδη που κατανέμονται βορειότερα ή σε περιοχές μεγαλύτερου υψομέτρου (Εικόνα 4.20). Βέβαια, στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τα είδη *Codringtonia* εμφανίζουν μια ιδιομορφία ως προς την κατανομή τους (βλ. κεφάλαιο 1), καθώς εμφανίζουν μωσαϊκή κατανομή και το κάθε είδος καταλαμβάνει συγκεκριμένη περιοχή, με άλλα λόγια, άλλα είδη κατανέμονται νότια,

άλλα είδη κεντρικά και άλλα βόρεια της περιοχής εξάπλωσης. Έτσι, θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι η σχέση που καταγράφηκε ανάμεσα στις γεωγρ. μεταβλητές και τις Hsp70 να οφείλεται απλά στο ότι μελετώνται διαφορετικά είδη που το καθένα τυχαίνει να καταλαμβάνει συγκεκριμένη γεωγρ. περιοχή. Για τον λόγο αυτόν, έπρεπε να αφαιρεθεί αυτός ο παράγοντας (οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών) από την ανάλυση και να εξεταστούν εκ νέου οι σχέσεις των επιπέδων έκφρασης Hsp70 αλλά και του ρυθμού απώλειας νερού με τις χωρικές και κλιματικές μεταβλητές (Πίνακας 4.17). Βρέθηκε ότι ακόμη και όταν ληφθούν υπ' όψιν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών, παραμένει η γραμμική αρνητική σχέση μεταξύ των Hsp70 και του υψομέτρου αλλά και του ποσού των θερινών κατακρημνίσεων και μάλιστα οι σχέσεις ενισχύονται σε σχέση με την προηγούμενη ανάλυση, ενώ η σχέση με των Hsp70 με το γεωγρ. πλάτος συνεχίζει να υπάρχει αλλά δεν είναι πλέον στατιστικά σημαντική (Πίνακας 4.17). Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό καθώς δείχνει ότι το πρότυπο που περιγράφηκε παραπάνω (τα είδη που κατανέμονται νοτιότερα να έχουν και υψηλότερα ενδογενή επίπεδα Hsp70), δεν είναι φυλογενετικά καθοριζόμενο αλλά άλλοι παράγοντες όπως είναι αβιοτικοί παράγοντες, παίζουν ρόλο στη δημιουργία αυτού του προτύπου.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση των Hsp διαφέρει ανάμεσα σε είδη που ζουν σε περιβάλλοντα με διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι διάφορα είδη που ζουν σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες θερμοκρασίες έχουν σχετικά αυξημένα επίπεδα Hsp στα κύτταρα τους ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, έτσι είναι συνεχώς «προετοιμασμένα» για τη ζωή υπό συνθήκες υπερθερμίας χωρίς να χρειάζονται δραστικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων τους (Engenev, 2007). Στη μελέτη αυτή κανένας από τους σταθμούς δειγματοληψίας δεν μπορεί να θεωρηθεί «ακραίο περιβάλλον», ωστόσο μπορεί να παρατηρήσει κανείς την τάση τα είδη που ζουν πιο νότια ή σε πιο ζεστές και ξηρές περιοχές να εκφράζουν και υψηλότερα επίπεδα Hsp μόνιμα. Επίσης είδη που ζουν σε περιοχές όπου επικρατούν πιο υψηλές θερμοκρασίες, είναι γενικά και πιο θερμοανθεκτικά και αρχίζουν να εκφράζουν τις Hsp σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με συγγενικά τους είδη που διαβιούν σε ψυχρότερα περιβάλλοντα (Engenev, 2007; Tomanek & Somero, 2002). Έχει αναφερθεί όμως και το αντίθετο πρότυπο (Mizrahi *και συν.*, 2010; Tomanek & Somero, 2000), και έχει βρεθεί ότι τα πιο θερμοευαίσθητα είδη διατηρούν συνεχώς υψηλότερα ενδογενή επίπεδα Hsp70.

Συνοπτικά

Οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων, του γλυκογόνου και των πρωτεϊνών καθώς και το πρότυπο της μεταβολής τους κατά τη διάρκεια του έτους σχετίζονται άμεσα με την κατάσταση των ατόμων (ενεργά ή μη ενεργά άτομα), καθώς είναι αναμενόμενο τις περιόδους που τα άτομα είναι ενεργά (φθινόπωρο και άνοιξη) οι συγκεντρώσεις αυτών να αυξάνονται αφού τα ζώα τρέφονται κανονικά και τις περιόδους που δεν είναι ενεργά (χειμώνας-διαχείμαση και καλοκαίρι-διαθέριση) τα επίπεδα αυτών να μειώνονται. Αυτό γίνεται εμφανές και από το γεγονός ότι τα δεδομένα που αφορούν τους παραπάνω παρόγοντες ερμηνεύονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό από τις διαφορές των κλιματικών συνθηκών στις περιοχές δειγματοληψίας οι οποίες άμεσα επηρεάζουν την κατάσταση των ατόμων. Ωστόσο, τα είδη φαίνεται να αντιμετωπίζουν (σε βιοχημικό επίπεδο/φυσιολογίας) τον χειμώνα σαν περίοδο δραστηριότητας (ενώ δεν είναι ενεργά) καθώς εμφανίζουν περισσότερες ομοιότητες σε βιοχημικό επίπεδο με τις περιόδους δραστηριότητας (φθινόπωρο και άνοιξη) παρά με τη διαθέριση. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα (την περίοδο των χαμηλών θερμοκρασιών) τα ζώα παραμένουν μέσα σε κρύπτες των βράχων, σχηματίζουν 5-6 στρώματα επιφράγματος για να κλείσουν το άνοιγμα του κελύφους τους και δεν διακόπτουν τη διαχείμαση έως ότου οι περιβαλλοντικές συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές (Giokas *και συν.*, 2007; Hadjicharalambous, 1996). Αντιθέτως, η διαθέριση θεωρείται περίοδος «περιστασιακής» ύπνωσης καθώς όταν οι συνθήκες γίνονται ευνοϊκές (χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία και βροχόπτωση), μέρος του πληθυσμού ενεργοποιείται. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής προκύπτει ότι ίσως η διαχείμαση να μην τόσο στρεσογόνα περίοδος για τα υπό μελέτη είδη όσο η διαθέριση, καθώς τα ζώα αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες τόσο σε επίπεδο φυσιολογίας όσο και σε επίπεδο συμπεριφοράς (προστατεύονται μένοντας σε «καταφύγια» μέσα σε κρύπτες βράχων και παραμένουν ανενεργά έως ότου οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν και πάλι ευνοϊκές). Ο μεταβολισμός των σαλιγκαριών κατά τη διάπαυση, θεωρείται αερόβιος, η μη αύξηση της δραστικότητας της LDH κατά τη διαχείμαση αποτελεί μια ένδειξη ότι τα αερόβια μεταβολικά μονοπάτια είναι επαρκή για να στηρίξουν τον μεταβολισμό των ζώων και δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησης αναερόβιων μονοπατιών. Επίσης οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων, πρωτεϊνών και του γλυκογόνου γενικά δεν φαίνεται να μειώνονται τόσο όσο το καλοκαίρι αλλά αντίθετα διατηρούνται σε επίπεδα περιόδων δραστηριότητας. Τέλος δεν φαίνεται να υφίστανται υδατικό στρες καθώς διατηρούν υψηλά επίπεδα νερού.

Επίσης, η μελέτη αυτή έδειξε ότι η απώλεια νερού κατά τη διάρκεια της διάπαυσης του καλοκαιριού, που παρατηρείται στο *C. helenae*, δεν είναι γενικό χαρακτηριστικό όλων των ειδών *Codringtonia*. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της πειραματικής αφυδάτωσης το ποσοστό απώλειας νερού στο *C. helenae* ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με όλα τα άλλα είδη *Codringtonia*, υποδεικνύοντας έτσι ότι το *C. helenae* είναι εγγενώς διαφορετικό όσον αφορά τη διατήρηση του νερού, από τα υπόλοιπα είδη *Codringtonia* που μελετήθηκαν. Ακόμα και αν σε τέσσερα από τα έξι είδη που μελετήθηκαν, τα επίπεδα έκφρασης Hsp70 (mRNA) στην ομάδα που υπέστη αφυδάτωση είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα μη εκτεθειμένα άτομα, δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ειδών. Επιπλέον, καταγράφηκε θετική σχέση μεταξύ των επιπέδων Hsp70 (επίπεδο mRNA) και του ρυθμού απώλειας νερού και μάλιστα η σχέση αυτή γίνεται πιο ισχυρή όταν λαμβάνονται υπ' όψιν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών. Από την άλλη πλευρά, η αρνητική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης Hsp70 (mRNA) χωρίς να προηγηθεί στρες με το υψόμετρο και τη μέση βροχόπτωση του καλοκαιριού στις περιοχές δειγματοληψίας και η ενίσχυση των σχέσεων αυτών όταν λήφθηκαν υπ' όψιν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών αποτελούν ενδείξεις ότι πρόκειται για προσαρμοστικό χαρακτηριστικό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ-
ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Next to music and art science is the greatest
most beautiful and most enlightening
achievement of the human spirit
Karl Popper

Η μελέτη αυτή είναι μία συγκριτική μελέτη των ειδών του γένους *Codringtonia* σε επίπεδο μορφολογίας και φυσιολογικών προσαρμογών. Σε μια μελέτη που περιλαμβάνει συγκρίσεις μεταξύ πολλών ειδών απαραίτητη είναι και η γνώση των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών που πρόκειται να μελετηθούν. Για το λόγο αυτόν έπρεπε πρώτα να επιλυθεί η φυλογένεση των ειδών *Codringtonia* καθώς αυτή δεν ήταν διαθέσιμη.

Από την επίλυση της φυλογένεσης (κεφάλαιο 2) προέκυψε ένα ***φυλογενετικό δέντρο με επτά διακριτούς κλάδους***, οι έξι από τους οποίους αντιστοιχούν ο κάθε ένας σε ένα είδος *Codringtonia* (*C. helenae, C. codringtonii, C. eucineta, C. intusplicata*, *C. parnassia* και *C. neocrassa*), επιβεβαιώνοντας έτσι τη συστηματική αναθεώρηση του Subai (2005) για έξι από τα οκτώ κατ' όνομα είδη, που προσδιόρισε με βάση χαρακτηριστικά του κελύφους και ανατομικά χαρακτηριστικά του αναπαραγωγικού συστήματος. Ο έβδομος κλάδος του δέντρου αποτελείται από δύο είδη, το *C. gittenbergeri* και το *C. elisabethae*, τα οποία σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο αυτά είδη κατανέμονται σε γειτονικές περιοχές (Εικόνα 1.4), οπτικά διαπιστώνονται πολλές ομοιότητες στο κέλυφος τους (Εικόνες 1.9 και 1.11), αλλά και η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (κεφάλαιο 3) έδειξε ότι οι πληθυσμοί των δύο αυτών ειδών δεν μπορούν να διακριθούν καλά με βάση τη συνολική μορφολογία του κελύφους (Εικόνα 3.7.Γ) καθώς τα μορφολογικά νέφη των πληθυσμών του ενός είδους επικαλύπτονται με αυτά των πληθυσμών του άλλου. Ένας πιθανός λόγος για αυτή την παραφυλετικότητα μπορεί να είναι ο ατελής διαχωρισμός των γενεαλογικών γραμμών (Sauer & Hausdorf, 2010). Ακόμη, η ομοιότητα ανάμεσα στα δύο είδη, σε γενετικό αλλά και σε μορφολογικό επίπεδο, οδηγεί στην υπόθεση ότι ίσως να μην πρόκειται για δύο διακριτά είδη όπως είχε προσδιοριστεί (Subai, 2005). Ωστόσο εδώ δεν θα γίνει καμία ανάλυση ή συζήτηση για τη συστηματική κατάταξη των ειδών καθώς αυτό ξεφεύγει από τους στόχους της μελέτης, αυτό όμως που φαίνεται αναγκαίο με βάση τα αποτελέσματα της διατριβής, είναι ότι χρειάζεται μία ***συστηματική αναθεώρηση*** του γένους.

Η συστηματική αναθεώρηση κρίνεται απαραίτητη και για έναν ακόμη λόγο. Για το είδος *C. neocrassa* παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, οι οποίες εστιάζονται στη φυλογένεση (Εικόνα 2.9) καθώς και στην πολύ μεγάλη γενετική του απόσταση από τα υπόλοιπα είδη, το *C. neocrassa* διαφέρει από τα υπόλοιπα είδη *Codringtonia* όσο περίπου διαφέρει η εξω-ομάδα σε σχέση με τα είδη *Codringtonia* (Πίνακας 2.6 και 2.7). Θα μπορούσε επομένως να θεωρηθεί ότι το

C. neocrassa ανήκει σε κάποιο άλλο ξεχωριστό γένος, σχετικά απομακρυσμένο από το γένος *Codringtonia*. Επίσης, το είδος *C. neocrassa* διαφέρει αρκετά ως προς τη μορφολογία του κελύφους (Εικόνα 1.5) και την ανατομία του αναπαραγωγικού (Subai, 2005) από τα υπόλοιπα είδη και μάλιστα και ο ίδιος ο Subai (2005) θεωρεί το *C. neocrassa* ότι ανήκει σε διαφορετικό υπογένος από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Codringtonia.* Ακόμη, κατανέμεται αρκετά μακριά σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη (Εικόνα 1.4) και δεν υπάρχουν άλλα είδη στην περιοχή ανάμεσα στις περιοχές κατανομής του *C. neocrassa* και των υπολοίπων ειδών. Όλα αυτά συνηγορούν υπέρ του ότι ***το είδος C. neocrassa*** πιθανόν να είναι ένα εναπομείναν ***είδος ενός διαφορετικού γένους***, με περιορισμένη σημερινή κατανομή, το οποίο έχει μερικώς παρόμοια μορφολογικά και οικολογικά χαρακτηριστικά με το *Codringtonia*.

Οι επτά κύριοι κλάδοι του δέντρου (οι έξι από τους οποίους αντιστοιχούν και στα κατ' όνομα είδη) διαφοροποιήθηκαν σε ***χρονικό διάστημα 7,6 ως 1,58 εκατ. χρόνια πριν*** από σήμερα, δηλαδή στα τέλη της Μειόκαινου προς αρχή της Πλειστόκαινου εποχής. Τα είδη ***Codringtonia*** **της Πελοποννήσου** διαφοροποιήθηκαν μεταξύ ***3,4 ως 1,58 εκατ. χρόνια πριν***, δηλαδή την περίοδο Πλειόκαινο-Πλειστόκαινο (Εικόνα 2.10). Το πιο παλιό είδος (αν θεωρήσουμε ότι το *C. neocrassa* δεν ανήκει στο γένος) είναι το *C. parnassia* και τα πιο πρόσφατα διαφοροποιημένα είναι το *C. helenae* και τα *C. gittenbergeri -C. elisabethae*. Μάλιστα είναι αξιοσημείωτο ότι ο κλάδος του *C. parnassia* υποδιαιρείται σε δύο υπο-κλάδους (Εικόνες 2.9 και 3.3) και στον ίδιο χρονικό ορίζοντα που πραγματοποιείται αυτή η διαφοροποίηση προς τη δημιουργία των πληθυσμών του *C. parnassia,* πραγματοποιείται επίσης και η διαφοροποίηση σε είδη (ειδογένεση) για κάποια άλλα είδη του γένους όπως ο διαχωρισμός του *C. codringtonii* από τον πρόγονο των *C. helenae- C. gittenbergeri -C. elisabethae.* Ουσιαστικά η διαφοροποίηση σε επίπεδο πληθυσμών του *C. parnassia* είναι αρκετά παλιά και μάλιστα προηγείται της διαφοροποίησης σε επίπεδο είδους για τα *C. helenae* και *C. gittenbergeri -C. elisabethae*. Επίσης η μεγάλη γενετική διαφοροποίηση συνοδεύεται και από αντίστοιχη μορφολογική διαφοροποίηση στο κέλυφος (Εικόνα 3.7.ΣΤ), καθώς είναι φανερό ότι οι πληθυσμοί του *C. parnassia* διακρίνονται αρκετά καλά μεταξύ τους με βάση τη συνολική μορφολογία του κελύφους.

Από τα χρονικά όρια της διαφοροποίησης των ειδών γίνεται σαφές ότι σε μικρό χρονικό διάστημα (μέσα σε περίπου 6 εκατ. χρόνια, ενώ για τα είδη Πελοποννήσου χρειάστηκαν λιγότερο από 2 εκατ. χρόνια για να δημιουργηθούν 6 είδη ή 5 κλάδοι) και σχετικά πρόσφατα, ένα ολόκληρο γένος χερσαίων σαλιγκαριών διαφοροποιείται

και δίνει 7 κατ' όνομα είδη (από εδώ και στο εξής δεν θα λαμβάνεται υπ 'όψιν το *C. neocrassa*) ή με βάση τη φυλογένεση έξι διακριτούς κλάδους που καθένας αντιστοιχεί σε ένα είδος (εξαίρεση ο κλάδος *C. gittenbergeri* -*C. elisabethae* όπου σύμφωνα με την υπάρχουσα συστηματική κατάταξη θα πρέπει να αναφερθώ σε δύο είδη), σε μια πολύ μικρής γεωγραφικής κλίμακας περιοχή. Αυτά, σε συνδυασμό με ήδη γνωστά από τη βιβλιογραφία (Hadjicharalambous, 1996; Subai, 2005) δεδομένα, όπως είναι ο ενδημισμός του γένους, η μωσαϊκότητα της κατανομής των ειδών και οι ιδιαιτερότητες του βιολογικού τους κύκλου, γεννούν κάποια ερωτήματα όπως από πού, με ποιό τρόπο και με τι «εφόδια» και προσαρμογές διαμόρφωσε αυτό το γένος τη σημερινή κατανομή του; Επίσης, αν στα προηγούμενα προστεθεί και το γεγονός της πολύ μεγάλης μορφολογικής πλαστικότητας (Εικόνα 3.5) που έχουν τα είδη καθώς και το ότι οι πληθυσμοί των ειδών, διακρίνονται αρκετά καλά μεταξύ τους (μάλιστα για τα είδη *C. parnassia* και *C. codringtonii* δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου επικάλυψη) σε επίπεδο μορφολογίας κελύφους (Εικόνα 3.7) δημιουργεί και άλλα ερωτήματα για το αν είναι ιστορικά ή οικολογικά τα αίτια που οδήγησαν το γένος σε τέτοια διαφοροποίηση και πώς δημιουργήθηκε αυτή η ποικιλομορφία στα είδη μέσα στο χώρο και στο χρόνο;

Μετά την ανάλυση της μορφολογίας του κελύφους (κεφάλαιο 3), προέκυψε ότι τα είδη εμφανίζουν ***πολύ μεγάλη πλαστικότητα-ποικιλομορφία στη μορφολογία του κελύφους***, με αποτέλεσμα να γίνεται δύσκολη (αν όχι ανέφικτη) η διάκριση όλων των ειδών μεταξύ τους στηριζόμενη αποκλειστικά και μόνο στα γνωρίσματα αυτά (Εικόνα 3.5). Η αλήθεια είναι ότι κάποια είδη ξεχωρίζουν μεταξύ τους αλλά αυτό οφείλεται κυρίως στη διαφορά μεγέθους (Εικόνα 3.5). Η μεγάλη πλαστικότητα που εμφανίζουν τα είδη, οφείλεται στο ότι οι πληθυσμοί τους είναι αρκετά διαφοροποιημένοι μεταξύ τους (Εικόνα 3.7). Το εύλογο ερώτημα λοιπόν που προκύπτει είναι αν η μεγάλη πλαστικότητα είναι φυλογενετικά καθοριζόμενη ή αποτέλεσμα της επίδρασης του περιβάλλοντος; Πριν απαντήσουμε όμως σε αυτό ας δούμε πώς διαμορφώθηκε;

Το πιο πιθανό βιογεωγραφικό σενάριο (Εικόνα 2.11) που εξηγεί τη σημερινή κατανομή των ειδών *Codringtonia* υποστηρίζει ότι το προγονικό είδος κατανεμόταν στη Στερεά Ελλάδα και στη συνέχεια, ένα γεγονός ειδογένεσης επέτρεψε την εποίκιση της Πελοποννήσου, αργότερα κυρίως μέσω διασποράς αλλά και βικαριανισμού, τα είδη *Codringtonia* άρχισαν σταδιακά να εξαπλώνονται προς τα νότια και να διαφοροποιούνται προς τις σημερινές τους μορφές. Καθώς όμως τα είδη διαφοροποιούνταν και ***επεκτείνονταν προς τα νότια παράλληλα αυξανόταν και***

το μέγεθος του κελύφους τους. Πράγματι, αν κανείς εστιάσει στο μέγεθος των ειδών θα παρατηρήσει μια ισχυρή αρνητική σχέση ανάμεσα στο γεωγραφικό πλάτος και το μέγεθος του κελύφους (Εικόνα 3.9) ή με άλλα λόγια είναι εμφανής η τάση τα είδη με μικρότερο κέλυφος να βρίσκονται πιο βόρεια στην ευρύτερη περιοχή κατανομής του γένους ενώ αυτά που έχουν μεγαλύτερο κέλυφος να βρίσκονται πιο νότια. Το ***μέγεθος του κελύφους*** είναι ένα χαρακτηριστικό που ***κατά ένα μέρος διαμορφώθηκε-καθορίστηκε στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης*** του γένους (στα πρώτα κλαδογενετικά συμβάντα) και στη συνέχεια η ποικιλότητα ***αυξανόταν αναλογικά με τη φυλογένεση*** (καθώς προχωρούσε η διαφοροποίηση των ειδών και στη συνέχεια των πληθυσμών). Το ***σχήμα του ανοίγματος*** αντίθετα είναι κάτι που ***διαφοροποιήθηκε κυρίως*** κατά τα τελευταία κλαδογενετικά συμβάντα, κυρίως δηλαδή ***σε επίπεδο πληθυσμών*** και το ***σχήμα του κελύφους*** ακολούθησε ένα ***ενδιάμεσο πρότυπο*** (ένα σχετικά μικρό μέρος της ποικιλομορφίας καθορίστηκε στα πρώτα κλαδογενετικά συμβάντα αλλά το μεγαλύτερο μέρος στα πιο πρόσφατα, σε επίπεδο πληθυσμών).

Το βιογεωγραφικό σενάριο που προτάθηκε φαίνεται πιθανό καθώς τα γεγονότα κλαδογένεσης, στην Πελοπόννησο, συνέβησαν πριν 3,44 εκ. χρόνια περίπου, μια περίοδο ιδιαίτερα σημαντική για την περιοχή για δύο λόγους οι οποίοι θα μπορούσαν να έχουν δημιουργήσει τις προϋποθέσεις ώστε η προγονική γενεαλογική γραμμή του γένους *Codringtonia* να επεκταθεί γεωγραφικά, να διαφοροποιηθεί και τελικά να δημιουργηθούν νέα είδη. Την περίοδο εκείνη, η Πελοπόννησος αποχωρίζεται από την κεντρική Ελλάδα και αρχίζει σταδιακά να μεγαλώνει σε έκταση παράλληλα με την επικράτηση του μεσογειακού κλίματος στην περιοχή (Blondel & Aronson, 1999). Την ίδια περίοδο (πριν από 3,5-2,5 εκ. χρόνια) η θερμοκρασία στη νότια μεσόγειο αυξήθηκε αλλά δεν υπήρξε αλλαγή στη βροχόπτωση με αποτέλεσμα το κλίμα να γίνει πιο ξηρό (Salzmann *και συν.*, 2008). Είναι πιθανόν λοιπόν, καθώς γινόταν η διασπορά του γένους από τα βόρεια προς τα νότια, τα είδη που ήταν προσαρμοσμένα σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες να αναγκάζονταν να καταλαμβάνουν ολοένα και μεγαλύτερα υψόμετρα καθώς προχωρούσαν προς τα νότια, καθώς επίσης είναι πιθανό, η προς νότο εξάπλωση να προκάλεσε και την προσαρμογή των οργανισμών που βρέθηκαν σε χαμηλά υψόμετρα στο πιο ζεστό και ξηρό περιβάλλον. Δυστυχώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα κλιματικά δεδομένα από την περίοδο εκείνη για να ελεγχθεί η υπόθεση αν το κλίμα επηρέασε και πως τη συνολική μορφολογία του κελύφους (το μέγεθος και το σχήμα του κελύφους).

Παρ' όλα αυτά όμως ελέγχθηκε αν αυτή η τόσο μεγάλη κελυφική ποικιλότητα καθορίστηκε/δημιουργήθηκε λόγω της επίδρασης του χώρου, του κλίματος (σύγχρονου κλίματος ή/και του παρελθοντικού, του μεγίστου της τελευταίας παγετώδους περιόδου) και επομένως πρόκειται για προσαρμογή, ή αν καθορίστηκε από τη φυλογένεση (δηλαδή οφείλεται σε ιστορικά αίτια). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τη φυλογένεση (κεφάλαιο 2), τη γεωγραφική κατανομή των ειδών καθώς και κλιματικά χαρακτηριστικά (κεφάλαιο 3) για να διαπιστωθεί τι ήταν αυτό που διαμόρφωσε αυτή την ποικιλότητα.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδειξε ότι τόσο το ***σύγχρονο*** όσο ***και το παρελθοντικό κλίμα*** εξηγούν ένα σημαντικό μέρος της ποικιλομορφίας που παρατηρείται στο ***μέγεθος του κελύφους*** (Πίνακας 3.8) και ότι ***οι κλιματικές συνθήκες του παρελθόντος*** μπορούν να ερμηνεύσουν κατά ένα μέρος την παρατηρούμενη ποικιλότητα και στο ***σχήμα του κελύφους***. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι στην πρώτη περίπτωση η επίδραση του κλίματος δεν μπορεί να διακριθεί από αυτή της φυλογένεσης και του χώρου (στην πραγματικότητα και ο παράγοντας «χώρος» είναι μια άλλη έκφραση της διαφοράς των κλιματικών συνθηκών που επικρατούν σε κάθε περιοχή) που σημαίνει ότι οι κλιματικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι μια άλλη έκφραση της μεταβολής του γεωγραφικού πλάτους. Η επίδραση των κλιματικών συνθηκών στη διαμόρφωση της κελυφικής ποικιλότητας δεν είναι κάτι καινούριο καθώς υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις χερσαίων σαλιγκαριών, που έχουν καταλήξει σε αντίστοιχα συμπεράσματα (Buckley *και συν.*, 2011; Parent & Crespi, 2009b; Pfenninger *και συν.*, 2003).

Συνοψίζοντας λοιπόν φαίνεται ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση το μέγεθος του κελύφους καθορίζεται από την αλληλεπίδραση της φυλογένεσης (και όταν λέμε φυλογένεση εννοούμε και τα παλιά αλλά και τα πρόσφατα κλαδογενετικά γεγονότα) και των κλιματικών συνθηκών (Εικόνα 3.11.Α) και ότι η τάση που ακολουθήθηκε ήταν η σταδιακή αύξηση του μεγέθους καθώς γινόταν η μετάβαση από τον βορά προς το νότο. Μάλιστα ένα κομβικό σημείο στη διαμόρφωση της ποικιλότητα στο μέγεθος των ειδών *Codringtonia* ήταν πριν από 3,44 εκατομμύρια χρόνια κατά τη διαφοροποίηση του *C. intusplicata* από τον πρόγονο των υπολοίπων ειδών (Εικόνα 3.6.Α). Το σχήμα του κελύφους καθορίζεται ως ένα βαθμό από τη φυλογένεση αν και σε μικρότερο βαθμό κάποιο ρόλο έπαιξε και η χωρική κατανομή των ειδών (Εικόνα 3.11.Β). Το κομβικό σημείο εδώ ήταν όταν το *C. codringtonii* διαχωρίστηκε από τον αδελφό κλάδο που περιλαμβάνει τα είδη *C. gittenbergeri-elisabethae* και *C. helenae*,

γεγονός που συνέβη πριν από 2,85 εκατομμύρια χρόνια. Η επόμενη μεγάλη μεταβολή στο σχήμα σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους *C. intusplicata* πριν από περίπου 1,8 εκατομμύρια χρόνια (Εικόνα 3.6.Β). Τέλος, το σχήμα του στόματος καθορίζεται κυρίως από τη φυλογένεση και εδώ όταν λέμε φυλογένεση εννοούμε τη διαφοροποίηση των πληθυσμών μεταξύ τους (Εικόνα 3.11.Γ) είναι δηλαδή ένα χαρακτηριστικό που διαμορφώθηκε πρόσφατα.

Το ερώτημα που παραμένει είναι αν η προς νότο μετάβαση των ειδών συνοδεύτηκε από κάποια αντίστοιχη διαφοροποίηση τους σε επίπεδο φυσιολογικών προσαρμογών, αν δηλαδή τα είδη που κατανέμονται πιο βόρεια (και είναι και τα πιο παλιά διαφοροποιημένα) διαφέρουν στις φυσιολογικές τους προσαρμογές σε σχέση με τα είδη που κατανέμονται πιο νότια (και είναι και τα πιο πρόσφατα διαφοροποιημένα). Στο κομμάτι των φυσιολογικών προσαρμογών (κεφάλαιο 4) μελετήθηκαν τρία από τα επτά κατ' όνομα είδη (συνολικά όμως στις αναλύσεις συμπεριλήφθηκαν 4 είδη καθώς υπήρχαν διαθέσιμα από τη βιβλιογραφία συγκρίσιμα δεδομένα για ένα ακόμη είδος (Giokas *και συν.*, 2007)), τα οποία κατανέμονται σε έναν νοητό άξονα βορρά προς νότο σε όλη την περιοχή εξάπλωσης του γένους.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται ότι διακρίνονται οι περίοδοι δραστηριότητας από αυτές της διάπαυσης (ο χειμώνας αλλά κυρίως το καλοκαίρι), όχι μόνο σε επίπεδο συμπεριφοράς (επιλογή καταφυγίου για τη διάπαυση, σχηματισμός επιφράγματος κλπ, βλ. κεφάλαια 1 και 4), αλλά και σε επίπεδο φυσιολογικών προσαρμογών. Φαίνεται να υπάρχει όμως μία ιδιαιτερότητα σε αυτό το πρότυπο, φαίνεται ότι ο χειμώνας, παρά το ότι είναι περίοδος μη δραστηριότητας, μοιάζει περισσότερο με περίοδο δραστηριότητας (άνοιξη και φθινόπωρο) παρά με τη θερινή διάπαυση. Το παραπάνω προκύπτει από το γεγονός ότι το χειμώνα σε αντίθεση με το καλοκαίρι, δεν αυξάνεται η δραστικότητα του ενζύμου LDH (Εικόνες 4.5.Δ, 4.7.Δ και 4.8.Δ) και δεν μειώνεται η συγκέντρωση των λιπιδίων, του γλυκογόνου και των πρωτεϊνών (Εικόνες 4.5, 4.7 και 4.8).

Πιο αναλυτικά, το γλυκογόνο συσσωρεύεται πριν τη διάπαυση και καταναλώνεται στη συνέχεια (καλοκαίρι) (Εικόνες 4.5) όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη χερσαίων σαλιγκαριών (Giokas *και συν.*, 2007; Giokas *και συν.*, 2005; Kotsakiozi *και συν.*, 2012a). Το γλυκογόνο είναι ο πρώτος μεταβολίτης που καταναλώνεται για την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάπαυση και μόνο μετά την κατανάλωση αυτού αρχίζει ο καταβολισμός των πρωτεϊνών (Rees & Hand, 1993). Τα μειωμένα επίπεδα γλυκογόνου (Εικόνες 4.5, 4.7 και 4.8) την άνοιξη (κυρίως στο αναπαραγωγικό) σχετίζονται με τη διαδικασία της αναπαραγωγής, που είναι μια

αρκετά ενεργοβόρα (Hadjicharalambous, 1996). Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι κατά τη διάπαυση η συγκέντρωση του γλυκογόνου δεν πέφτει σε ιδιαιτέρως χαμηλά επίπεδα (Εικόνες 4.5, 4.7 και 4.8) και αυτό οφείλεται στη μείωση του μεταβολικού ρυθμού, έχει βρεθεί, σε άλλο είδος (*Helix aspersa*), ότι μετά από 90 ημέρες διάπαυσης, η συγκέντρωση του γλυκογόνου και της γλυκόζης σταθεροποιούνται γεγονός που δείχνει και την έναρξη του υπομεταβολισμού (Borges *και συν.*, 2004).

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών βρίσκεται γενικά σε χαμηλά επίπεδα κατά τις περιόδους που τα ζώα δεν είναι ενεργά (καλοκαίρι-για όλα τα είδη και χειμώνας για τα *C. eucineta* και *C. intusplicata*), αυτό εξηγείται εν μέρει από τη μειωμένη σύνθεση των πρωτεϊνών κατά τις περιόδους υπομεταβολισμού (διάπαυση/ διαχείμαση) καθώς είναι γνωστό, για άλλα είδη χερσαίων σαλιγκαριών, ότι ο ρυθμός σύνθεσης πρωτεϊνών μειώνεται κατά τη διάπαυση (Pakay *και συν.*, 2002; Ramnanan *και συν.*, 2009). Επιπλέον, η μείωση των πρωτεϊνών κατά τη διάπαυση είναι πολύ πιθανό να σχετίζεται κυρίως με τις αυξημένες απαιτήσεις για σύνθεση ουρίας (για τη διατήρηση του υδατικού περιεχομένου) και δευτερευόντως με την παραγωγή ενέργειας, όπως φαίνεται να συμβαίνει και στην περίπτωση του *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007).

Το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των λιπιδίων είναι παρόμοιο με αυτό της μεταβολής των πρωτεϊνών. Παρατηρείται αύξηση των λιπιδίων πριν τη διάπαυση και μείωση κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού για στηριχθεί ο μεταβολισμός κατά την περίοδο αυτή. Έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη χερσαίων σαλιγκαριών ότι κατά τη διάπαυση και μετά την κατανάλωση του γλυκογόνου, τα ζώα καταφεύγουν στη διάσπαση των λιπιδίων προκειμένου να αποκτήσουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση τους (Kotsakiozi *και συν.*, 2012a; Stuart *και συν.*, 1998). Τέλος, η μείωση των λιπιδίων στο γεννητικό την άνοιξη οφείλεται και σε αυτή την περίπτωση στην αναπαραγωγική διαδικασία, καθώς και για άλλα χερσαία σαλιγκάρια αναφέρεται ότι συνήθως χρησιμοποιούν τα λίπη για να στηρίξουν την αναπαραγωγή (Borges *και συν.*, 2004).

Όλα τα είδη που μελετήθηκαν αυξάνουν τη δραστικότητα της LDH κατά τη θερινή διάπαυση που αποτελεί ένδειξη ότι τα ζώα, βασίζουν τουλάχιστον κατά ένα μέρος, την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάπαυση σε αναερόβιες διαδικασίες. Ο μεταβολισμός στα χερσαία σαλιγκάρια κατά τη διάπαυση θεωρείται αερόβιος με μικρή συμμετοχή αναερόβιων μονοπατιών (Brooks & Storey, 1997a; Brooks & Storey, 1997b; Michaelidis, 2002; Rees & Hand, 1990) και συνήθως δεν δείχνουν αυξημένα επίπεδα ενεργότητας LDH καθώς οξειδώνουν πλήρως τους υδατάνθρακες (Brooks & Storey, 1997a; Brooks & Storey, 1997b; Churchill & Storey, 1989). Ωστόσο,

υπάρχουν πολλά δεδομένα που υποστηρίζουν τη σημασία των αναερόβιων μονοπατιών στην παραγωγή ενέργειας κατά τη διάπαυση (Michaelidis, Rofalikou & Grieshaber, 1999; Wieser, 1978; Wieser & Wright, 1978; Wieser & Wright 1979) και παρόμοιο πρότυπο έχει βρεθεί και σε άλλα σαλιγκάρια της Ελλάδας (Giokas *και συν.*, 2005; Kotsakiozi *και συν.*, 2012a). Μάλιστα, το πρότυπο μεταβολή της δραστικότητας της LDH μέσα στο χρόνο βρέθηκε ότι δεν οφείλεται στις διακυμάνσεις του υδατικού περιεχομένου των ιστών και άρα πρόκειται για πραγματική αύξηση της δραστικότητας κατά τη διάπαυση (Εικόνα 4.4). Επίσης ελέγχθηκε αν υπάρχει κάποια σχέση ανάμεσα στα επίπεδα της LDH και του νερού γενικά για όλα τα είδη και ανεξάρτητα από την εποχή της μέτρησης (Εικόνα 4.16) και βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική σχέση που σημαίνει ότι όταν αυξάνεται η ενεργότητα του ενζύμου παράλληλα μειώνεται και το υδατικό περιεχόμενο των ιστών, ανεξάρτητα από το είδος και την εποχή που γίνεται η μέτρηση.

Το υδατικό περιεχόμενο των ιστών στο *C. helenae* (Giokas *και συν.*, 2007) φαίνεται να μειώνεται κατά τη θερινή διάπαυση, αλλά παραμένει σε σταθερά επίπεδα καθ΄όλη τη διάρκεια του έτους στα τρία άλλα είδη *Codringtonia* που μελετήθηκαν, πράγμα που δείχνει ότι το πρότυπο της απώλειας νερού που καταγράφηκε στο *C. helenae* δεν αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των ειδών *Codringtonia.*

Αυτή η δυσαρμονία στα αποτελέσματα ως προς τη διατήρηση του νερού στα είδη *Codringtonia,* επαναξιολογήθηκε με μέτρηση του ρυθμού απώλειας νερού σε όλα τα είδη, κάτω από ακραίες αλλά σταθερές εργαστηριακές συνθήκες και φάνηκε ότι όντως το *C. helenae,* για κάποιο λόγο εμφανίζει υψηλότερο ρυθμό απώλειας νερού (ως ποσοστό του αρχικού βάρους που χάθηκε ανά λεπτό) σε σχέση με τα άλλα είδη. Προς ερμηνεία του ευρήματος αυτού, διατυπώθηκαν αρκετές υποθέσεις (βλ. κεφάλαιο 4) όπως ότι παίζει κάποιο ρόλο το μέγεθος του σώματος, το μικροενδιαίτημα κλπ, αλλά καμία δεν μπορεί να υιοθετηθεί με ασφάλεια είτε λόγω έλλειψης δεδομένων είτε γιατί μπορεί να απαντήσει στο γιατί είδη με παρόμοια χαρακτηριστικά δεν εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά. Αναγκαστικά λοιπόν καταφύγαμε σε δύο εκδοχές για να ερμηνεύσουμε αυτή τη συμπεριφορά. Η πρώτη αφορούσε τη μορφολογία του κελύφους (βλ. κεφάλαιο 3) και ελέγχθηκαν διάφορα χαρακτηριστικά του κελύφους (βλ. μετρήσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο κεφάλαιο 3) με τον ρυθμό απώλειας νερού και καμία δεν έδειξε στατιστικά ισχυρή συσχέτιση. Βέβαια πρέπει να σημειωθεί ότι όταν ελέγχθηκε η ύπαρξη σχέσης ανάμεσα στον ρυθμό απώλειας νερού και την αναλογία MD/MH που αντιπροσωπεύει το σχήμα ανοίγματος, φάνηκε να υπάρχει η τάση τα είδη με πιο ελλειψοειδές σχήμα ανοίγματος

όπως είναι το να *C. helenae* και το *C. intusplicata* να εμφανίζουν και υψηλότερο ρυθμό απώλειας νερού (R^2=0,244 και p=0,319) όπως επίσης το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα προκύπτει και όταν ελεγχθεί η ύπαρξη σχέσης ανάμεσα στον ρυθμό απώλειας νερού και την αναλογία BD/MH (μικρή διάμετρος κελύφους/ ύψος στόματος) (R^2=0,285 και p=0,275) αλλά και στις δύο περιπτώσεις οι σχέσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές γιατί το *C. helenae* δείχνει ασυνήθιστα υψηλό ρυθμό απώλειας νερού σε σχέση με αυτό που θα περίμενε κανείς με βάση τη μορφολογία του ανοίγματος. Το δεύτερο σενάριο που ελέγχθηκε ήταν αν ο πληθυσμός έχει χάσει ένα μέρος της πλαστικότητας του για γενετικούς λόγους, δηλαδή αρχικά είχε μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα και επομένως και μεγαλύτερη πλαστικότητα στη διαχείριση του υδατικού περιεχομένου, στη συνέχεια χάθηκε ένα μέρος αυτής της ποικιλότητας του πληθυσμού (πληθυσμιακή στενωπός), και επομένως έμειναν στον πληθυσμό άτομα που δεν μπορούν αντιμετωπίζουν προβλήματα στη διατήρηση του νερού. Έτσι λοιπόν χρησιμοποιώντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που πήραμε για την επίλυση της φυλογένεσης (κεφάλαιο 2), προχωρήσαμε σε μια απλή ανάλυση πληθυσμιακής γενετικής, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν ότι ούτε το σενάριο της πληθυσμιακής στενωπού μπορεί να εξηγήσει την ιδιομορφία του *C. helenae* σε σχέση τα άλλα είδη.

Μεταξύ των ειδών παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα των διαφόρων παραμέτρων που μετρήθηκαν (Εικόνες 4.9-4.12), το ερώτημα είναι αν οι διαφορές αυτές οφείλονται στο ότι ζουν σε διαφορετικές περιοχές και άρα έρχονται σε επαφή με διαφορετικές κλιματικές συνθήκες ή οφείλεται απλά στο ότι πρόκειται για διαφορετικά είδη και άρα είναι λογικό να διαφέρουν μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι οι ακριβείς συντεταγμένες της περιοχής δειγματοληψίας (γεωγρ. μήκος και γεωγρ. πλάτος και υψόμετρο) περιγράφουν στις περισσότερες περιπτώσεις το πρότυπο της μεταβολής των παραμέτρων αυτών ανάμεσα στα διαφορετικά είδη (Πίνακας 4.10) και μάλιστα επαναλήφθηκαν οι αναλύσεις λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών οι σχέσεις αυτές συνέχισαν να είναι εμφανείς. Το γεγονός ότι για τις περισσότερες περιπτώσεις (αλλά κυρίως για τη δραστικότητα της LDH) οι διαφορές που παρατηρούνται στη στα 4 είδη *Codringtonia* (καθ΄όλη τη διάρκεια του έτους), ερμηνεύονται κατά ένα μέρος από τις διαφορές των κλιματικών συνθηκών (ετήσια και εποχική θερμοκρασία και ποσό κατακρημνίσεων) στις περιοχές δειγματοληψίας (Πίνακες 4.11-4.13), δείχνει ότι τα πρότυπα μεταβολής των παραμέτρων αυτών είναι προσαρμοστικά χαρακτηριστικά και συνδέονται με την κατάσταση των ζώων (διάπαυση, διαχείμαση, δραστηριότητα),

πράγμα που είναι αναμενόμενο καθώς η κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα ζώα, εξαρτάται άμεσα από τις κλιματικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής (τα ζώα εισέρχονται στη διάπαυση όταν οι κλιματικές συνθήκες γίνονται αντίξοες π.χ. χαμηλή διαθεσιμότητα νερού).

Τέλος, μετρήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Hsp70) σε όλα τα είδη *Codringtonia* όταν αυτά εκτίθενται σε ακριβώς τις ίδιες (ακραίες) συνθήκες αφυδάτωσης. Σε όλα τα είδη η έκφραση Hsp70 αυξάνεται σε όλα (Πίνακας 4.15) αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρείται μόνο σε 4 από τα 6 είδη σε επίπεδο mRNA και σε κανένα είδος σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η αύξηση Hsp70 είναι αναμενόμενη καθώς, η έκφραση τους επάγεται κάτω από διάφορες συνθήκες στρες όπως είναι και η έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία και η αφυδάτωση (Benoit *και συν.*, 2010). Μάλιστα, όσο μεγαλύτερη ήταν η αφυδάτωση που υπέστη το κάθε άτομο (απώλεια νερού ως ποσοστό του αρχικού βάρους) τόσο υψηλότερα είναι και τα επίπεδα των Hsp70 (Εικόνα 4.19) και αυτή η γραμμική σχέση συνεχίζει να υπάρχει ακόμη, και μάλιστα έγινε ακόμη πιο ισχυρή, όταν η ανάλυση επαναλήφθηκε λαμβάνοντας υπ' όψιν και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών (Πίνακας 4.17). Η γραμμικότητα της σχέσης αυτής είναι λογική καθώς αναμένεται όσο πιο μεγάλο είναι το αποτέλεσμα της έκθεσης (στρες), δηλαδή η απώλεια νερού τόσο να αυξάνεται και η απόκριση των ατόμων στο στρες. Αύξηση των επιπέδων έκφρασης Hsp70 ως απόκριση στην αφυδάτωση έχει αναφερθεί επίσης και σε άλλα είδη οργανισμών (Benoit *και συν.*, 2010; Benoit *και συν.*, 2009; Hayward *και συν.*, 2004; Lopez-Martinez *και συν.*, 2009) καθώς είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή των οργανισμών στην αφυδάτωση (Benoit *και συν.*, 2010).

Σε δια-ειδικό επίπεδο, δεν φάνηκε να υπάρχουν διαφορές ως προς την έκφραση των Hsp70 (Εικόνα 4.19) ανάμεσα στα διαφορετικά είδη *Codringtonia*, όπως δεν παρατηρηθήκαν διαφορές και στον ρυθμό απώλειας νερού σε δια-ειδικό επίπεδο (εξαίρεση το *C. helenae*) και μάλιστα είναι παράξενο το ότι ενώ το συγκεκριμένο είδος φαίνεται να υφίσταται τις μεγαλύτερες απώλειες σε νερό δεν εμφανίζει στατιστικά υψηλότερα επίπεδα Hsp70 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (οριακά μη σημαντικές διαφορές). Πιθανόν η αφυδάτωση που υπέστη το είδος αυτό είναι αρκετά σοβαρότερη σε σχέση με αυτή των άλλων ειδών με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται οι κυτταρικοί μηχανισμοί που προλαμβάνουν τον κυτταρικό θάνατο και η αύξηση της σύνθεσης Hsp70 θα κόστιζε περισσότερο από το όφελος που θα επέφερε. Σε τέτοιες περιπτώσεις το κόστος υπερκαλύπτει το όφελος από την αύξηση των Hsp70 (Morris *και συν.*, 2013) και όλη η διαθέσιμη ενέργεια διοχετεύεται στην κυτταρική επιβίωση.

Οι οργανισμοί όμως εκφράζουν τις Hsp70 ακόμη και χωρίς να προηγηθεί κάποιου είδους στρες, όταν πραγματοποιήθηκε σύγκριση αυτών των ενδογενών επιπέδων Hsp70 μεταξύ των ειδών δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ειδών αλλά παρατηρείται μια τάση (Εικόνα 3.16.Δ) τα είδη που κατανέμονται νοτιότερα να έχουν και υψηλότερα ενδογενή επίπεδα Hsp70. Πράγματι φάνηκε να υπάρχει αρνητική γραμμική μεταξύ των ενδογενών επιπέδων Hsp70 και του υψομέτρου, του γεωγρ. πλάτους αλλά και του ποσού των κατακρημνίσεων του καλοκαιριού (Εικόνα 4.20). Αυτό σημαίνει ότι τα είδη που κατανέμονται σε πιο «ξηρές» και ζεστές περιοχές έχουν την τάση να εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα Hsp70 χωρίς να υποστούν την επίδραση κάποιου στρεσογόνου παράγοντα, σε σχέση με είδη που κατανέμονται βορειότερα ή σε περιοχές μεγαλύτερου υψομέτρου. Επίσης όταν ληφθούν υπ' όψιν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών, παραμένει η γραμμική αρνητική σχέση μεταξύ των Hsp70 και του υψομέτρου αλλά και του ποσού των θερινών κατακρημνίσεων και μάλιστα γίνεται ισχυρότερη από πριν (Πίνακας 4.17). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση των Hsp διαφέρει ανάμεσα σε είδη που ζουν σε περιβάλλοντα με διαφορετικές συνθήκες και συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι διάφορα είδη που ζουν σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες θερμοκρασίες έχουν σχετικά αυξημένα επίπεδα Hsp στα κύτταρα τους ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, έτσι είναι συνεχώς «προετοιμασμένα» για τη ζωή υπό συνθήκες υπερθερμίας χωρίς να χρειάζονται δραστικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων τους (Engenev, 2007).

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω τα ***βασικά συμπεράσματα*** που προκύπτουν από τη μελέτη αυτή είναι ότι*:*

- Τα είδη *Codringtonia* διαφοροποιούνται στην Ελλάδα τα τελευταία 4,56 εκ. χρόνια.
- Το *C. neocrassa* πιθανόν ανήκει σε άλλο γένος.
- Τα *C. elisabethae* και *C. gittenbergeri* αποτελούν έναν μονοφυλετικό κλάδο και εμφανίζουν μικρή μορφολογική διαφοροποίηση στο κέλυφος, δημιουργείται λοιπόν το ερώτημα αν είναι πιθανό να πρόκειται για ένα είδος.
- Σκεπτόμενοι τις ασυμφωνίες ανάμεσα στη φυλογένεση και την υπάρχουσα συστηματική κατάταξη των ειδών συμπεραίνουμε ότι απαιτείται συστηματική αναθεώρηση του γένους.
- Η προγονική περιοχή εξάπλωσης προσδιορίζεται να ήταν η κεντρική Στερεά Ελλάδα.

- Η διαφοροποίηση στην Πελοπόννησο έγινε μέσω διασποράς (κυρίως) καθώς και βικαριανισμού.
- Καθώς τα είδη εξαπλώνονταν προς τα νότια αυξανόταν παράλληλα και το μέγεθος του κελύφους τους.
- Η εξέλιξη του μεγέθους του κελύφους ακολούθησε ομαλή διαφοροποίηση από τα πιο παλιά κλαδογενετικά γεγονότα (επίπεδο ειδών) στα πιο πρόσφατα (επίπεδο πληθυσμών) ενώ το σχήμα του κελύφους και του ανοίγματος διαφοροποιούνται κυρίως κατά τα πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα (κυρίως σε επίπεδο πληθυσμών).
- Η διαφοροποίηση στο μέγεθος του κελύφους ερμηνεύεται κυρίως από τον συνδυασμό κλιματικών και χωρικών μεταβλητών καθώς και της φυλογένεσης ενώ το σχήμα του ανοίγματος ερμηνεύεται κυρίως από τη φυλογένεση (και μάλιστα καθορίστηκε πρόσφατα). Αυτό σημαίνει ότι το μέγεθος του κελύφους καθορίστηκε από συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων ενώ το σχήμα του ανοίγματος, κατά ένα μεγάλο μέρος τουλάχιστον είναι φυλογενετικά περιορισμένος χαρακτήρας.
- Το πρότυπο μεταβολής των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του γλυκογόνου μέσα στο χρόνο, καθώς της δραστικότητας της LDH «αντικατοπτρίζουν» την κατάσταση των ζώων (ενεργή-μη ενεργή).
- Σε όλα τα είδη η δραστικότητα της LDH αυξάνεται κατά τη θερινή διάπαυση που σημαίνει ότι ο μεταβολισμός κατά τη διάπαυση κατά ένα μέρος στηρίζεται σε αναερόβια μονοπάτια.
- Η χειμερινή διάπαυση ομοιάζει περισσότερο με τις περιόδους δραστηριότητας παρά με τη θερινή διάπαυση.
- Οι δια-ειδικές διαφορές στα επίπεδα των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και στη δραστικότητα της LDH, ερμηνεύονται κατά ένα μέρος τουλάχιστον, από τις διαφορές των κλιματικών συνθηκών στις περιοχές μελέτης.
- Η απώλεια νερού κατά τη θερινή διάπαυση (στο *C. helenae)* δεν αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των ειδών *Codringtonia*.
- Η έλλειψη πλαστικότητας του *C. helenae* στη διατήρηση του νερού δεν μπορεί να ερμηνευτεί με βάση γενετικούς παράγοντες (π.χ. πληθυσμιακή στενωπός).
- Η απώλεια νερού προκαλεί αναλογικά αύξηση των επιπέδων Hsp70 (πράγμα που είναι πιο εμφανές μετά την αφαίρεση της επίδρασης της φυλογένεσης από τις μετρήσεις).

- Παρά το ότι καταγράφονται διαφορές ανάμεσα στα είδη ως προς τον ρυθμό απώλειας νερού δεν υπάρχουν δια-ειδικές διαφορές στην έκφραση Hsp70.
- Τα ενδογενή επίπεδα Hsp70 σχετίζονται αρνητικά με το υψόμετρο και τις κατακρημνίσεις του καλοκαιριού και οι σχέσεις αυτές ενισχύονται μετά την αφαίρεση της φυλογένεσης, επομένως υπάρχουν ενδείξεις ότι πρόκειται για προσαρμοστικό χαρακτηριστικό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Abouheif E. 1999.** A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative data. *Evolution Ecology Research* **1:** 895-909.
2. **Ackerly DD. 2004.** Adaptation, niche conservatism, and convergence: Comparative studies of leaf evolution in the California chaparral. *American Naturalist* **163:** 654-671.
3. **Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. 2004.** Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* **71:** 5 - 16.
4. **Aggeli I-KS, Gaitanaki C, Lazou A, Beis I. 2001.** Activation of multiple MAPK pathways (ERKs, JNKs, p38-MAPK) by diverse stimuli in the amphibian heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* **221:** 63-69.
5. **Akaike H. 1974.** New look at statistical-model identification. *Ieee Transactions on Automatic Control* **Ac19:** 716-723.
6. **Al-kahtani MA, Zuleta C, Caviedes-Vidal E, Garland T. 2004.** Kidney mass and relative medullary thickness of rodents in relation to habitat, body size, and phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology* **77:** 356-365.
7. **Alexis MN, Papaparaskeva-Papoutsoglou E, Theochari V. 1985.** Formulation of practical diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) made by partial or complete substitution of fish meal by poultry by-products and certain plant by-products. *Aquaculture* **50:** 61-73.
8. **Allaby M. 1991.** *Dictionary of Zoology*. Oxford University Press: Oxford.
9. **Alonso MR, Alcantara L, Rivas P, Ibanez M. 1985.** A biogeographic study of *Iberus gualterianus* (L.) (Pulmonata: Helicidae). *Soosiana* **13:** 1-10.
10. **Alonso MR, Goodacre SL, Emerson BC, Ibanez M, Hutterer R, Groh K. 2006.** Canarian land snail diversity: conflict between anatomical and molecular data on the phylogenetic placement of five new species of *Napaeus* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **89:** 169-187.
11. **Anderson MJ. 2006.** Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics* **62:** 245-253.
12. **Arad Z. 1993.** Water relations and resistance to desiccation in 3 Israeli desert snails, *Eremina desertorum*, *Euchondrus desertorum* and *Euchondrus albulus*. *Journal of Arid Environments* **24:** 387-395.
13. **Arad Z. 2001.** Desiccation and rehydration in land snails – a test for distinct set points in *Theba pisana*. *Israel Journal of Zoology*: 41-53.
14. **Arad Z, Avivi TR. 1998.** Ontogeny of resistance to desiccation in the bush-dwelling snail *Theba pisana* (Helicidae). *Journal of Zoology* **244:** 515-526.
15. **Arad Z, Goldenberg S, Heller J. 1995.** Water balance and resistance to desiccation in rock-dwelling snails. *International Journal of Biometeorology* **38:** 78-83.
16. **Ashton KG. 2004.** Comparing phylogenetic signal in intraspecific and interspecific body size datasets. *Journal of Evolutionary Biology* **17:** 1157-1161.
17. **Autumn K, Ryan MJ, Wake DB. 2002.** Integrating historical and mechanistic biology enhances the study of adaptation. *Quarterly Review of Biology* **77:** 383-408.
18. **Avise J. 1994.** *Molecular Markers. Natural History and Evolution.* Chapman & Hall: New York.

19. **Ballard JWO, Whitlock MC. 2004.** The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13:** 729-744.
20. **Bardají T, Goy JL, Zazo C, Hillaire-Marcel C, Dabrio CJ, Cabero A, Ghaleb B, Silva PG, Lario J. 2009.** Sea level and climate changes during OIS 5e in the Western Mediterranean. *Geomorphology* **104:** 22-37.
21. **Barnhart MC. 1983.** Gas permeability of the epiphragm of a terrestrial snail. *Physiological Zoology* **53:** 436-444.
22. **Barnhart MC, Mcmahon BR. 1987.** Discontinuous Carbon-Dioxide Release and Metabolic Depression in Dormant Land Snails. *Journal of Experimental Biology* **128:** 123-138.
23. **Barton K. 2013.** Package 'MuMIn'. Available from: http://r-forge.r-project.org/projects/mumin/.
24. **Bazin E, Glemin S, Galtier N. 2006.** Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* **312:** 570-571.
25. **Benoit JB, Lopez-Martinez G, Phillips ZP, Patrick KR, Denlinger DL. 2010.** Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. *Journal of Insect Physiology* **56:** 151-156.
26. **Benoit JB, Lopez-Martinez G, Teets NM, Phillips SA, Denlinger DL. 2009.** Responses of the bed bug, *Cimex lectularius*, to temperature extremes and dehydration: levels of tolerance, rapid cold hardening and expression of heat shock proteins. *Medical and Veterinary Entomology* **23:** 418-425.
27. **Berenbrink M, Koldkjær P, Kepp O, Cossins AR. 2005.** Evolution of oxygen secretion in fishes and the emergence of a complex physiological system. *Science* **307:** 1752-1757.
28. **Bettencourt BR, Kim IY, Hoffmann AA, Feder ME. 2002.** Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila* hsp70 genes. *Evolution* **56:** 1796-1801.
29. **Blomberg SP, Garland T. 2002.** Tempo and mode in evolution: Phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. *Journal of Evolutionary Biology* **15:** 899-910.
30. **Blomberg SP, Garland T, Ives AR. 2003.** Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* **57:** 717-745.
31. **Blondel J, Aronson J. 1999.** *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*. Oxford University Press: Oxford.
32. **Bookstein FL. 1991.** *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press: Cambridge.
33. **Bookstein FL. 1998.** A hundred years of morphometrics. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **44:** 7-59.
34. **Borcard D, Legendre P. 2002.** All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling* **153:** 51-68.
35. **Borcard D, Legendre P, Avois-Jacquet C, Tuomisto H. 2004.** Dissecting the spatial structure of ecological data at multiple scales. *Ecology* **85:** 1826-1832.
36. **Borges E, Vuaden FC, Cognato GD, Fauth MD, Bonan CD, Turcato G, Rossi ICD, Dias RD. 2004.** Effects of starvation on haemolymphatic glucose levels, glycogen contents and nucleotidase activities in different tissues of *Helix aspersa* (Muller, 1774) (Mollusca, Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology* **301A:** 891-897.
37. **Bromham L, Phillips MJ, Penny D. 1999.** Growing up with dinosaurs: molecular dates and the mammalian radiation. *Trends in Ecology and Evolution* **14:** 113-118.

38. **Brooks SPJ, Storey KB. 1997a.** Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **118:** 1103-1114.
39. **Brooks SPJ, Storey KB. 1997b.** Glycolytic enzyme binding in *Otala lactea* hepatopancreas: effect of taxol, colchicine and cytochalasin B and D on the in vivo enzyme distribution. *Biochemistry and Molecular Biology International* **41:** 841-849.
40. **Brown W, Prager E, Wang A, Wilson A. 1982.** Mitochondrial DNA sequences of Primates: Tempo and mode of Evolution. *Journal of Molecular Evolution* **18:** 225-239.
41. **Brundin L. 1966.** Transantarctic relationships and their significance, as evidenced by chironomid midges: with a monograph of the subfamilies *Podonominae* and *Aphroteniinae* and the Austral Heptagyiae. *Kungl. Svenska Vetenskapsakad. Handl.* **11:** 1-472.
42. **Buckley TR, Stringer I, Gleeson D, Howitt R, Attanayake D, Parrish R, Sherley G, Rohan M. 2011.** A revision of the New Zealand *Placostylus* land snails using mitochondrial DNA and shell morphometric analyses, with implications for conservation. *New Zealand Journal of Zoology* **38:** 55-81.
43. **Burla H. 1984.** Induced environmental variation in *Arianta arbustorum* (L.). *Genetica* **64:** 65-67.
44. **Cain AJ, Cowie RH. 1978.** Activity of different species of land-snail on surfaces of different inclinations. *Journal of Conchology* **29:** 267-272.
45. **Cameron RAD, Cook LM. 1989.** Shell size and shape in Madeiran land snails: do niches remain unfilled? *Biological Journal of the Linnean Society* **36:** 79-96.
46. **Cameron RAD, Cook LM, Gao G. 1996.** Variation in snail species widespread on Porto Santo, Madeiran archipelago. *Journal of Molluscan Studies* **62:** 143-150.
47. **Chiba S. 1996.** Ecological and morphological diversification within single species and character displacement in *Mandarina*, endemic land snails of the Bonin Islands. *Journal of Evolutionary Biology* **9:** 277-291.
48. **Chiba S. 1999.** Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the oceanic Bonin Islands: Evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* **53:** 460-471.
49. **Chiba S, Kaustuv R. 2011.** Selectivity of terrestrial gastropod extinctions on an oceanic archipelago and insights into the anthropogenic extinction process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
50. **Churchill TA, Storey KB. 1989.** Intermediary energy-metabolism during dormancy and anoxia in the land snail *Otala lactea*. *Physiological Zoology* **62:** 1015-1030.
51. **Cook A. 2001.** Behavioural ecology: on doing the right thing, in the right place at the right time. In: Barke GM, ed. *The biology of terrestrial molluscs*. Oxford: CABI Publishing. 447-487.
52. **Cook LM, Jaffar WN. 1984.** Spire index and preferred surface orientation in some land snails. *Biological Journal of the Linnean Society* **21:** 307-313.
53. **De Weerd DRU, Piel WH, Gittenberger E. 2004.** Widespread polyphyly among Aloplinae snail genera: when phylogeny mirrors biogeography more closely than morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33:** 533-548.
54. **De Weerd DRU, Schneider D, Gittenberger E. 2005.** The provenance of the Greek land snail species *Isabellaria pharsalica*: molecular evidence of

recent passive long-distance dispersal. *Journal of Biogeography* **32:** 1571-1581.
55. **Desalle R. 1992.** The phylogenetic relationships of flies in the family Drosophilidae deduced from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **1:** 31-40.
56. **Desalle R, Freedman T, Prager EM, Wilson AC. 1987.** Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* **26:** 157-164.
57. **Díaz-Uriarte R, Garland T. 1996.** Testing hypotheses of correlated evolution using phylogenetically independent contrasts: sensitivity to deviations from Brownian motion. *Systematic Biology* **45:** 27-47.
58. **DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S. 1982.** The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* **31:** 593-603.
59. **Diniz-Filho JAF, De Sant' Ana CER, Bini LM. 1998.** An eigenvector method for estimating phylogenetic inertia. *Evolution* **52:** 1247-1262.
60. **Diniz-Filho JAF, Torres NM. 2002.** Phylogenetic comparative methods and the geographic range size-body size relationship in new world terrestrial carnivora. *Evolutionary Ecology* **16:** 351-367.
61. **Diniz Filho JAF, Rangel TF, Santos T, Bini LM. 2012.** Exploring patterns of interspecific variation in quantitative traits using sequential phylogenetic eigenvector regressions. *Evolution* **66:** 1079-1090.
62. **Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A. 2006.** Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* **4:** 699-710.
63. **Drummond AJ, Rambaut A. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by 722 sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7:** 214.
64. **Drummond AJ, Rambaut A. 2009.** Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. In: Lemey P, Salemi M and Vandamme A-M, eds. *The phylogenetic handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. 2 ed. Cambridge: University Press. 564-590.
65. **Elejalde MA, Madeira MJ, Munoz B, Arrebola JR, Gomez-Moliner J. 2008.** Mitochondrial DNA diversity and taxa delineation in the land snails of the *Iberus qualterianus* (Pulmonata, Helicidae) complex. *Zoological Journal of the Linnean Society* **154:** 722-737.
66. **Elejalde MA, Munoz B, Arrebola JR, Gomez-Moliner BJ. 2005.** Phylogenetic relationships of *Iberus gualtieranus* and *I. alonensis* (Gastropoda : Helicidae) based on partial mitochondrial 16S rRNA and COI gene sequences. *Journal of Molluscan Studies* **71:** 349-355.
67. **Engenev M. 2007.** Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. *Journal of Biosciences* **32:** 489–499.
68. **Etheridge K. 1990.** Water balance in estivating sirenid salamanders (Siren lacertina). *Herpetologica* **46:** 400-406.
69. **Farris JS, Kallersjo M, Kluge AG, Bult C. 1995.** Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology* **44:** 570-572.
70. **Felsenstein J. 1985.** Phylogenies and the Comparative Method. *American Naturalist* **125:** 1-15.
71. **Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. 2003.** Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* **422:** 428-433.
72. **Fields JHA. 1992.** The effects of aestivation on the catalytic and regulatory properties of pyruvate kinase from *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **102B:** 77-82.

73. **Fiorentino V, Manganelli G, Giusti F, Tiedemann R, Ketmaier V. 2013.** A question of time: the land snail *Murella muralis* (Gastropoda: Pulmonata) reveals constraints on past ecological speciation. *Molecular Ecology* **22:** 170-186.
74. **Fiorentino V, Salomone N, Manganelli G, Giusti F. 2008.** Phylogeography and morphological variability in land snails: the Sicilian *Marmorana* (Pulmonata, Helicidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **94:** 809-823.
75. **Fisher RA. 1935.** The logic of inductive inference. *Journal of the Royal Statistical Society* **98:** 39-82.
76. **Flick MJ, Konieczny SF. 2002.** Identification of putative mammalian D lactate dehydrogenase enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **295:** 910-916.
77. **Freckleton RP. 2009.** The seven deadly sins of comparative analysis. *Journal of Evolutionary Biology* **22:** 1367-1375.
78. **Freckleton RP, Harvey PH, Pagel M. 2002.** Phylogenetic Analysis and Comparative Data: A Test and Review of Evidence. *The American Naturalist* **160:** 712-726.
79. **Freeman S, Herron JC. 2007.** *Evolutionary analysis*. Pearson Education, Inc.: USA.
80. **Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GDD. 2009.** Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* **18:** 4541-4550.
81. **Garland T, Adolph SC. 1994.** Why not to do two-species comparative studies: limitations on inferring adaptation. . *Physiological Zoology* **67:** 797-828.
82. **Garland T, Bennett JAF, Rezende EL. 2005.** Phylogenetic approaches in comparative physiology. *Journal of Experimental Biology* **208:** 3015-3035.
83. **Garland T, Carter PA. 1994.** Evolutionary Physiology. *Annual Review of Physiology* **56:** 579-621.
84. **Garland T, Dickerman AW, Janis CM, Jones JA. 1993.** Phylogenetic analysis of covariance by computer simulation. *Systematic Biology* **42:** 265-292.
85. **Garland T, Huey RB, F.Bennett A. 1991.** Phylogeny and thermal physiology in lizards: A reanalysis. *Evolution* **45:** 1969-1975.
86. **Garland T, Ives AR. 2000.** Using the Past to Predict the Present: Confidence Intervals for Regression Equations in Phylogenetic Comparative Methods. *The American Naturalist* **155:** 346-364.
87. **Gascuel O, Steel M. 2007.** *Reconstructing Evolution. New Mathematical and Computational Advances*. Oxford University Press: Oxford.
88. **Gething M-J, Sambrook J. 1992.** Protein folding in the cell. *Nature* **355:** 33-45.
89. **Giokas S, Karkoulis P, Pafilis P, Valakos E. 2007.** Relictual physiological ecology in the threatened land snail *Codringtonia helenae*: A cause for decline in a changing environment? *Acta Oecologica* **32:** 269-278.
90. **Giokas S, Pafilis P, Valakos E. 2005.** Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (Pulmonata : Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **71:** 15-23.
91. **Gissi C, Iannelli F, Pesole G. 2008.** Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* **101:** 301-320.

92. **Gittenberger E, Piel WH, Groenenberg DSJ. 2004.** The Pleistocene glaciations and the evolutionary history of the polytypic snail species *Arianta arbustorum* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30:** 64-73.
93. **Goodacre SL, Thomaz D, Davies EK. 2006.** Mitochondrial gene diversity in *Cepaea* - population structure, history and positive selection. *Biological Journal of the Linnean Society* **87:** 167-184.
94. **Goodacre SL, Wade CM. 2001.** Patterns of genetic variation in Pacific island land snails: the distribution of cytochrome b lineages among Society Island *Partula*. *Biological Journal of the Linnean Society* **73:** 131-138.
95. **Goodfriend GA. 1986.** Variation in land snail shell form and size and its causes: a review. *Systematic Zoology* **35:** 204-223.
96. **Goodman M. 1981a.** Decoding the pattern of protein evolution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **35:** 105-164.
97. **Goodman M. 1981b.** Globin evolution was apparently very rapid in early vertebrates. A reasonable case against the rate-constancy hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* **17:** 114-120.
98. **Grafen A. 1989.** The phylogenetic regression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **326:** 119-157.
99. **Grossman LI, Wildman DE, Schmidt TR, Goodman M. 2004.** Accelerated evolution of the electron transport chain in anthropoid primates. *Trends in Genetics* **20:** 578-585.
100. **Hadjicharalambous E. 1996.** Contribution to the study of the ecology and biology of the genus Codringtonia Kobelt, 1898 (Gastropoda, Pulmonata). Unpublished PhD, University of Athens.
101. **Hagelberg E. 1994.** Bone DNA typing for forensic identifiication. *Ancient DNA Newsletter* **2:** 9-10.
102. **Hardy OJ, Pavoine S. 2012.** Assessing phylogenetic signal with measurement error: a comparison of Mantel tests, Blomberg et al.'s K, and phylogenetic distograms. *Evolution* **66:** 2614-2621.
103. **Harris AJ, Xiang QY. 2009.** Estimating ancestral distributions of lineages with uncertain sister groups: a statistical approach to dispersal-vicariance analysis and a case using *Aesculus L.* (Sapindaceae) including fossils. *Journal of Systematic and Evolutionary* **47:** 349-368.
104. **Harvey PH, Pagel MD. 1991.** *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford University Press: Oxford.
105. **Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22:** 160-174.
106. **Hausdorf B. 2003.** Latitudinal and altitudinal body size variation among north-west European land snail species. *Global Ecology & Biogeography* **12:** 389–394.
107. **Hayward SAL, Rinehart JP, Denlinger DL. 2004.** Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. *Journal of Experimental Biology* **207:** 963-971.
108. **Heller J. 1987.** Shell shape and land-snail habitat in a Mediterranean and desert fauna. *Biological Journal of the Linnean Society* **31:** 257-272.
109. **Hennig W. 1966.** *Phylogenetic Systematics*. Univ. Ill. Press: Urbana.
110. **Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005.** WORLDCLIM - a set of global climate layers (climate grids). *International Journal of Climatology* **25:** 1965-1978.

111. **Hillis DM, Huelsenbeck JP. 1992.** Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetics analyses. *Journal of Heredity* **83:** 189-195.
112. **Hodges WL. 2004.** Evolution of viviparity in horned lizards (Phrynosoma): testing the cold climate hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology* **17:** 1230-1237.
113. **Hoffmann AA, Parsons PA. 1991.** *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press: New York.
114. **Holland BS, Cowie RH. 2007.** A geographic mosaic of passive dispersal: population structure in the endemic Hawaiian amber snail *Succinea caduca* (Mighels, 1845). *Molecular Ecology* **16:** 2422-2435.
115. **Holland BS, Hadfield MG. 2004.** Origin and diversification of the endemic Hawaiian tree snails (Achatinellidae : Achatinellinae) based on molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32:** 588-600.
116. **Holm S. 1979.** A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* **6:** 65-70.
117. **Hosken DJ, Jones KE, Chipperfield K, Dixson A. 2001.** Is the bat os penis sexually selected? *Behavioural Ecology Sociobiology* **50:** 450-460.
118. **Hotelling H. 1933.** Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* **25:** 417-441.
119. **Hugall A, Moritz C, Moussalli A, Stanisic J. 2002.** Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99:** 6112-6117.
120. **Hutcheon JM, Garland T. 2004.** Are megabats big? *Journal of Mammalian Evolution* **11:** 257-276.
121. **Hyman IT, Ho SYW, Jermiin LS. 2007.** Molecular phylogeny of Australian *Helicarionidae*, *Euconulidae* and related groups (Gastropoda : Pulmonata : Stylommatophora) based on mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **45:** 792-812.
122. **IUCN. 2012.** IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Downloaded on 30 April 2013. Available at www.iucnredlist.org.
123. **Ives AR, Midford PE, Garland T. 2007.** Within-species variation and measurement error in phylogenetic comparative methods. *Systematic Biology* **56:** 252-270.
124. **Johnson M. 2011.** Thirty-four years of climatic selection in the land snail *Theba pisana*. *Heredity* **106:** 741-748.
125. **Johnson MS, O'Brien EK, Fitzpatrick JJ. 2010.** Deep, hierarchical divergence of mitochondrial DNA in *Amplirhagada* land snails (Gastropoda: Camaenidae) from the Bonaparte Archipelago, Western Australia. *Biological Journal of the Linnean Society* **100:** 141-153.
126. **Jones R. 1980.** Metabolic consequences of accelerated urea synthesis during seasonal dormancy of spadefoot toads, *Scaphiopus couchii* and *Scaphiopus multiplicatus*. *Journal of Experimental Biology* **212:** 255-267.
127. **Jordaens K, Van Riel P, A.M. F, Backeljau T. 2009.** Speciation on the Azores islands: congruent patterns in shell morphology, genital anatomy, and molecular markers in endemic land snails (Gastropoda, Leptaxinae). *Biological Journal of the Linnean Society* **97:** 166-176.
128. **Jukes T, Cantor C. 1969.** Evolution of protein molecules. In: Munro M, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press. 21-132.

129. **Kappes H, Jordaens K, Houtte NV, Hendrickx F, Maelfait J-P, Lens L, Backeljau T. 2009.** A land snail's view of a fragmented landscape. *Biological Journal of the Linnean Society* **98:** 839-850.
130. **Kennett R, Christian K. 1994.** Metabolic depression in estivating long-neck turtles (*Chelodina rugosa*). *Physiological Zoology* **67:** 1087-1102.
131. **Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16:** 111-120.
132. **Klein-Rollais D, Daguzan J. 1990.** Variation of water content in *Helix aspersa* Muller in a natural environment. *Journal of Molluscan Studies* **56:** 9-15.
133. **Kornberg A. 1955.** Lactic dedydrogenase of muscle. In: Colowick SP and Kaplan NO, eds. *Methods of Enzymology*. New York and London: Academic Press. 705-707.
134. **Koštál V, Tollarová-Borovanská M. 2009.** The 70 kDa heat shock protein assists during repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PLoS One*: 1-8.
135. **Kotsakiozi P, Pafilis P, Giokas S, Valakos E. 2012a.** A comparison of the physiological responses of two land snail species with different distributional ranges. *Journal of Molluscan Studies*.
136. **Kotsakiozi P, Parmakelis A, Giokas S, Papanikolaou I, Valakos ED. 2012b.** Mitochondrial phylogeny and biogeographic history of the Greek endemic land-snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62:** 681-692.
137. **Laurin M. 2004.** The evolution of body size, Cope's Rule and the origin of amniotes. *Systematic Biology* **53:** 594-622.
138. **Layne E. 1957.** Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology* **10:** 447-455.
139. **Legakis A, Maragou P. 2009.** *The Red Data Book of the Threatened Animal Species of Greece*. Hellenic Zoological Society: Athens.
140. **Legendre P, Legendre L. 1998.** *Numerical ecology*. Elsevier Science BV: Amsterdam, Netherlands.
141. **Lewis PO. 1998.** A genetic algorithm for maximum-likelihood phylogeny inference using nucleotide sequence data. *Molecular Biology and Evolution* **15:** 277-283.
142. **Lopez-Martinez G, Benoit JB, Rinehart JP, Elnitsky MA, Lee REJ, Denlinger DL. 2009.** Dehydration, rehydration, and overhydration alter patterns of gene expression in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Comparative Physiology B* **179:** 481-491.
143. **Losos JB. 1999.** Uncertainty in the reconstruction of ancestral character states and limitations on the use of phylogenetic comparative methods. *Animal Behaviour* **58:** 1319-1324.
144. **Mace GM, Gittleman JL, Purvis A. 2003.** Preserving the tree of life. *Science* **300:** 1707-1709.
145. **Machin J. 1967.** Structural adaptation for reducing water-loss in three species of terrestrial snail. *Journal of Zoology* **152:** 55-65.
146. **Mahroof R, Zhu KY, Neven L, Subramanyam B, Bai JF. 2005.** Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **141:** 247-256.

147. **Martins EP, T. Garland. 1991.** Phylogenetic analyses of correlated evolution of continuous characters: a simulation study. *Evolution* **45:** 534-557.
148. **Mayr E. 1997.** *This is Biology. The Science of the Living World*. The Belknap Press of Harvard University Press: London.
149. **Mayr E. 2001.** *What evolution is.* Basic Books: New York.
150. **Michaelidis B. 2002.** Studies on the extra- and intracellular acid-base status and its role on metabolic depression in the land snail *Helix lucorum* (L.) during estivation. *Journal of Comparative Physiology B* **172:** 347-354.
151. **Michaelidis B, Pallidou A, Vakouftsi P. 1999a.** Effects of anoxia on the extra- and intracellular acid-base status in the land snail *Helix lucorum* (L.): Lack of evidence for a relationship between pyruvate kinase down-regulation and acid-base status. *Journal of Experimental Biology* **202:** 1667-1675.
152. **Michaelidis B, Rofalikou E, Grieshaber MK. 1999b.** The effects of hypercapnia on force and rate of contraction and intracellular pH of perfused ventricles from the land snail *Helix lucorum* (L.). *Journal of Experimental Biology* **202:** 2993-3001.
153. **Michaelidis B, Vavoulidou D, Rousou J, Portner HO. 2007.** The potential role of CO2 in initiation and maintenance of estivation in the land snail *Helix lucorum*. *Physiological and Biochemical Zoology* **80:** 113-124.
154. **Mizrahi T, Heller J, Goldenberg S, Arad Z. 2010.** Heat shock proteins and resistance to desiccation in congeneric land snails. *Cell Stress & Chaperones* **15:** 351-363.
155. **Moreno-Rueda G. 2006.** Habitat use by the arid-dwelling land snail *Iberus g. gualtieranus*. *Journal of Arid Environments* **67:** 336-342.
156. **Morris JP, Thatje S, Hauton C. 2013.** The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. *Molecular Ecology* **22:** 1494-1502.
157. **Morrone J, Crisci J. 1995.** Historical biogeography: Introduction to methods. *Annual Review of Ecology and Systematics* **26:** 373-401.
158. **Neter J, Wasserman W, Kutner MH. 1990.** *Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs*. Irwin: Homewood, IL.
159. **Nowakowska A, Caputa M, Rogalska J. 2006.** Sesonal changes in cryptotectants concentrations in *Helix pomatia* snails. *Journal of Physiology and Pharmacology* **57:** 93-105.
160. **Nylander JAA, Olsson U, Alstrom P, Sanmartin I. 2008.** Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: a Bayesian approach to dispersal-vicariance analysis of the thrushes (Aves: Turdus). *Systematic Biology* **57:** 257-268.
161. **Oakley TH. 2003.** On homology of arthropod compound eyes. *Integrated Comparative Biology* **43:** 522-530.
162. **Okajima R, Chiba S. 2011.** How does life adapt to a gravitational environment? the outline of the terrestrial gastropod shell. *The American Naturalist* **178:** 801-809.
163. **Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Stevens MHH, Oksanen MJ, Suggests MASS. 2007.** The vegan package. Community ecology package. Available from: http://r-forge.r-project.org/projects/vegan/.
164. **Pafilis P, Valakos ED, Foufopoulos J. 2005.** Comparative postautotomy tail activity in six Mediterranean lacertid lizard species. *Physiological and Biochemical Zoology* **78:** 828-838.
165. **Page R, Holmes E. 1998.** *Molecular Evolution. A Phylogenetic approach*: Cambridge.

166. **Pakay JL, Withers PC, Hobbs AA, Guppy M. 2002.** In vivo downregulation of protein synthesis in the snail *Helix aspersa* during estivation. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **283:** R197-R204.
167. **Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004.** APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20:** 289-290.
168. **Parent CE, Crespi BJ. 2009a.** Ecological Opportunity in Adaptive Radiation of Galapagos Endemic Land Snails. *The American Naturalist* **174:** 898-905.
169. **Parent CE, Crespi BJ. 2009b.** Ecological opportunity in adaptive radiation of Galapagos endemic land snails. *American Naturalist* **174:** 898-905.
170. **Parmakelis A. 2003.** The differentiation of the genus *Mastus* (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae) in the Hellenic region. A comparative study with the use of ecological, morphometric and molecular analysis methods. Unpublished PhD, University of Crete.
171. **Parmakelis A, Kotsakiozi P, Rand D. 2013.** Animal Mitochondria, Positive Selection and Cyto-Nuclear Coevolution: Insights from Pulmonates. *PLoS One* **8:** e61970.
172. **Parmakelis A, Mylonas M. 2002.** Aspects of the reproduction and activity of two sympatric *Mastus* (Beck, 1837) species in Crete (Gastropoda : Pulmonata : Buliminidae). *Journal of Molluscan Studies* **68:** 225-233.
173. **Parmakelis A, Mylonas M. 2004.** Dispersal and population structure of two sympatric species of the mediterranean land snail genus *Mastus* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **83:** 131-144.
174. **Parmakelis A, Pfenninger M, Spanos L, Papagiannakis G, Louis C, Mylonas M. 2005.** Inference of a radiation in *Mastus* (gastropoda, pulmonata, enidae) on the island of Crete. *Evolution* **59:** 991-1005.
175. **Parmakelis A, Spanos E, Papagiannakis G, Louis C, Mylonas M. 2003.** Mitochondrial DNA phylogeny and morphological diversity in the genus *Mastus* (Beck, 1837): a study in a recent (Holocene) island group (Koufonisi, south-east Crete). *Biological Journal of the Linnean Society* **78:** 383-399.
176. **Parmakelis A, Stathi I, Spanos L, Louis C, Mylonas M. 2006.** Phylogeography of *Iurus dufoureius* (Brulle, 1832) (Scorpiones, Iuridae). *Journal of Biogeography* **33:** 251-260.
177. **Pearson K. 1895.** Note on regression and inheritance in the case of two parents. *Proceedings of the Royal society of London* **58:** 240-242.
178. **Pearson K. 1901.** On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine A* **6:** 559-572.
179. **Pedler S, Fuery CJ, Withers PC, Flanigan J, Guppy M. 1996.** Effectors of metabolic depression in an estivating pulmonate snail (*Helix aspersa*): Whole animal and in vitro tissue studies. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **166:** 375-381.
180. **Pfenninger M. 2004.** Comparative analysis of range sizes in Helicidae s.l. (Pulmonata, Gastropoda). *Evolutionary Ecology Research* **6:** 359-376.
181. **Pfenninger M, Eppenstein A, Magnin F. 2003.** Evidence for ecological speciation in the sister species *Candidula unifasciata* (Poiret, 1801) and *C. rugosiuscula* (Michaud, 1831) (Helicellinae, Gastropoda). *Biological Journal of the Linnean Society* **79:** 611-628.
182. **Pfenninger M, Nowak C, Magnin F. 2007.** Intraspecific range dynamics and niche evolution in *Candidula* land snail species. *Biological Journal of the Linnean Society* **90:** 303-317.

183. **Piaggio AJ, Spicer GS. 2001.** Molecular Phylogeny of the Chipmunks Inferred from Mitochondrial Cytochrome b and Cytochrome Oxidase II Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20:** 335-350.
184. **Posada D, Crandall KA. 1998.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14:** 817 - 818.
185. **Poulakakis N. 2005.** Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizards *Podarcis* (Sauria: Lacertidae) in the Greek area. Unpublished PhD, University of Crete.
186. **Poulakakis N, Lymberakis P, Tsigenopoulos CS, Magoulas A, Mylonas M. 2005.** Phylogenetic relationships and evolutionary history of snake-eyed skink *Ablepharus kitaibelii* (Sauria : Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34:** 245-256.
187. **Purvis A, Gittleman JL, Cowlishaw G, Mace GM. 2000.** Predicting extinction risk in declining species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267:** 1947-1952.
188. **Purvis A, Gittleman JL, Luh H-K. 1994.** Truth or consequences: effects of phylogenetic accuracy on two comparative methods. *Journal of Theoretical Biology* **167:** 293-300.
189. **R Development Core Team. 2011.** R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
190. **Ramnanan CJ, Allan ME, Groom AG, Storey KB. 2009.** Regulation of global protein translation and protein degradation in aerobic dormancy. *Molecular and Cellular Biochemistry* **323:** 9-20.
191. **Rao CR. 1982.** Diversity and dissimilarity coefficients: A unified approach. *Theoretical Population Biology* **21:** 24-43.
192. **Ratnasingham S, Hebert P. 2007.** The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* **7:** 355-364.
193. **Rees BB, Hand SC. 1990.** Heat dissipation, gas exchange and acid base status in the land snail *Oreohelix* during short term estivation. *Journal of Experimental Biology* **152:** 77-92.
194. **Rees BB, Hand SC. 1991.** Regulation of Glycolysis in the Land Snail *Oreohelix* during Estivation and Artificial Hypercapnia. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **161:** 237-246.
195. **Rees BB, Hand SC. 1993.** Biochemical correlates of estivation tolerance in the mountain snail *Oreohelix* (Pulmonata, Oreohelicidae). *Biological Bulletin* **184:** 230-242.
196. **Reuner A, Brümmer F, Schill RO. 2008.** Heat shock proteins (Hsp70) and water content in the estivating Mediterranean Grunt Snail (*Cantareus apertus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **151:** 28-31.
197. **Revell LJ. 2012.** Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* **3:** 217-223.
198. **Rezende EL, Bozinovic F, Garland T. 2004.** Climatic adaptation and the evolution of basal and maximum rates of metabolism in rodents. *Evolution* **58:** 1361-1374.
199. **Reznick DN, Mateos M, Springer MS. 2002.** Independent origins and rapid evolution of the placenta in the fish genus *Poeciliopsis*. *Science* **298:** 1018-1020.
200. **Ricklefs RE. 2012.** Species richness and morphological diversity of passerine birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109:** 14482-14487.

201. **Riddle WA. 1983.** Physiological ecology of land snails and slugs. In: Russell-Hunter WD, ed. *The Mollusca 6*. London: Academic Press. 431-461.
202. **Ridley M. 1983.** *The Explanation of Organic Diversity: The Comparative Method and Adaptations for Mating*. UK: Clarendon: Oxford.
203. **Ronquist F. 1997.** Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* **46:** 195-203.
204. **Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19:** 1572-1574.
205. **Ronquist F, Sanmartin I. 2011.** Phylogenetic Methods in Biogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **42:** 441-464.
206. **Ross CF, Henneberg M, Ravosa MJ, Richard S. 2004.** Curvilinear, geometric and phylogenetic modeling of basicranial flexion: is it adaptive, is it constrained? *Journal of Human Evolution* **46:** 185-213.
207. **Ross HA, Rodrigo AG. 2002.** Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *Journal of Virology* **76:** 11715-11720.
208. **Rundell RJ, Holland BS, Cowie RH. 2004.** Molecular phylogeny and biogeography of the endemic Hawaiian Succineidae (Gastropoda : Pulmonata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31:** 246-255.
209. **Salzmann U, Haywood AM, Lunt DJ, Valdes PJ, Hill DJ. 2008.** A new global biome reconstruction and data-model comparison for the Middle Pliocene. *Global Ecology and Biogeography* **17:** 432–447.
210. **Sanford GM, Lutterschmidt WI, Hutchison VH. 2002.** The comparative method revisited. *Bioscience* **52:** 830-836.
211. **Santos T, Diniz-Filho JAF, Rangel T, Bini LM. 2012.** Package 'PVR'. Available from: http://cran.r-project.org/web/packages/PVR/index.html.
212. **Sauer J, Hausdorf B. 2010.** Reconstructing the evolutionary history of the radiation of the land snail genus *Xerocrassa* on Crete based on mitochondrial sequences and AFLP markers. *BMC Evolutionary Biology* **10:** 299.
213. **Scheil AE, Köhler H-R, Triebskorn R. 2011.** Heat tolerance and recovery in the mediterranean land snails after pre-exposure in the field. *Journal of Molluscan Studies*.
214. **Schluter D ed. 2006.** *The ecology of adaptive radiation*. Oxford: Oxford University Press.
215. **Schondube JE, Herrera-M. LG, Rio CMd. 2001.** Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats. *Zoology* **104:** 59-73.
216. **Seifter U, Dayton S, Novic B, Muntwyler E. 1950.** The estimation of glycogen with anthrone reagent. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **24:** 191-200.
217. **Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994.** Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene-Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain-Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87:** 651-701.
218. **Sinclair BJ, Gibbs AG, Roberts SP. 2007.** Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology and Evolution* **16:** 435-443.
219. **Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V. 2003.** The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6:** 1025–1037.
220. **Stankowski S. 2011.** Extreme, continuous variation in an island snail: local diversification and association of shell form with the current environment. *Biological Journal of the Linnean Society* **104:** 756-769.

221. **Steinberger Y, Grossman S, Dubinsky Z. 1982.** Changes in organic storage compounds during the active and inactive periods in a desert snail, *Sphincterochila prophetarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **71:** 41-46.
222. **Stevens VM, Pavoine S, Baguette M. 2010.** Variation within and between Closely Related Species Uncovers High Intra-Specific Variability in Dispersal. *PLoS One* **5:** 1-10.
223. **Storey K, Storey J. 2004.** Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **76:** 207-233.
224. **Storey KB. 2002.** Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **133:** 733-754.
225. **Storey KB, Storey JM. 2010.** Metabolic Regulation and Gene Expression During Aestivation. In: Navas CA and Carvalho JE, eds. *Aestivation. Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 25-45.
226. **Stuart JA, Ooi EL, Ballantyne JS. 1998.** Maximal activities of enzymes of intermediary metabolism in the estivating terrestrial snail *Cepaea nemoralis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **120:** 417-423.
227. **Subai P. 2005.** Revision of the genus *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae: Helicelinae). *Archives fuer Molluskenkunde* **134:** 65-119.
228. **Sugiura N. 1978.** Further analysts of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections. *Communications in Statistics-Theory and Methods* **7:** 13-26.
229. **Suvorov AN. 2002.** Prospects for Studies of Morphological Variability of Land Pulmonate Snails. *Biology Bulletin* **29:** 455-467.
230. **Swofford DL. 2003.** PAUP*-Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). 4.0b10a. ed. Sunderland, MA.: Sinauer Associates.
231. **Symonds MRE, Elgar M. 2002.** Phylogeny affects estimation of metabolic scaling in mammals. *Evolution* **56:** 2330-2333.
232. **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.
233. **Teshima H, Davison A, Kuwahara Y, Yokoyama J, Chiba S, Fukuda T, Ogimura H, Kawata M. 2003.** The evolution of extreme shell shape variation in the land snail *Ainohelix editha*: a phylogeny and hybrid zone analysis. *Molecular Ecology* **12:** 1869–1878.
234. **Thomaz D, Guiller A, Clarke B. 1996.** Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263:** 363-368.
235. **Tine M, Bonhomme F, McKenzie DJ, Durand J-D. 2010.** Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimatised to a range of environmental salinities. *BMC Ecology* **10**.
236. **Tomanek L, Somero GN. 2000.** Time course and magnitude of synthesis of heat-shock proteins in congeneric marine snails (Genus *Tegula*) from different tidal heights. *Physiological and Biochemical Zoology* **73:** 249-256.
237. **Tomanek L, Somero GN. 2002.** Interspecific and acclimation induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (Hsp70) and 90 (Hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus):

implications for regulations of Hsp gene expression. *Journal of Experimental Biology* **205:** 677-685.

238. **Van Riel P, Jordaens K, Van Houtte N, Martins AMF, Verhagen R, Backeljau T. 2005.** Molecular systematics of the endemic Leptaxini (Gastropoda : Pulmonata) on the Azores islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37:** 132-143.
239. **Watanabe Y, Chiba S. 2001.** High within-population mitochondrial DNA variation due to microvicariance and population mixing in the land snail *Euhadra quaesita* (Pulmonata : Bradybaenidae). *Molecular Ecology* **10:** 2635-2645.
240. **Weaver KF, Anderson T, Guralnick R. 2006.** Combining phylogenetic and ecological niche modeling approaches to determine distribution and historical biogeography of Black Hills mountain snails (Oreohelicidae). *Diversity and Distributions* **12:** 756-766.
241. **Westoby M, Leishman M, Lord J. 1995.** On misinterpreting the phylogenetic correction. *Journal of Ecology* **83:** 531-534.
242. **Wieser W. 1978.** Initial-Stage of Anaerobic Metabolism in Snail, *Helix pomatia* L. *Febs Letters* **95:** 375-378.
243. **Wieser W, Wright E. 1978.** D-Lactate formation, D-LDH activity and glycolytic potential of *Helix pomatia* L. *Journal of Comparative Physiology B* **126:** 249-255.
244. **Wieser W, Wright E. 1979.** Effects of season and temperature on D-Lactate Dehydrogenase, Pyruvate-Kinase and Arginine Kinase in the foot of *Helix pomatia L. Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* **360:** 533-542.
245. **Willmer P, Stone G, Johnston I. 2000.** *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Publishing company.
246. **Wilson A, Cann R, Carr S, George M, Gyllensten U, Helm-Bychowski K, Higuchi R, Palumbi S, Prager E, Sage R, Stoneking M. 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* **26:** 375-400.
247. **Wilson EO, Bossert WH. 1971.** *A Primer of Population Biology*. Sinauer Associates, Inc.: Stamford, Conn.
248. **Wilz M, Heldmaier G. 2000.** Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*. *Journal of Comparative Physiology* **B:** 511-521.
249. **Winnepenninckx B, Backeljau T, R DW. 1993.** Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* **9:** 407.
250. **Withers P, Pedler S, Guppy M. 1997.** Physiological adjustments during aestivation by the Australian land snail *Rhagada tescorum* (Mollusca : Pulmonata : Camaenidae). *Australian Journal of Zoology* **45:** 599-611.
251. **Xia X. 2009.** *Assessing substitution saturation with DAMBE. The phylogenetic handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing* University Press: Cambridge.
252. **Xia X, Xie Z. 2001.** DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92:** 371-373.
253. **Yang Z, Rannala B. 2012.** Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature* **13:** 303-314.
254. **Yu Y, Harris AJ, He XJ. 2010.** Statistical Dispersal-Vicariance Analysis (S-DIVA): a tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56:** 848-850.

255. **Zouros E, Ball O, Saavedra C, Freeman K. 1994.** Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368:** 818.
256. **Zwickl DJ. 2006.** Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Unpublished PhD, The University of Texas.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Codringtonia* (Gastropoda, Pulmonata) σύμφωνα με την τελευταία συστηματική αναθεώρηση περιλαμβάνει οκτώ είδη. Επτά από αυτά κατανέμονται αποκλειστικά στην Πελοπόννησο και τη Στερεά Ελλάδα, ενώ το όγδοο είδος (*C. neocrassa*), το οποίο ανήκει στο υπογένος *Neocrassa* εξαπλώνεται στην Κέρκυρα και στην Ήπειρο, ενώ αναφέρεται και από την Αλβανία. Τα είδη *Codringtonia* έχουν ενταχθεί στους κόκκινους καταλόγους των απειλούμενων ζώων, καθώς οι πληθυσμοί τους έχουν συρρικνωθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Εμφανίζουν μωσαϊκό πρότυπο κατανομής με το κάθε είδος να καταλαμβάνει ένα σχετικά μικρό εύρος του συνόλου της κατανομής, και έχουν ιδιαίτερο βιολογικό κύκλο καθώς αναπαράγονται την άνοιξη κάτι που δεν είναι συνηθισμένο για χερσαία γαστερόποδα της νότιας Ελλάδας. Επίσης, εμφανίζουν δύο περιόδους διάπαυσης (χειμώνα και καλοκαίρι).

Ο ενδημισμός του γένους, η μωσαϊκότητα της κατανομής των ειδών, η μικρή χωρική κλίμακα της διαφοροποίησης του και οι ιδιαιτερότητες του βιολογικού του κύκλου, καθιστούν το γένος *Codringtonia* ένα από τα πιο ενδιαφέροντα γένη χερσαίων γαστεροπόδων του Ελλαδικού χώρου. Από πού, πότε, με ποιό τρόπο και με τι «εφόδια» και προσαρμογές διαμόρφωσε αυτό το γένος τη σημερινή κατανομή του; Είναι ιστορικά ή οικολογικά τα αίτια που το οδήγησαν σε διαφοροποίηση, πώς αποκρίθηκαν τα είδη σε επίπεδο μορφολογίας και φυσιολογίας μέσα στο χώρο και στο χρόνο; Αυτά είναι μερικά από τα ερωτήματα που προσεγγίζονται στο πλαίσιο αυτής της διατριβής. Μέσα από μια συγκριτική μελέτη όλων των ειδών του γένους στηριζόμενη σε ένα φυλογενετικό πλαίσιο, γίνεται προσπάθεια να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι η πρώτη συγκριτική μελέτη που γίνεται σε αυτή την ελάχιστα μελετημένη περιοχή της Ελλάδας. Ως εκ τούτου θέτει τις βάσεις για αντίστοιχες μελέτες που θα ακολουθήσουν και θα αφορούν άλλες ομάδες οργανισμών.

Από την επίλυση της φυλογένεσης προέκυψε ότι το γένος αυτό διαφοροποιείται στον Ελλαδικό χώρο τα τελευταία 4,5 εκατ. χρόνια. Το είδος *C. neocrassa*, πιθανόν ανήκει σε ένα διαφορετικό γένος σχετικά απομακρυσμένο από το *Codringtonia,* ενώ από τα εναπομείναντα 7 είδη, τα 5 σχηματίζουν έναν μονοφυλετικό κλάδο το καθένα, ενώ δύο από αυτά σχηματίζουν έναν μονοφυλετικό κλάδο με πολύ καλή στατιστική στήριξη. Τα νέα δεδομένα που προέκυψαν δείχνουν ότι χρειάζεται συστηματική αναθεώρηση του γένους. Η προγονική περιοχή εξάπλωσης του γένους φαίνεται ότι ήταν η κεντρική Στερεά Ελλάδα και στη συνέχεια

με φαινόμενα βικαριανισμού αλλά κυρίως με διασπορά διαφοροποιήθηκαν τα είδη που υπάρχουν σήμερα και κατέλαβαν τις σημερινές περιοχές εξάπλωσης τους.

Για τη μελέτη της μορφολογίας του κελύφους χρησιμοποιήθηκαν εννέα μετρήσεις του κελύφους οι οποίες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο ομάδες, η πρώτη αφορά το μέγεθος και το σχήμα του κελύφους και η δεύτερη το μέγεθος και το σχήμα του ανοίγματος. Στη μελέτη της μορφολογίας του κελύφους χρησιμοποιήθηκαν όλα τα είδη *Codringtonia* με τουλάχιστον 3 πληθυσμούς το καθένα (35 πληθυσμοί, 19 από τους οποίους μετέχουν και στη φυλογένεση) και συνολικά 394 ενήλικα άτομα. Με βάση τη συνολική μορφολογία του κελύφους μόνο τρία είδη μπορούν να διακριθούν καλά από τα υπόλοιπα (το *C. intusplicata*, το *C. codringtonii* και το *C. parnassia*), ενώ παρατηρείται μεγάλη πλαστικότητα στους κελυφικούς χαρακτήρες για τα υπόλοιπα είδη. Αυτό οφείλεται στο ότι συμπεριλαμβάνονται πολλοί πληθυσμοί (του ίδιου είδους) στην ανάλυση, για τους οποίους καταγράφεται μεγάλη ποικιλομορφία/πλαστικότητα στους κελυφικούς χαρακτήρες. Το ερώτημα που προκύπτει, είναι πώς διαμορφώθηκε μέσα στο χρόνο αυτή η μεγάλη ποικιλότητα στο κέλυφος. Προς απάντηση του ερωτήματος αυτού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αντιπροσώπευσης φυλογενετικού σήματος (PSR). Η μέθοδος έδειξε ότι το μέγεθος του κελύφους ακολούθησε ομαλή διαφοροποίηση από τα πιο παλιά στα πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα, ενώ το σχήμα του ανοίγματος διαφοροποιείται κυρίως κατά τα πιο πρόσφατα κλαδογενετικά συμβάντα (προς τα άκρα του φυλογενετικού δέντρου). Τέλος, η διαφοροποίηση του σχήματος του κελύφους ακολούθησε ένα ενδιάμεσο σενάριο σε σχέση με τα δύο προαναφερθέντα, δηλαδή ένα μέρος της ποικιλομορφίας δημιουργήθηκε σε παλιά κλαδογενετικά συμβάντα ενώ το μεγαλύτερο μέρος δημιουργήθηκε κατά τα πιο πρόσφατα. Το ερώτημα που παραμένει είναι αν η κελυφική διαφοροποίηση «οδηγείται» κυρίως από την εξελικτική ιστορία που περιγράφηκε προηγουμένως ή αν εξωτερικοί παράγοντες όπως το κλίμα, μπορούν να ερμηνεύσουν την παρατηρούμενη ποικιλότητα. Για τον λόγο αυτόν εξετάστηκε χωριστά το ποσοστό της κελυφικής ποικιλότητας που μπορεί να ερμηνευτεί από παράγοντες όπως οι φυλογενετικές σχέσεις, το κλίμα κλπ καθώς και διάφορους συνδυασμούς αυτών. Βρέθηκε ότι η ποικιλότητα που παρατηρείται στο μέγεθος του κελύφους είναι αποτέλεσμα της εξελικτικής ιστορίας των ειδών αλλά και προσαρμογής στο κλίμα και στην περιοχή κατανομής. Αντίθετα, η παρατηρούμενη ποικιλότητα στο σχήμα του ανοίγματος καθορίζεται κυρίως από τις φυλογενετικές σχέσεις των πληθυσμών.

Για τη μελέτη της εποχικής μεταβολής σε λιπίδια, πρωτεΐνες, γλυκογόνο, στη δραστικότητας της LDH και στο υδατικό περιεχόμενο χρησιμοποιήθηκαν 3 είδη *Codringtonia* (*C. parnassia, C. intusplicata* και *C. eucineta*), ενώ για τη συγκριτική μελέτη των ειδών χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα και από ένα 4^{ο} είδος (*C. helenae*) που αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία. Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που εξάγονται είναι ότι το πρότυπο μεταβολής των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, του γλυκογόνου και της δραστικότητας της LDH μέσα στο χρόνο «αντικατοπτρίζει» την κατάσταση των ζώων (εάν είναι ενεργά και τρέφονται κανονικά ή αν βρίσκονται σε διάπαυση). Σε όλα τα είδη οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του γλυκογόνου μειώνονται κατά τη θερινή διάπαυση καθώς τα ζώα καταβολίζουν τις ουσίες αυτές για να στηρίξουν τον μεταβολισμό τους για όσο διάστημα είναι ανενεργά. Επίσης, η δραστικότητα της LDH αυξάνεται, που σημαίνει ότι ο μεταβολισμός κατά τη διάπαυση, κατά ένα μέρος τουλάχιστον, στηρίζεται και σε αναερόβια μονοπάτια. Η χειμερινή διάπαυση ομοιάζει περισσότερο με τις περιόδους δραστηριότητας παρά με τη θερινή διάπαυση. Τα επίπεδα των παραμέτρων που μετρήθηκαν, και κάποιες φορές και το πρότυπο μεταβολής τους μέσα στο χρόνο, διαφέρουν μεταξύ των ειδών που μελετήθηκαν. Οι δια-ειδικές αυτές διαφορές, ερμηνεύονται κατά ένα μέρος τουλάχιστον, από τις διαφορές των κλιματικών συνθηκών στις περιοχές μελέτης. Τα τρία είδη *Codringtonia* που μελετήθηκαν φαίνεται να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα του υδατικού περιεχομένου των ιστών τους καθ' όλη τη διάρκεια του έτους που σημαίνει ότι η απώλεια νερού κατά τη θερινή διάπαυση που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για το *C. helenae* δεν αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των ειδών *Codringtonia*. Ωστόσο, το είδος αυτό φαίνεται ότι έχει υψηλότερο ρυθμό απώλειας νερού σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, που αποτελεί ένδειξη ότι το είδος αυτό αντιμετωπίζει «δυσκολίες» στη διατήρηση του νερού, πράγμα που όμως δεν μπορεί να ερμηνευτεί με βάση γενετικούς παράγοντες (π.χ. πληθυσμιακή στενωπός). Η απώλεια νερού μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία προκαλεί αναλογικά αύξηση των επιπέδων Hsp70 (η σχέση γίνεται ακόμη πιο ισχυρή μετά την αφαίρεση της επίδρασης της φυλογένεσης), ωστόσο δεν καταγράφονται διαφορές σε δια-ειδικό επίπεδο ως προς την έκφραση Hsp70. Τέλος, τα είδη που κατανέμονται σε περιοχές χαμηλού υψομέτρου ή πιο νότια στην περιοχή εξάπλωσης εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα Hsp70 (χωρίς να υποστούν στρες) σε σχέση με είδη που κατανέμονται πιο βόρεια ή σε περιοχές μεγαλύτερου υψομέτρου. Το γεγονός ότι οι σχέσεις αυτές ενισχύονται μετά την αφαίρεση της επίδραση της φυλογένεσης υποδεικνύει ότι πιθανόν πρόκειται για προσαρμογή.

NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Animal & Human Physiology

Comparative study of the physiological adaptations of the land snails of the genus *Codringtonia* Kobelt 1898

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis

Panayiota A. Kotsakiozi
Biologist

ATHENS 2013

SUMMARY

The genus *Codringtonia* (Gastropoda, Pulmonata) consists of eight species according to the latest systematic review. Seven of them are distributed exclusively in the Peloponnese and central Greece, while the eighth species (*C. neocrassa*), which belongs to the subgenus *Neocrassa* is distributed in Kerkira island and Epirus, and is also reported from Albania. Based on the published molecular phylogeny of the genus, *C. neocrassa* is distantly related with the remaining *Codringtonia* species and probably belongs to another genus. Therefore, the genus is endemic to Greece. *Codringtonia* species are registered in the red list of endangered animals as vulnerable. *Codringtonia* species exhibit a mosaic distributional pattern as each species occupies a relatively small range of the total distributional area. They have an unusual life cycle as they reproduce during spring which is not common for land snails of the southern Greece. Also, they exhibit two dormancy periods (winter and summer).

The genus' endemism, its mosaic distributional pattern, the small spatial scale of its differentiation and its unusual life cycle, turn the genus *Codringtonia* into one of the most interesting genera of terrestrial gastropods in Greece. From where, when, how and with what adaptations was its current distribution formed? Are there historical or ecological causes that led to this diversification? How did species diversify at the morphological and physiological level in space and time? These are some of the issues that this Thesis is concerned with. Through a comparative framework, that contained all *Codringtonia* species I tried to address some of these concerns. This study is the first comparative study conducted in this least studied region of Greece. Therefore, it sets a basis for similar studies that will follow regarding other groups of organisms.

The resolved phylogeny revealed that the genus *Codringtonia* differentiates in Greece for the last 4.5 million years. As already mentioned, *C. neocrassa*, possibly belongs to a different genus distantly related to *Codringtonia*, while five of the remaining species, form each one a monophyletic clade. The last two species form a single monophyletic clade with very good statistical support. The new data obtained underline the need of a systematic revision of this genus. The ancestral distribution area seems to have been central Greece and then apparently through vicarianism and mainly through dispersal, *Codringtonia* species differentiated to the present species and occupied the present day distributional area.

In order to study the shell morphology of the *Codringtonia* species, nine shell measurements were used which can be grouped into two categories, the first one relate to the shell's size and shape and the second one relate to the apertural size and shape. For the morphological study, all *Codringtonia* species were used (in total 35 populations, 19 of which are present in the phylogenetic tree as well) comprising in total 394 adults specimens. Based on the overall shell morphology only three species can be distinguished from the others (*C. intusplicata, C. codringtonii* and *C. parnassia*) while there is great plasticity in shell characters in the remaining species. This is because there is high morphological intra-species diversity in the shell characters that were used in this study. The question is how was this great shell diversity formed in time. To answer this question, the method of phylogenetic signal representation (PSR) was applied. This method revealed that the shell size followed a Brownian motion model of evolution from the deep to the most recent cladogenetic events, while the shape of the aperture differentiated mainly during the most recent cladogenetic events. Finally, the differentiation of the shell shape followed an intermediate scenario compared to the two other features mentioned above, meaning that a part of the diversity was formed during deep cladogenetic events, while the major part of the diversity was attained during more recent events. The question that remains is if this shell differentiation was driven mainly by the evolutionary history described above, or if other factors such as climate, could account for the observed variability. For this reason the shell variability was partitioned and an assessment of the part the variability that could be explained by phylogeny, climate and space, was performed. The result of this analysis showed that the variability in shell size is the result of the evolutionary history of the species and in part an adaptation to the climate (past and present) and to the spatial features of the distributional area. On the other hand, the observed variability in the aperture's shape is primarily determined by the phylogenetic relationships at the population level.

The seasonal changes in lipids, proteins, glycogen, LDH activity and water content were studied in three *Codringtonia* species (*C. parnassia, C. intusplicata* and *C. eucineta*). For the comparative study, published data for a fourth *Codringtonia* species (*C. helenae*) were also used. The most important conclusions from this part are that the changes in lipids', proteins' and glycogen's concentrations as well as in LDH activity throughout the year "reflect" the state of the animals (active or aestivating/hibernating). In all four species the concentration of lipids, proteins and

glycogen decreased during aestivation as animals catabolised the available energy resources to support their metabolism during inactivity. Additionally, LDH activity is increased during aestivation, which means that the metabolism during aestivation, is based at least partly, on anaerobic pathways as well. The winter hibernation is more similar to the periods of activity than to the summer aestivation. Furthermore, lipids', proteins' and glycogen's concentrations, and sometimes the pattern of seasonal fluctuation, differed between species. The inter-specific differences are interpreted, at least partly, by the differences of the climatic conditions of the study areas. The three *Codringtonia* species seem to maintain their water content at almost stable levels during the whole year, which means that the water loss that has been recorded for *C. helenae* during aestivation is not a general pattern manifested by all *Codringtonia* species. However, this species appears to lose water at a higher rate compared to other *Codringtonia* species, which indicates that the species is facing difficulties in conserving tissue water. This feature, however, cannot be explained by genetic factors (i.e. a population bottleneck). Water loss after controlled exposure to high temperature caused a proportional increase at Hsp70 expression levels (the relationship becomes stronger after taking the phylogenetic relationships of the studied populations into account). However, inter-species differences at Hsp70 expression levels were not recorded. Finally, it seems that the species that are distributed southern or at lower altitudes constantly express higher levels of Hsp70 compared to species distributed northern or at higher altitudes. The fact that these relationships become stronger after removing the effect of phylogeny indicates that most likely they are adaptations to the environment.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal component analysis, PCA).

Η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA) είναι ίσως η πιο δημοφιλής πολυμεταβλητή στατιστική δοκιμασία που χρησιμοποιείται σχεδόν σε κάθε επιστημονικό πεδίο. Ο λόγος αυτής της μεγάλης δημοτικότητας ίσως είναι η απλότητα της μεθόδου. Οι αρχές της μεθόδου χρονολογούνται πίσω στο 1901 (Pearson, 1901), αλλά η πιο σύγχρονη εκδοχή της συγκεκριμενοποιήθηκε από τον Hotelling (1933) ο οποίος επινόησε και τον όρο «Κύριες Συνιστώσες».

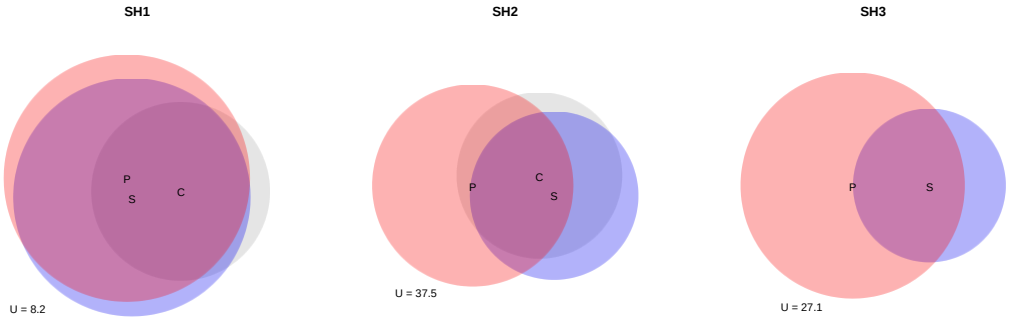
Η PCA συνοπτικά, αναλύει έναν πίνακα δεδομένων, που αφορά κάποιες παρατηρήσεις (π.χ. μορφολογικά δεδομένα που αφορούν το κέλυφος) οι οποίες περιγράφονται από κάποιες εξαρτημένες μεταβλητές (π.χ. ύψος κελύφους, πλάτος κελύφους κλπ) που σχετίζονται μεταξύ τους. Το 2003 ο Shaw στην προσπάθεια του να εξηγήσει τι κάνει η μέθοδος αυτή χρησιμοποίησε την αναλογία με τον προβολέα και τις σκιές. Είπε λοιπόν, ότι αν κανείς τοποθετήσει το χέρι του μπροστά από έναν προβολέα, τότε το τρισδιάστατο χέρι θα προβληθεί στη δισδιάστατη οθόνη ή στον τοίχο. Η πρόκληση είναι να στρέψει το χέρι στην κατεύθυνση εκείνη ώστε η προβολή στην οθόνη να μοιάζει όσο το δυνατόν περισσότερο με χέρι.

Οι μεταβλητές συμβολίζονται σαν σημεία σε χάρτη και έτσι με την ανάλυση αυτή είναι εύκολο να φανούν πρότυπα ομοιότητας. Οι στόχοι της PCA είναι να μειώσει το μέγεθος του συνόλου των δεδομένων κρατώντας μόνο τη σημαντική πληροφορία, να εξάγει την πιο σημαντική πληροφορία από τα δεδομένα αυτά καθώς επίσης και να απλοποιήσει την περιγραφή του συνόλου των δεδομένων. Προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι αυτοί, η PCA δημιουργεί ***νέες μεταβλητές*** που λέγονται ***κύριες συνιστώσες***, οι οποίες προκύπτουν από τον ***γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών***.

Οι ιδιοτιμές (eigenvalues) στην PCA αντιπροσωπεύουν το ποσό της ποικιλότητας που ερμηνεύεται από τον κάθε άξονα (ή την κάθε κύρια συνιστώσα). Τα διάφορα λογισμικά μπορεί να εκφράζουν την ιδιοτιμή ως νούμερο, ποσοστό της συνολικής ποικιλότητας ή αθροιστικό ποσοστό της συνολικής ποικιλότητας. Η κάθε αρχική μεταβλητή συμμετέχει σε κάποιο βαθμό στον καθορισμό του κάθε άξονα της

PCA, η βαρύτητα (loading) της κάθε μεταβλητής στον κάθε άξονα δείχνει την επίδραση που έχει η μεταβλητή αυτή στον καθορισμό του συγκεκριμένου άξονα.

Συμπληρωματικά αποτελέσματα για τη συμβολή του κλίματος, της φυλογένεσης και του χώρου στην ερμηνεία της κελυφικής ποικιλότητας



Εικόνα 3.12. Η συμβολή του κλίματος (C), της φυλογένεσης (P) και του χώρου (S) στην ερμηνεία της ποικιλότητας στους κελυφικούς χαρακτήρες SH1, SH2 και SH3. Για τη μεταβλητή SH1 υπάρχει σχεδόν πλήρης επικάλυψη των τριών παραγόντων ενώ παρατηρείται μερική επικάλυψη στις μεταβλητές SH2 και SH3.

Molecular Phylogenetics and Evolution 62 (2012) 681–692

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympev

Mitochondrial phylogeny and biogeographic history of the Greek endemic land-snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae)

Panayiota Kotsakiozi [a], Aristeidis Parmakelis [b,*], Sinos Giokas [c], Irene Papanikolaou [b], Efstratios D. Valakos [a]

[a] Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupoli Zografou, GR-15784 Athens, Greece
[b] Department of Ecology and Taxonomy, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupoli Zografou, GR-15784 Athens, Greece
[c] Section of Animal Biology, Department of Biology, University of Patras, GR-26500 Patras, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 March 2011
Revised 8 November 2011
Accepted 15 November 2011
Available online 28 November 2011

Keywords:
Dispersal
Greece
Land-snails
Phylogeny
Vicariance

ABSTRACT

The aim of this work was to infer the phylogeny of the Greek endemic land-snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898, estimate the time frame of the radiation of the genus, and propose a biogeographic scenario that could explain the contemporary distribution of *Codringtonia* lineages. The study took place in the districts of Peloponnese, Central Greece and Epirus of mainland Greece. Sequence data originating from three mtDNA genes (COI, COII, and 16S rDNA) were used to infer the phylogeny of the eight nominal *Codringtonia* species. Furthermore, the radiation time-frame of extant *Codringtonia* species was estimated using a relaxed molecular clock analysis and mtDNA substitution rates of land snails. The phylogenetic analysis supported the existence of six *Codringtonia* lineages in Greece and indicated that one nominal species (*Codringtonia neocrassa*) might belong to a separate genus distantly related to *Codringtonia*. The time frame of differentiation of *Codringtonia* species was placed in the Late Miocene–Pleistocene epoch. The dispersal–vicariance analysis performed indicated that most probably *Codringtonia* exhibited a north-to-south spread with the ancestral area being that of central Greek mainland, accompanied with duplication (speciation) and vicariance events.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The complex late Tertiary geological history of the Balkan Peninsula and especially of the Greek area (Creutzburg, 1963; Dermitzakis, 1990; Meulenkamp, 1985; Steininger and Roegl, 1984), located at the margin of the Eurasian and African plates, have contributed to the diversification and distribution of many terrestrial animals (Beerli et al., 1996; Bittkau and Comes, 2005; Papadopoulou et al., 2009; Parmakelis et al., 2005, 2006a,b; Poulakakis et al., 2003, 2005a,b). Multiple land connections offered the opportunities for dispersal in some cases, whereas in others submergence of land bridges disrupted the distributions of related taxa. In biological terms these geological events resulted in high levels of diversity and endemism in the entire mainland and insular Greece (Medail and Diadema, 2009; Medail and Quezel, 1999; Parmakelis et al., 2005; Sfenthourakis and Legakis, 2001). Several studies have employed molecular markers to survey the importance of vicariance events and dispersal in shaping the distribution of genetic diversity for the terrestrial fauna of the Greek territory. As stated in Triantis and Mylonas (2009) "over the last 25 years, numerous ecological, biogeographical, and evolutionary studies have greatly enhanced our knowledge of the biodiversity patterns of the Greek region". However, the vast majority of these studies are focused on the insular part of Greece and more specifically in the Aegean Archipelago, whereas comprehensive studies surveying taxa of continental Greece are considerably underrepresented (de Weerd and Gittenberger, 2005; de Weerd et al., 2006, 2004, 2005; Gittenberger et al., 2004; Klossa-Kilia et al., 2006; Parmakelis et al., 2008; Poulakakis and Sfenthourakis, 2008; Sotiropoulos et al., 2007; Thanou et al., 2005; Tryfonopoulos et al., 2008). Nevertheless, the distributional patterns of genetic diversity of certain taxa that have been studied from mainland Greece highlight that the processes shaping the biodiversity of mainland Greece are quite complex, regionally specific and divergent (Sotiropoulos et al., 2007). This is partly due to the palaeogeographic history of mainland Greece that, at a regional level, was even more complex than that of the insular area [see Parmakelis et al. (2006a)]. Additionally, the topographic complexity of mainland Greece is much higher compared to that of the islands (with the possible exception of Crete), and regionally fluctuating. Consequently, the regional character of the processes shaping biodiversity in the mainland is well justified, and therefore it is of major interest to determine the taxa and region specific biogeographic patterns in order to be able to distinguish between idiosyncratic and general evolutionary processes.

Here we investigate the evolutionary history of the land-snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898, which is endemic to Greece

* Corresponding author. Fax: +30 2107274885.
E-mail address: aparmakel@biol.uoa.gr (A. Parmakelis).

1055-7903/$ - see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ympev.2011.11.012

(Subai, 2005) and has a restricted and mosaic distribution (Fig. 1) in the continental area. Characters of the shell and of the distal genitalia anatomy are used for species identification (Subai, 2005). However, the actual number of *Codringtonia* species distributed in Greece is not clear and a resolved phylogeny is missing. Subai (2005) concluded that *Codringtonia* is represented by eight species in Greece, whereas prior to Subai' s review, the number of *Codringtonia* species and subspecies reported from Greece was 12 (Hadjicharalambous, 1996). Four (*Codringtonia codringtonii*, *Codringtonia elisabethae*, *Codringtonia gittenbergeri* and *Codringtonia helenae*) out of the eight currently recognized *Codringtonia* species (Subai, 2005) can be found only in particular areas of the Peloponnese peninsula; a single species (*Codringtonia neocrassa*) is found in some areas of the district of Epirus (northwestern Greece) and in the nearby Albanian territory and another one (*Codringtonia parnassia*) is found exclusively in Central Greece. Finally, there are two species (*Codringtonia eucineta* and *Codringtonia intusplicata*) that are present both in Central Greece and Peloponnese peninsula. Between the district of Epirus and Central Greece no *Codringtonia* species occur (Subai, 2005). Regarding its insular distribution a single species (*C. neocrassa*) is present only on the island of Kerkira (Corfu) (Fig. 1). The discontinuous and patchy distribution of the genus is puzzling itself. This is claimed since *Codringtonia* species are missing from potentially suitable regions that are located in between the present day distribution areas of the genus. *Codringtonia* species are found at various altitudes, living in crevices on rocky terrain within maquis and coniferous (except pines) or mixed (deciduous–coniferous) forests (Giokas et al., 2007). Due to their very limited distributional range, all species occurring in Greece (except *C. neocrassa*) have been registered in the Red Data Book of threatened animals of Greece as vulnerable (Legakis and Maragou, 2009).

Therefore, our main goals are (1) to infer the evolutionary relationships of the *Codringtonia* species of Greece, using sequence data originating from three mtDNA genes, (2) to estimate the radiation time-frame of the *Codringtonia* species, applying a relaxed molecular clock strategy and using mtDNA substitution rates of land snails, and (3) to propose, within this phylogenetic framework, a biogeographic scenario accounting for the current *Codringtonia* lineages' distribution.

2. Materials and methods

2.1. Specimens, DNA extraction, amplification and sequence determination

Total genomic DNA was isolated from foot muscle of specimens that were either frozen (−20 °C) or (absolute) ethanol preserved. To overcome problems of polymerase chain reaction (PCR) inhibition by mucopolysaccharides, DNA was extracted using the CTAB

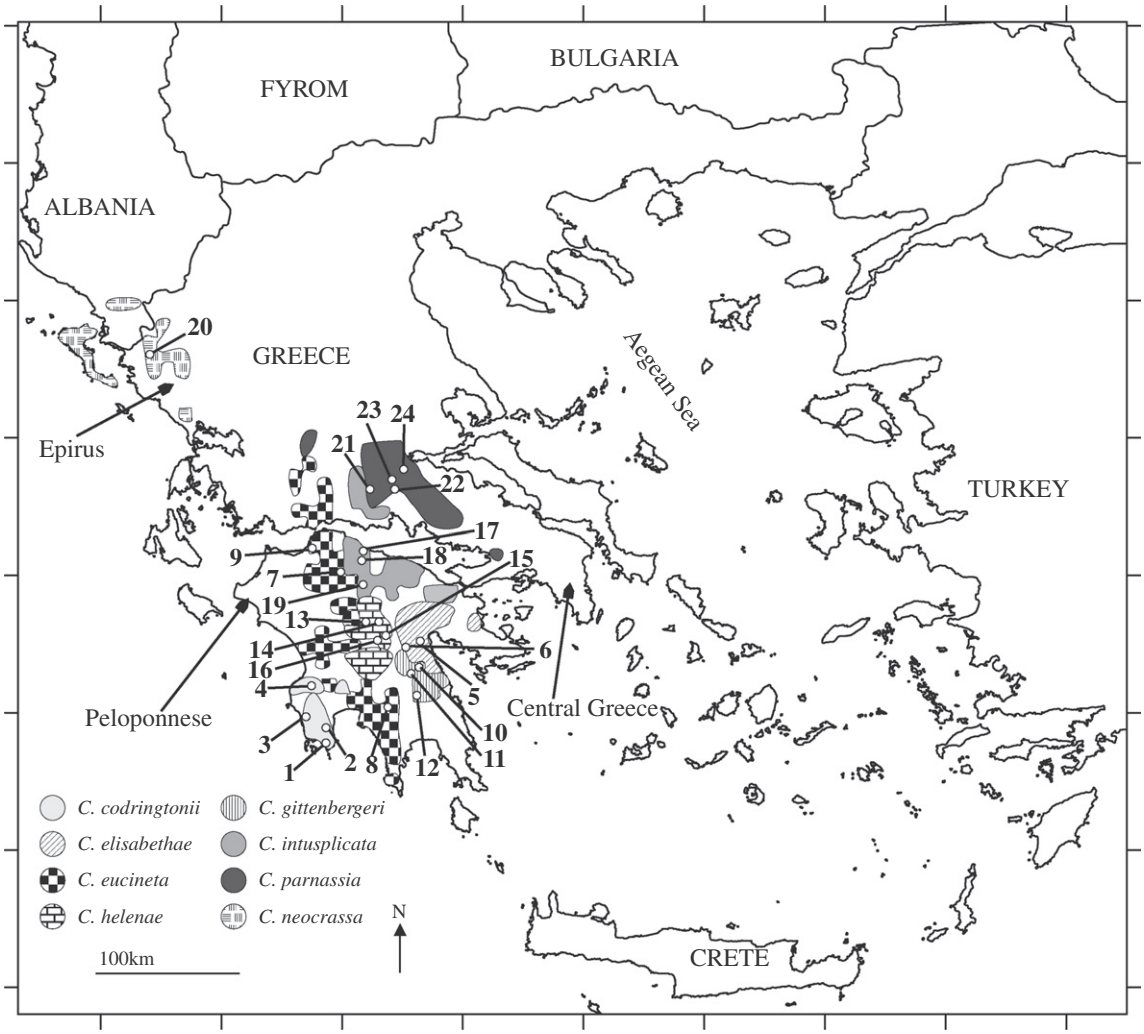


Fig. 1. Distribution map of *Codringtonia* species (redrawn from Subai, 2005) and sampling localities of *Codringtonia* populations included in the study. Numbers of localities correspond to the map codes reported in Table 1.

Table 1
Species and populations included in the study, geographic data of the sampling localities, sample sizes (N) of populations and accession numbers of sequences. Map codes refer to Figure 2.

Map code	Sampling Locality (N)	District	Latitude	Longitude	Collection Date	Nominal species	Sample code	Accession numbers COI/ COII/16S
1	Chrysokelaria Monastery (1)	Peloponnese	36.79154	21.88558	30/11/ 2008	*C. codringtonii*	CcHr1	JQ239920/ JQ240005/ JQ240089
2	Mathias (1)	Peloponnese	36.92928	21.88341	30/11/ 2008	*C. codringtonii*	CcMath1	JQ239921/ JQ240006/ JQ240090
3	Navarino (2)	Peloponnese	36.95236	21.66138	30/11/ 2008	*C. codringtonii*	CcNav1[a], CcNav2	JQ239922-23/JQ240007/ JQ240091-92
4	Rodia 1.2 km before (4)	Peloponnese	37.2126	21.73833	29/11/ 2008	*C. codringtonii*	CcRod1, CcRod2, CcRod3, CcRod4	JQ239924-27/JQ240008-11/JQ240093-96
5	Achladokampos to Argos 5 km (1)	Peloponnese	37.51775	22.663422	20/01/ 2008	*C. elisabethae*	CeAA7_1	JQ239928/ JQ240012/ JQ240097
6	Steno to Tripoli 500m (5)	Peloponnese	37.500121	22.462234	20/01/ 2008	*C. elisabethae*	CeST6_1, CeST6_2, CeST6_3, CeST6_4, CeST6_5	JQ239929-33/JQ240013-17/JQ240098-102
7	Kalavrita to Lagovouni 6 km (1)	Peloponnese	38.01726	22.07513	05/04/ 2008	*C. eucineta*	Ceu_LAG_2	JQ239934/ JQ240018/ JQ240103
8	Mistras (2)	Peloponnese	37.069405	22.382069	07/05/ 2008	*C. eucineta*	CeuMist1, CeuMist2	JQ239939-40/JQ240019-20/JQ240104-05
9	Panachaiko Mt., 1800m a.s.l.(4)	Peloponnese	38.213333	21.874722	08/05/ 2008	*C. eucineta*	Ceu_PAN_1, Ceu_PAN_2, Ceu_PAN_3, Ceu_PAN_4	JQ239935-38/JQ240021-24/JQ240106-09
10	Agios Ioannis to Meligou 1.5 km before (13)	Peloponnese	37.352893	22.654839	06/12/ 2008	*C. gittenbergeri*	Cg_MelR1_1, Cg_MelR2_1, Cg_MelR3_1, Cg_MelR4_1, Cg_MelR4_2, Cg_MelR5_1, Cg_MelR5_2, Cg_MelR6_1[b], Cg_MelR6_2, Cg_MelR7_1, Cg_MelR7_2, Cg_MelR7_3, Cg_MelR7_4	JQ239941-53/JQ240025-37/JQ240110-21
11	Agios Petros to Malevi Monastery (1)	Peloponnese	37.29333	22.59135	06/12/ 2008	*C. codringtonii*	Cc_Mal_1	JQ239954/ JQ240038/ JQ240122
12	Kalithea (1)	Peloponnese	37.086059	22.641106	07/12/ 2008	*C. codringtonii*	Cc_KalR2_2	JQ239955/ JQ240039/ JQ240123
13	Mainalo mountain hut (13)	Peloponnese	37.6565	22.2623	12/05/ 2008	*C. helenae* and *C. intusplicata*	Ci_MEN_1, Ci_MEN_2, Ch_MEN_3, Ch_MEN_4, Ch_MEN_5, Ch_MEN_6, Ch_MEN_8, Ch_MEN_9, Ch_MEN_10, Ch_MEN_11, Ci_MEN_12, Ch_MEN_13, Ch_MEN_14	JQ239956-68/JQ240040-52/ JQ240124-36
14	Tripoli to Levidi 2 km (5)	Peloponnese	37.664654	22.302933	12/05/ 2008	*C. helenae*	Ch_LEV_1, Ch_LEV_2, Ch_LEV_3, Ch_LEV_4, Ch_LEV_5	JQ239969-73/JQ240053-57/ JQ240137-41
15	Tripoli to Mainalo mountain hut 1.5 km (3)	Peloponnese	37.520001	22.356834	20/01/ 2008	*C. helenae*	ChTM4_1, ChTM4_2, ChTM4_3	JQ239974-76/JQ240058-60/JQ240142-44
16	Tripoli to Mainalo mountain hut 4 km (1)	Peloponnese	37.535703	22.345848	20/01/ 2008	*C. helenae*	ChTM5_1	JQ239977/ JQ240061/ JQ240145
17	Diakopto (2)	Peloponnese	38.18046	22.19436	05/04/ 2008	*C. intusplicata*	Ci_DIA_1, Ci_DIA_2	JQ239978-79/JQ240062-63/ JQ240146-47
18	Diakopto to Kalavrita (3)	Peloponnese	38.09946	22.17053	05/04/ 2008	*C. intusplicata*	Ci_MSP_1, Ci_MSP_2, Ci_MSP_3	JQ239980-82/JQ240064-66/ JQ240148-50
19	Planitero, Helmos Mt. (3)	Peloponnese	37.933764	22.164917	not available	*C. intusplicata*	CiPLAN1, CiPLAN2, CiPLAN3	JQ239983-85/JQ240067-69/ JQ240151-53
20	Vrosina to Igoumenitsa 15 km (3)	Epirus	39.58706	20.47621	07/06/ 2008	*C. neocrassa*	Cn_IG_1, Cn_IG_2, Cn_IG_3	JQ239986-88/JQ240070-

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Map code	Sampling Locality (N)	District	Latitude	Longitude	Collection Date	Nominal species	Sample code	Accession numbers COI/ COII/16S
								72/ JQ240154-56
21	Giona Mt.-Palaiovouni peak at Makrilakoma (3)	Central Greece	38.629173	22.219849	04/07/ 2008	*C. parnassia*	CpGio_1, CpGio_2, CpGio_3	JQ239989-91/JQ240073-75/ JQ240157-59
22	Gravia to Amfissa 27.5 km (9)	Central Greece	38.6492	22.4154	26/04/ 2009	*C. parnassia*	CpGravR1, CpGravR2, CpGravR3, CpGravR4, CpGravR5_1, CpGravR5_2, CpGravR6_1, CpGravR6_2, CpGravR7	JQ239992-00/ JQ240076-84/ JQ240160-68
23	Skamnos, 1.2 km to the east on the road from Bralos to Thermopiles (1)	Central Greece	38.752941	22.453308	25/04/ 2009	*C. parnassia*	CpSka_1	JQ240001/ JQ240085/ JQ240169
24	Thermopiles to Anavra (5 km) (1)	Central Greece	38.78489	22.58248	25/04/ 2009	*C. parnassia*	CpThe_1	JQ240002/ JQ240086/ JQ240170
-	Profitis Ilias plateau 450m a.s.l. (1)	Chalki island	not available	not available	22/10/ 2003	*Levantina spiriplana*	*Levantina spiriplana*	JQ240003/ JQ240087/ JQ240171
-	Kozani fortress, 400m a.s.l. (1)	Turkey	not available	not available	27/03/ 2002	*Assyriella naegelei*	*Assyriella naegelei*	JQ240004/ JQ240088/ JQ240172

[a] Sequence of *COII* not obtained.
[b] Sequence of *16S rRNA* not obtained.

2x (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) protocol of Winnepenninckx and Backeljau (1993) as described in Parmakelis et al. (2003). In total 83 adult individuals (Table 1) representing all nominal *Codringtonia* species reported in Subai (2005) were used. Specimens were assigned to species based on features of their shells and genital anatomy following Subai (2005). A specimen of *Levantina spiriplana* Kobelt, 1871 originating from the island of Chalki (Dodecanese), and one of *Assyriella naegelei* (Kobelt, 1901) from mainland Turkey, were used as outgroups in the phylogenetic analyses. These genera are considered to be the most closely related helicids to *Codringtonia* (Hadjicharalambous, 1996; Subai, 2005). In Fig. 1 the distributional ranges of the *Codringtonia* species are presented. From each *Codringtonia* species 1–5 populations were included in the study. Detailed information on the origin of the specimens used in this study is provided in Table 1 and the sampling localities of populations are presented in Fig. 1. Three mtDNA markers were used and these were the cytochrome oxidase subunit I (COI), the cytochrome oxidase subunit II (COII) and the 16S ribosomal DNA (16S rDNA) gene. The fragments targeted were 708, 580 and 511 bp long for COI, COII and 16S rDNA, respectively. The L1490-Alb and H2198-Alb primers (Gittenberger et al., 2004) were used to amplify the COI fragment. For the amplification of the COII gene, we initially used the primers reported in Hugall et al. (2002), but for some specimens, *Codringtonia* specific primers were designed from the sequences obtained using the previously mentioned COII primers. The sequences of the newly designed primers are: 5'-GTATTGGTTKCAGTAGTGGGC-3' and 5'-GGTATTTTTGTAYTGGTTGC-3'. Finally, for the amplification of the 16S rDNA gene, we used the universal primers 16SAR LR N12887 and 16SBR LR J13398 (Simon et al., 1994). A few amplicons produced with the universal primers were of very low quality. Therefore, *Codringtonia* specific primers were designed for this marker as well. The sequences of these primers are: 5'-TGACTGTGCAAAGGTAGCAT-3' and 5'-TTGAACTCAGATCACGTAGG-3'. Each PCR was performed in a 50 uL volume, where 1–2 uL of template DNA was mixed with 0.2 mM dNTPs, 0.4 mM of each primer, and five units of Taq Polymerase per uL. The concentration of the $MgCl_2$ varied between 2.5 and 3.5 mM depending on the mtDNA marker amplified. Thermocycling was performed in either a MyCycler (Biorad) or a TProfessional (Biometra) thermocycler. The cycle programs comprised an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1.5 min at 40–52 °C, 1 min at 72 °C. The cycling was ended with 10 min sequence extension at 72 °C. The annealing temperatures of the PCRs varied both between and within the different markers amplified. More specifically the annealing temperatures used were 40/45, 42/45 and 42/45/48/50/52 °C, for COI, COII and 16S rDNA, respectively. Automated sequencing of both strands of each amplicon was performed in a PE-ABI3740 automated sequencer (using BigDye terminator chemistry). The primers in the sequencing reac-

Table 2
Within and between *Codringtonia* species average genetic distances (concatenated data set) based on the K-2p model.

Within species		Between species (net between group average)						
		1	2	3	4	5	6	7
0.022	1_*C. codringtonii*							
0.011	2_*C. elisabethae*	0.092						
0.052	3_*C. eucineta*	0.082	0.070					
0.002	4_*C. gittenbergeri*	0.104	0.008	0.077				
0.003	5_*C. helenae*	0.104	0.044	0.079	0.049			
0.034	6_*C. intusplicata*	0.098	0.072	0.070	0.075	0.085		
0.002	7_*C. neocrassa*	0.269	0.255	0.234	0.276	0.265	0.247	
0.040	8_*C. parnassia*	0.138	0.138	0.125	0.148	0.143	0.130	0.255

tions were the same as in the PCR amplifications. All sequences produced for this study have been deposited in GenBank under the accession numbers: JQ239920-JQ240172 (Table 1).

2.2. Sequences alignment and genetic data analysis

Sequences were viewed and edited using CodonCode Aligner v. 2.06 (Genecodes Corporation). The authenticity of the mtDNA sequences and the homology to the targeted mtDNA genes were evaluated with a BLAST search in the NCBI genetic database (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Each mtDNA data set was aligned with CodonCode Aligner and the alignment (default alignment algorithm implemented) was manually improved when deemed necessary. The alignment gaps in the 16S rDNA fragment were treated as missing data. In the concatenated data set genetic distances between individual sequences were calculated using MEGA4 (Tamura et al., 2007) and implementing the Kimura 2-parameter (K-2p) model (Kimura, 1980) of nucleotide substitution. The K-2p model was intentionally used in order to be able to compare the levels of divergence of our sequences with those of other published pulmonate sequences. Furthermore, we estimated the intra- and interspecies level of sequence divergence (Table 2) by calculating either the between group mean distances or the net between group mean distances as implemented in MEGA4. Finally, the within population sequence divergence was also estimated using MEGA4.

2.3. Phylogenetic analysis

Prior to the phylogenetic analyses, the datasets were investigated for substitution saturation. This was achieved by plotting the transitions (Ts) and transversions (Tv) of each pairwise comparison (estimated by DAMBE) versus the respective p-distance. A regression analysis was performed to evaluate whether substitutions increase linearly with p-distance. Phylogenetic analyses were performed on the concatenated data set comprising the three mtDNA gene data sets. Phylogenetic analyses involved Maximum Parsimony (MP), Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood (ML). MP analysis was performed with PAUP* (Swofford, 2002), with heuristic searches using stepwise addition and performing tree-bisection–reconnection (TBR) branch swapping. Confidence in the nodes was assessed by 1000 bootstrap pseudo-replicates (Felsenstein, 1985). Bayesian Inference (BI) was performed with MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), and a partition of the data set according to mtDNA locus was enforced. For the selection of the appropriate substitution models fitting the (3) different partitions, Modeltest 3.7 (Posada and Crandall, 1998) and the Akaike Information Criterion (Akaike, 1974) were used. Model parameter values were treated as unknown and were estimated during the MrBayes run. The separate partitions were treated as "unlinked", obtaining separate model parameter estimates for each one. The number of generations was set to 15×10^6 and four independent runs were performed simultaneously. In each run eight chains were involved. The average standard deviation of split frequencies of the four simultaneous and independent runs performed by MrBayes 3.1.2 was used to determine the stationarity point of likelihoods (see MrBayes 3.1.2 manual). According to this index, stationarity was achieved well before 3×10^6 generations. A tree was sampled every 100th generation and, consequently, the summaries of the BI relied on 600×10^5 samples (sum of four runs). From each run 112,501 samples were used, while 37,499 were discarded as burn-in phase. From the remaining 450,004 trees (sum of four runs), a 50% majority rule consensus tree was constructed. Support of the nodes was assessed with the posterior probabilities (p.p.) of reconstructed clades. Maximum Likelihood (ML) analysis was performed on the concatenated data using GARLI (Zwickl, 2006) v.2.0. We performed heuristic phylogenetic searches using the same data partition scheme and models that were implemented in MrBayes analysis. GARLI calculates the maximum likelihood of a topology using a genetic algorithm (Lewis, 1998) to evaluate more efficiently alternative topologies. The most likely GARLI tree topology was inferred from 20 independent runs starting from random trees. Besides the number of runs and the implementation of the appropriate model to each partition of the data set, all remaining parameters of GARLI were set to their default values. The separate partitions were treated as "unlinked", and the model parameters were estimated separately for each. The independent analyses were considered to have converged when the likelihood values were less than one likelihood unit different. The ML tree with the higher likelihood score was considered as the best. The parameters estimated for the best tree were fixed in the bootstrap analysis involving 200 pseudo-replicates. Based on the trees of the bootstrap analyses, a 50% majority rule consensus tree was created using SumTrees as proposed in the advanced topics site of GARLI (http://www.nescent.org/wg_garli/Advanced_topics#Using_SumTrees). The support values at each node on the consensus tree were depicted on the best tree found by GARLI.

2.4. Molecular clock and estimation of divergence times

A likelihood ratio test (LRT) on the presence of a molecular clock was performed according to Huelsenbeck and Crandall (1997). The test was not in favor ($P \ll 0.05$) of a clocklike evolution of the involved sequences. Consequently, divergence time points between clades and lineages were estimated with BEAST version 1.5.3 (Drummond and Rambaut, 2007). BEAST involves a Bayesian Markov Chain Monte Carlo method that incorporates a relaxed molecular clock model, thus accounting for the time-dependent nature of the evolutionary process. Rates are uncorrelated across the tree, being independently drawn from a parametric distribution (Drummond and Rambaut, 2007). In the BEAST analysis the data were partitioned according to gene and a different substitution model (see the BI settings in 2.3) was applied to each mtDNA gene. For its greater accuracy we used the relaxed uncorrelated lognormal clock model (Drummond et al., 2006) in all partitions. A Yule process was chosen, as recommended for species-level phylogenies (Drummond

Table 3
Definitions of distribution areas of *Codringtonia* species used in the dispersal–vicariance analysis.

Species	Distribution of species in defined areas	Geographic definition of areas
C. helenae	HI	Central Peloponnese (H), South-Central Peloponnese (I)
C. gittenbergeri/ elisabethae	HJ	Central Peloponnese (H), Central-East Peloponnese (J)
C. codringtonii	JK	Central-East Peloponnese (J), South-West Peloponnese (K)
C. eucineta	BEHIK	West Sterea (B), North-West Peloponnese (E), Central Peloponnese (H), South-Central Peloponnese (I), South-West Peloponnese (K)
C. intusplicata	CFG	Central Sterea (C), North-Central Peloponnese (F), North-East Peloponnese (G)
C. parnassia	BCD	West Sterea (B), Central Sterea (C), East Sterea (D)
C. neocrassa	A	North-West Greece (A)

and Rambaut, 2009). The study area is palaeo-physically highly dynamic and finding reliable biogeographic calibration points is not a straight forward process. Using previously published mtDNA substitutions rates is perhaps the last resort for escaping this dilemma. However, the rates for the mitochondrial ribosomal genes of pulmonates are reported to vary between 1.6% and 12.9% per million years (Chiba, 1999; Thomaz et al., 1996; Van Riel et al., 2005). Accordingly, the pulmonates COI rates are reported to vary between 2.8% and 13% per million years (Van Riel et al., 2005). Finally, the available data for rates of the mitochondrial COII of pulmonates are absent. Since choosing a single calibration point was an equally difficult task, we estimated the timing of cladogenetic events by applying four independent calibration scenarios (by adjusting the ucld.mean for each gene). In all timing scenarios the evolutionary rate of COII was considered to be equal to that of COI. In the first (extreme), a very high molecular rate (16S rDNA: 10%, COI/COII: 13%) was involved. In the second scenario (high) the molecular rate of 16S rDNA was adjusted to 5% and that of COI/COII to 8%. The third scenario (intermediate) relied on a molecular rate of 16S rDNA not exceeding 2.5%, whereas COI/COII were limited to 4%. Finally, in the fourth scenario (low) a relatively low molecular rate for both 16S rDNA (1.6%) and COI/COII (2.5%) was implemented.

In each timing scenario two independent runs were performed on different processors for a chain length (generations) of 50×10^6 and parameters were sampled every 3500 generations. The two separate runs were then combined (following the removal of 10% burn-in) using LogCombiner v.1.5.3 (Drummond and Rambaut, 2009). Adequate sampling and convergence of the chain to stationarity distribution were confirmed by inspection of the MCMC samples using Tracer v.1.5 (Drummond and Rambaut, 2009). The effective sample size (ESS) values of all parameters were well above 200, which is usually considered a sufficient level of sampling (Drummond and Rambaut, 2009). The sampled posterior trees were summarized using TreeAnnotator v.1.5.3 (Drummond and Rambaut, 2009) to generate a maximum clade credibility tree (maximum posterior probabilities) and calculate the mean ages and 95% highest posterior density (HPD) intervals for each node.

2.5. Biogeographic inferences

For the analysis of potential ancestral distribution areas for taxa of *Codringtonia* we conducted a typical Bayes statistical dispersal–vicariance analysis (Ronquist, 1997), with RASP that is an updated version of S-DIVA v.2.0 (Yu et al., 2010), allowing reconstruction with the optimization parameters set to constrain the number of the ancestral areas to two. This analysis implements the methods of Harris and Xiang (2009) and Nylander et al. (2008), which account for uncertainty in the phylogenetic estimate. The Bayesian phylogeny was pruned so that each one of the recognized clades was represented by a single terminal. The current range of *Codringtonia* was divided into 11 adjacent areas (Table 3). These areas are practically corresponding to the boundaries of the main mountain massifs occurring in Peloponnese and Central Greece (or Sterea). The first area namely, North-West Greece (A) refers to the district of Epirus. Sterea was divided into three areas: West Sterea (B), Central Sterea (C), and East Sterea (D). Peloponnese was divided into seven areas: North-West Peloponnese (E), North-Central Peloponnese (F), North-East Peloponnese (G), Central Peloponnese (H), South-Central Peloponnese (I), Central-East Peloponnese (J) and South-West Peloponnese (K). Each clade was assigned to one or more regions based on its present distribution (Table 3). *C. neocrassa* was treated as an outgroup in this analysis. The number of the ancestral areas was constrained to two as this is the common number of areas occupied by the extant *Codringtonia* species. The analysis was performed using 10,000 random trees generated with PAUP and using the topology of the pruned Bayesian phylogeny as the condensed tree.

Moreover, using the same input files (random and condensed trees), we used a Bayesian MCMC approach to perform a dispersal–vicariance analysis as implemented in the program RASP. In this analysis ancestral ranges were assumed to include either two (similarly to the S-DIVA analysis above) or no more than five areas (the maximum number of areas occupied today by *Codringtonia* species). For the Bayesian MCMC analysis three different assumptions were enforced relating to the ancestral range of the tree' s root: (1) Null: the ancestral range of the root did not include any of the areas that have been defined, (2) Wide: the ancestral range of the root included all the areas that have been defined, and (3) Outgroup: the ancestral range coincided with that of the outgroup species. In this analysis the Jukes-Cantor model was applied, the number of generations was set to 50,000, and the number of chains to 10.

3. Results

3.1. Sequence data analysis

The amplification of all three gene segments for each individual was successful in almost all cases. There was one *Codringtonia* individual for which the amplification of the 16S rDNA sequence was not feasible (Table 1). Additionally, the COII fragment of a single specimen was not produced (Table 1). Nevertheless, these two individuals were included in the analyses after coding the unavailable nucleotide fragments (470 and 558 nucleotides for 16S rDNA and COII, respectively) as missing data.

For the COI gene segment we obtained the sequences of 83 *Codringtonia* specimens. The length of the aligned COI data set consisted of 704 nucleotides, of which 245 were variable and 223 were parsimony informative. For the COII gene fragment we obtained the sequences of 82 *Codringtonia* specimens. There were 254 variable characters out of a total of 558 characters in the COII data set, of which 230 were parsimony informative. Finally, for the 16S rDNA gene we determined the sequences of 82 *Codringtonia* specimens. The aligned 16S rDNA data set comprised 470 characters (including the gaps) of which 185 were variable and 156 were parsimony informative. Alignment-ambiguous regions were not evident in any of the data sets, therefore no sequence data were omitted from the subsequent analyses. In the 16s rDNA fragment there were seven nucleotide positions that were coded as gaps in some of the sequences. Out of these, four were single gaps, and one involved three continuous gaps. The regression analysis performed (results not shown) indicated that substitutions increase linearly with p-distance in all the mtDNA genes datasets. However, substitutions became slightly saturated at the ingroup-outgroup comparisons.

Within and between *Codringtonia* species average genetic distances based on the K-2p model (based on the concatenated dataset) are given in Table 2. Regarding the ingroup sequences, the average divergence over all sequence pairs was 11.5%. Additionally, ingroup and outgroup sequences exhibited a mean divergence value of 26.3%. The genetic distances between nominal *Codringtonia* species ranged from 0.8% to 27.6%. Within *Codringtonia* species the mean genetic distance separating two single sequences varied between 0.2% and 5.2%. The maximum divergence between populations of a single species was as much as 13.5%.

3.2. Phylogenetic analysis

The concatenated data set that was used in the phylogenetic analyses consisted of the sequences of 83 *Codringtonia* specimens and two outgroup specimens. The aligned data set included 1732

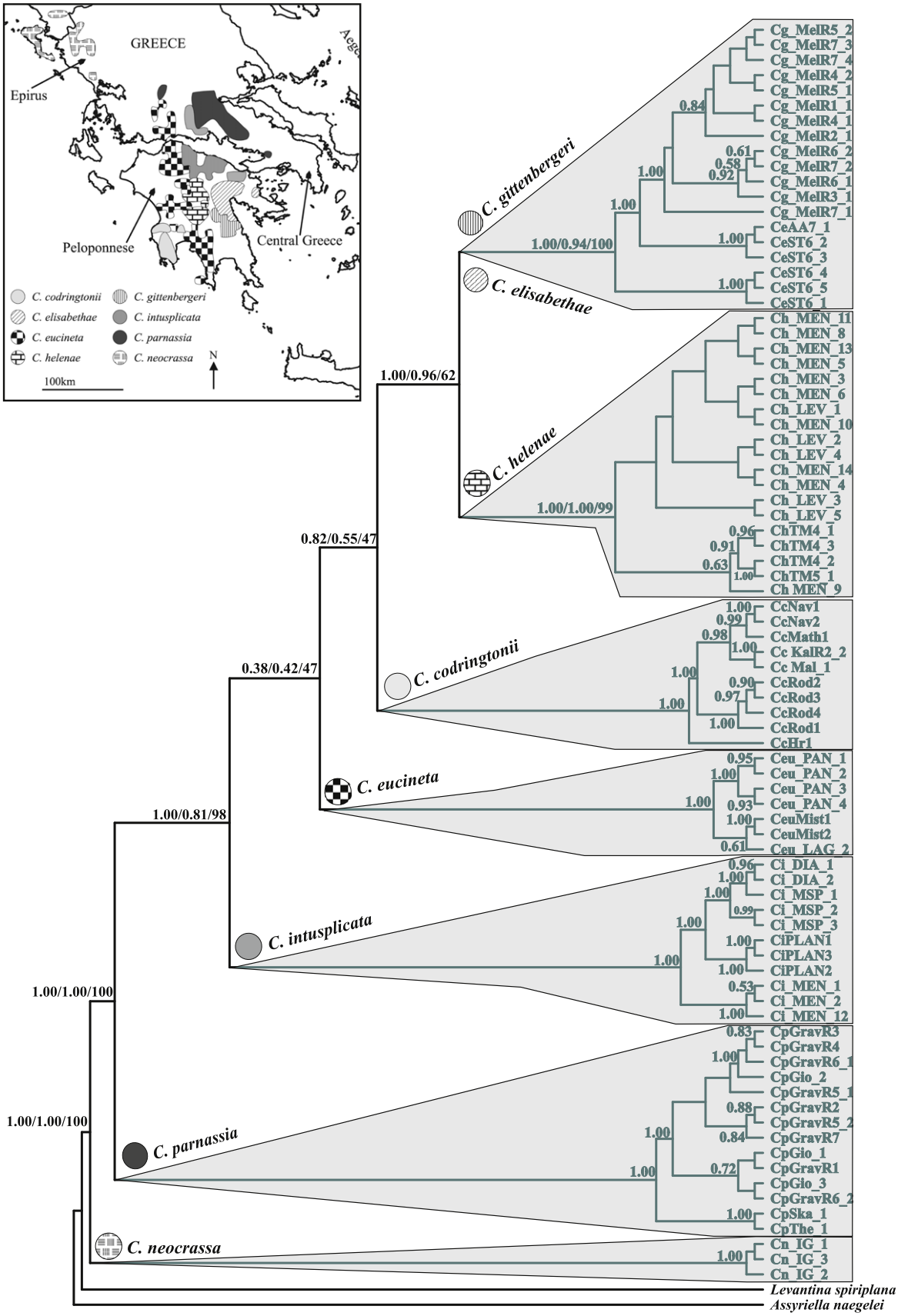


Fig. 2. The 50% majority rule consensus tree of the Bayesian Inference (BI) analysis on the concatenated data set. In the BI analysis a different model was applied to each mtDNA gene. Numbers on branches indicate the posterior probabilities of clades' support (in non-major clades only values above 0.5 are presented). In the major clades of the tree the statistical support of the Maximum Likelihood (ML) and Maximum Parsimony (MP) analysis are also reported (BI/ML/MP). The embedded map shows the distribution of the *Codringtonia* species included in the analysis.

Table 4
Node ages estimated using four different rates of molecular evolution schemes. In parantheses the rates for each mtDNA gene implemented in the analysis.

Node	Low rates (16S rRNA: 1.6%, COI, COII: 2.5%)		Intermediate rates (16S rRNA: 2.5%, COI and COII: 4%)		High rates (16S rRNA: 5%, COI and COII: 8%)		Extreme rates (16S rRNA: 10%, COI and COII: 13%)	
	Node age	HPD_95%	Node age	HPD_95%	Node age	HPD_95%	Node age	HPD_95%
Root	8.16	5.89–10.59	5.22	3.72–6.77	2.59	1.87–3.36	1.47	1.94–1.07
A	7.60	5.50–9.80	4.86	3.51–6.20	2.41	1.74–3.10	1.39	1.02–1.81
B	4.56	3.40–5.70	2.90	2.70–3.60	1.44	1.09–1.82	0.82	0.63–1.03
C	3.44	2.60–4.20	2.17	1.70–2.70	1.10	0.82–1.36	0.61	0.47–0.75
D	3.15	2.40–4.00	1.99	1.52–2.50	1.00	0.77–1.27	0.58	0.44–0.73
E	2.85	2.10–3.60	1.81	1.34–2.30	0.90	0.65–1.15	0.53	0.38–0.69
F	1.58	1.00–2.20	1.00	0.63–1.42	0.50	0.31–0.71	0.28	0.18–0.38
G	2.78	1.60–3.90	1.75	1.00–2.50	0.88	0.53–1.24	0.49	0.31–0.70

characters, all of which were analyzed. Of these, 684 were variable and 609 were parsimony informative. The best-fit models selected by Modeltest 3.7 (Posada and Crandall, 1998) were the HKY + G (shape parameter gamma = 0.1385), HKY + I + G (shape parameter gamma = 1.0289, pinvar = 0.4139) and TrN + G (shape parameter gamma = 0.5573) for the COI, COII and 16S rDNA data partitions, respectively.

The phylogenetic tree of the *Codringtonia* species as inferred by the BI analysis is presented in Fig. 2. The MP and ML analyses produced trees that had an identical topology to that of the BI analysis, but differed in the statistical support of the inferred clades (Fig. 2). In this tree, *C. gittenbergeri* and *C. elisabethae* are forming a strongly supported monophyletic group, a clustering not anticipated on the basis of current taxonomy. Furthermore, *C. elisabethae* appears paraphyletic regarding *C. gittenbergeri*. This group of nominal species appears as the sister clade of the well separated *C. helenae*, albeit with no ssupport. Following that, there is the distinct clade of *C. codringtonii*. *C. eucineta* is the species that shoots off immediately after, however its relationship to the previous *Codringtonia* clades is ambiguous. The relationship of *C. intusplicata* to the preceding *Codringtonia* lineages is strongly supported by all phylogenetic analyses. *C. parnassia* and *C. neocrassa* are the last two species that are well separated from the remaining ones. *C. neocrassa* is the sister group to the remaining species. It should be mentioned that individuals originating from two sampling locations (map codes 11, 12) within the distributional area of *C. gittenbergeri*, are identified as *C. codringtonii* based on their morphological features, and they firmly cluster within the *C. codringtonii* clade as well when the molecular data are taken into account.

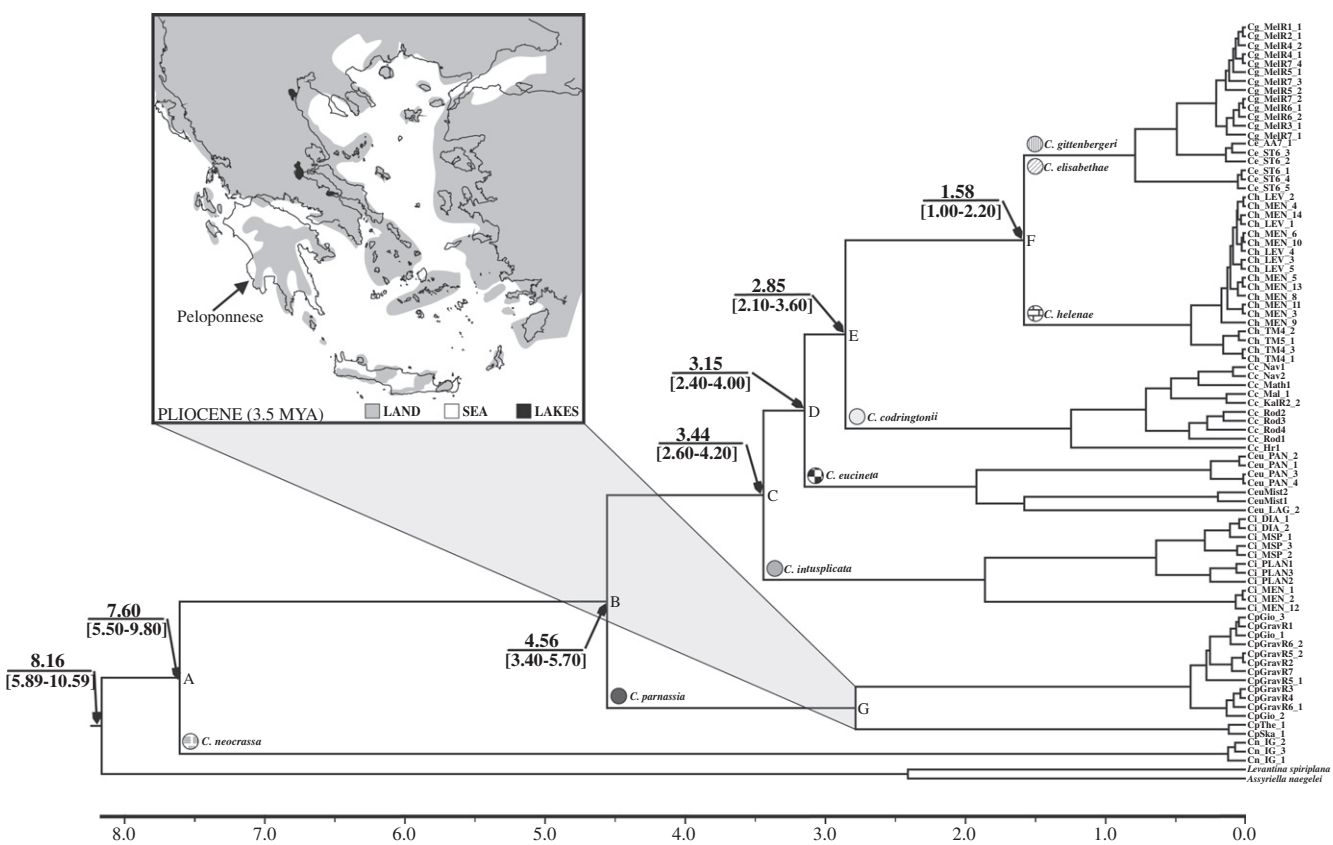


Fig. 3. The ultrametric tree of *Codringtonia* species with the estimates (for each major node) of divergence times obtained with BEAST by applying the low evolutionary rate scenario. Numbers at nodes above the horizontal line are the average estimates of divergence times in Ma. Numbers (Ma) within brackets below the horizontal line are the 95% highest posterior density (HPD) intervals. The embedded map depicts the geographical setting of the region during Pliocene and was drawn based on palaeogeographic data (details in Parmakelis et al., 2006a).

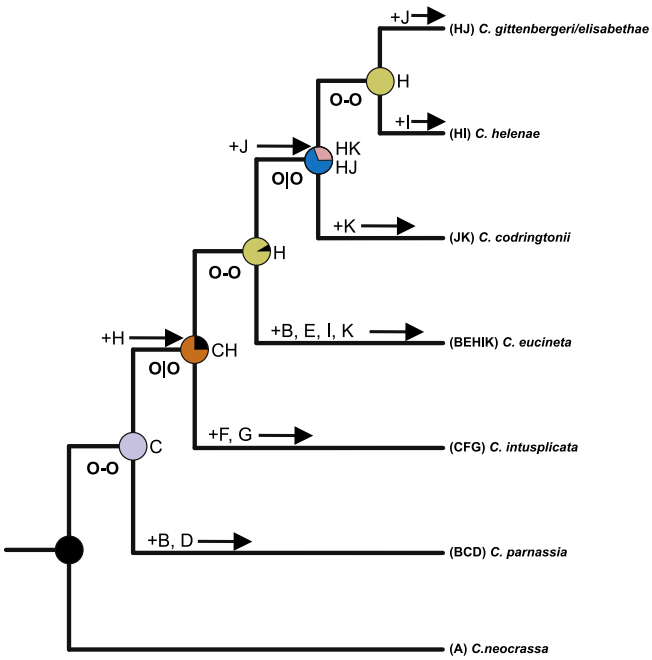


Fig. 4. Dispersal–vicariance scenario for *Codringtonia* reconstructed by statistical dispersal–vicariance (S-DIVA) optimization with the maximum number of area units set to two. The phylogeny is the pruned Bayesian tree of Figure 2. Pie charts at internal nodes represent the marginal probabilities for each alternative ancestral area (denoted with the respective letters) derived by using S-DIVA. Partially or completely black colored pie charts indicate that none of the defined areas obtained a probability larger than 5% and thus all alternative solutions are added together. Vicariance event: **O|O**; Duplication event: **O-O** (speciation within the area); arrow (+): dispersal event.

3.3. Estimation of divergence times

The results of the four different timing schemes of the node ages are presented in Table 4. Among the four timing schemes the one involving the high and extreme values of molecular evolution are less meaningful unless one accepts that the speciation of a whole land snail genus was completed within 2.6 or 1.47 million years. The time estimates inferred both from the intermediate and low evolutionary rates scenario are quite reasonable. Moreover, this scenario is further substantiated since the time estimate of 1.60–3.90 Ma (Table 4) that it provides for node G, and reflects a deep split in the *C. parnassia* clade, is congruent with the existence of an ancient lake separating the east and west populations of *C. parnassia* approximately 3.5 Ma (see embedded map of Fig. 3). Therefore, only the estimates and the respective HPD intervals of the low evolutionary rates scenario are shown in Fig. 3. According to this scenario, mean ages for the divergences between the seven principal clades of *Codringtonia* were in the range of 7.6–1.58 Ma. The mean ages of all divergences leading to extant nominal *Codringtonia* species fall within the Late Miocene–Pleistocene epoch. The *Codringtonia* species of the Peloponnese peninsula were those that speciated last at some point between 3.40 and 1.58 Ma. The HPD intervals associated with these estimates place the time frame of *Codringtonia* speciation in the Peloponnese peninsula within the Pliocene–Pleistocene epoch.

3.4. Biogeographic inferences

All analyses (S-DIVA and all alternatives of Bayesian MCMC) gave almost identical solutions, but with differences in support values. The most likely ancestral distribution scenario presented in Fig. 4 is the one inferred using Bayes-S-DIVA with the constraint of maximum of two areas per ancestral node. The reason for limiting the possible ancestral areas to two was the fact that this is the common number of areas occupied by the extant *Codringtonia* species. Furthermore, in the Bayesian MCMC analysis, where more areas were allowed to be occupied by an ancestor, the obtained results were in essence the same with those presented here, with the exception that additional alternative solutions, yet with lower support values, were proposed. Nevertheless, in those solutions adjacent areas would each obtain a portion of the ancestor occurrence probability and an increased number of vicariance events was not evident (a common result when the number of ancestral areas is high).

According to the S-DIVA analysis the ancestor of all *Codringtonia* species had a limited distribution in Central Sterea (C: 100%) (Fig. 4). Within this area two lineages successively diverged (duplication event, i.e. speciation within the area), giving rise to *C. parnassia* and the clade containing the ancestor of the rest of *Codringtonia* species. *C. parnassia* expanded its distribution via dispersal only within Sterea both to the west (B) and to the east (D), whereas the ancestor of the remaining five species possibly dispersed to Peloponnese (H). In Central Sterea and Central Peloponnese (area CH: 75.75%) a vicariance event gave rise to *C. intusplicata* and the common ancestor of *C. eucineta, C. codringtonii, C. gittenbergeri/elisabethae* and *C. helenae*. Following that, *C. intusplicata* that was formed in Central Sterea expanded its distribution towards North-East (G) and North-Central (F) Peloponnese. In Central Peloponnese (H: 92.82%) the common ancestor of *C. eucineta*, *C. codringtonii, C. gittenbergeri/elisabethae* and *C. helenae* is found. Through a speciation event *C. eucineta* was formed there and dispersed to the south (K, I) and to the north colonizing North-West Peloponnese (E) and West Sterea (B), whereas the common ancestor of the remaining three species (*C. codringtonii, C. gittenbergeri/elisabethae* and *C. helenae*) maintained a limited distribution in Central (H) and Central-East Peloponnese (J). The area (HJ: 66.53%) occupied by the ancestor lineage was inherited by *C. condringtonii* and the ancestor of *C. gittenbergeri/elisabethae* and *C. helenae*. *C. condringtonii* dispersed to South-West Peloponnese (K), but its populations probably were extinct in the intermediate areas (i.e. in South-Central Peloponnese). On the other hand in Central Peloponnese (H: 100%) two species were formed; *C. helenae* that dispersed to South-Central Peloponnese (I) and *C. gittenbergeri/elisabethae* that dispersed to Central-East Peloponnese (J). The three scenarios (null, wide, outgroup) gave almost identical solutions.

4. Discussion

4.1. Levels of divergence, mitochondrial phylogeny, and taxonomic implications

The level of mtDNA divergence recorded both between and within *Codringtonia* species (Table 2) is very high but within the range reported for other land-snail genera (Chiba, 1999; Goodacre and Wade, 2001; Johnson et al., 2010; Parmakelis and Mylonas, 2004; Parmakelis et al., 2003; Thomaz et al., 1996; Watanabe and Chiba, 2001). Compared to the divergence levels of other helicid rock-dwelling genera distributed in the Mediterranean, the levels reported in the present study are well above those of *Marmorana* (Fiorentino et al., 2008) but very similar to those estimated for *Iberus* (Elejalde et al., 2008). As can be seen from Table 2, a gap is present in the distribution of the genetic distances between *Codringtonia* species. This gap is attributed to the high level of sequence divergence separating the northwestern Greece *Codringtonia* species, namely *C. neocrassa* from all remaining *Codringtonia* species. Taking into account that all *Codringtonia* species

reported from Greece have been sampled and each species (except *C. neocrassa*) is represented from more than one population, the recorded gap cannot be the result of inadequate sampling. However, this issue cannot be further explored since we repeatedly tried to locate additional *C. neocrassa* populations from the district of Epirus, but this was not feasible. Therefore, there are two hypotheses that can explain the observed high divergence between the *C. neocrassa* clade and the other *Codringtonia* species. The first hypothesis would have to involve the extinction of several intervening species, whereas the second hypothesis would require *C. neocrassa* to belong to a completely separate genus distantly related to *Codringtonia*. Unfortunately, no evidence can be provided to support or reject any of the scenarios and this issue remains unresolved. However, we have to mention that we are in favor of *C. neocrassa* being the single, possibly remnant, species of a different to *Codringtonia* genus with a restricted contemporary distribution that is however ecologically and morphologically partially similar to *Codringtonia*.

According to the phylogenetic tree of Fig. 2, there are six distinct phylogenetic clades and one additional species ambiguously related to its congeners. Thus, the mtDNA phylogeny is partially congruent with the latest systematic review of the genus (Subai, 2005). Six (*C. helenae*, *C. codringtonii, C. eucineta, C. intusplicata, C. parnassia* and *C. neocrassa*) out of the eight nominal species of *Codringtonia* reported in Subai (2005), have been validated by the mtDNA phylogeny as well, while the remaining two (*C. gittenbergeri* and *C. elisabethae*) form a single clade. Hybridization between species could account for the incongruence between the mtDNA phylogeny and nominal species. However, hybridization events have not been reported in *Codringtonia*, and no hybridization can be claimed to exist between any of the nominal species based on morphological grounds. On the other hand, incomplete lineage sorting (Sauer and Hausdorf, 2010) could also be one of the causes for the observed paraphyly. Consequently, in the light of the molecular data a taxonomic revision of the genus is deemed necessary especially since all the species of the genus are considered vulnerable (Legakis and Maragou, 2009). Moreover, the discrepancies between the mtDNA phylogeny of the present study and species delimitations based on morphology, highlights the ambiguity of the morphological characters used up to now in *Codringtonia* species delimitations. The case of *C. gittenbergeri* forming a monophyletic clade with *C. elisabethae* is an example of the ambiguity involved in species identification based solely on morphological characters. It is now imperative that new morphological characters are sought that will more effectively discriminate between *Codringtonia* species. Towards this direction, the inclusion of nuclear sequence data in the molecular phylogeny of the genus will probably elucidate the relationship of *C. intusplicata* with the remaining species. Finally, the fact that two *C. codringtonii* individuals were sampled from within the *C. gittenbergeri* species range can be attributed either to human translocations or to *C. codringtonii* having a wider distribution than what previously considered. We are in favor of the latter scenario since no obvious reason exists for such species-specific human translocations. If human mediated dispersal was involved we would expect to see a wider species admixture involving more species and areas.

4.2. Biogeography and time frame of Codringtonia species differentiation

Theoretically there are two major biogeographic scenarios that could account for the present day distribution of *Codringtonia* species in the area of Peloponnese and Sterea. The first scenario is that of an ancestor being distributed in the above mentioned areas and following a series of vicariance events within these regions, where the different *Codringtonia* species were formed. That parsimonious scenario is expected under ideal conditions that rule out dispersal and duplication events. The second scenario is that of an ancestor species being present somewhere within the distribution area of the extant *Codringtonia* species and through a series of dispersal events gradually expanded its distribution. During the expansion course radiation took place and the *Codringtonia* species present today were formed. Based on the dispersal–vicariance analysis performed the latter scenario seems to be the dominant one, whereas vicariance phenomena cannot be ruled out but seem as locally confined. Thus, the most probable scenario supports a north-to-south spread of the genus with the ancestral area being Central Sterea (C). This biogeographic scenario involves several dispersal events as summarized in Fig. 4, as well as duplication (speciation) and vicariance phenomena. In total, 13 dispersal, two vicariance and three duplication events were required for *Codringtonia* to speciate and attain its present day distribution.

However, it remains unclear what were the actual events that caused the divergence of *Codringtonia* species both in Central Greece and the Peloponnese peninsula. It can only be stated that according to the time estimates of clade divergence obtained from the most plausible evolutionary rates scenario, *Codringtonia* (considering that *C. neocrassa* belongs to a different genus) has been differentiating in the region for 4.5 My (Fig. 3). Focusing on the clades of Peloponnese, it is evident that the cladogenetic events initiated approximately 3.44 Ma, a time point that seems to be critical for that part of mainland Greece. Around that time Peloponnese was disconnected from Central Greece and started expanding in area towards the size it presently occupies (embedded map in Fig. 3). Similarly, this time frame coincides with the establishment of the Mediterranean climate in the region that occurred 3.2 Ma (Blondel and Aronson, 1999). Obviously, the historical process occurring in these areas of mainland Greece during that time provided the setting for the ancestor lineages of *Codringtonia* to disperse, differentiate and speciate. A puzzling issue relating to the biogeographic scenario adopted is the dispersal event of the ancestor from Sterea to the Peloponnese peninsula. The areas involved in this event are Central Sterea (C) and Central Peloponnese (H) and the dispersal event occurred from C towards H. It is interesting that in between the areas C and H, area F (North-Central Peloponnese) exists and yet it was not occupied by the ancestor. A possible explanation for this is derived from the time estimates of the cladogenetic events (of the most plausible evolutionary rates scenario) presented in Fig. 3. Most probably area F was not present during the dispersal event under question. The split between *C. intusplicata* and the remaining *Codringtonia* species of Peloponnese took place approximately 3.44 Ma (Fig. 3). During that time a large portion or the total area of region F was probably submerged (see embedded map of Fig. 3). Unfortunately, the palaeogeographic data relating to these parts of mainland Greece are very limited; therefore the exact identification of those historical processes that could most likely account for the present day distributional patterns of *Codringtonia* species is not possible. At the same time, one can assume that during this statistically supported north-to-south spread of the genus and in the absence of significant niche shifts, cold adapted species might have been forced to colonize increasingly higher altitudes towards the south. We must note that at that time (3.5–2.5 Ma) the climate in the south Mediterranean shows increased temperatures but unchanged precipitation resulting in drier environmental conditions (Salzmann et al., 2008). It might also be feasible that this southward spread triggered extensive niche shifts, including the adaptation to more warm and arid habitats at lower altitudes. In this case, the Quaternary climate changes would result in different responses of these arid-adapted species in terms of range expansions and contractions during glacial and inter/post-glacial when compared to their more cold-tolerant, northern congeners. Currently, data relating to habitat and climatic preferences as well as data concerning the physiological characteristics of the involved species are being collected and an

investigation of whether or not ecological shifts have occurred will be performed. Besides this, the resolution of the evolutionary processes shaping the present day distribution of *Codringtonia* lineages would greatly benefit within the context of a comparative phylogeographic framework including relevant studies of sympatric species. Presently no such studies are available from the study area, whereas apart from the palaeogeographic, the palaeoclimatic data for the region are also either completely missing or vague. In this direction, the present work raises several important issues concerning this largely understudied and least explored region of the Mediterranean basin.

Acknowledgments

We are grateful to Panayiotis Pafilis (Univ. of Athens) for providing specimens of *Codringtonia* from Peloponnese and to Katerina Vardinoyannis (Natural History Museum of Crete) for providing specimens of *Codringtonia* and *Levantina* from Central Greece and Chalki island, respectively. Our most sincere thanks are also due to Zoltan Feher (Hungarian Museum of Natural History, HMNH) for providing the samples of *Assyriella naegelei*. Our thanks to Nikos Poulakakis (Natural History Museum of Crete, NHMC) for allowing us to perform the BI analysis in the parallel version of MrBayes 3.1.2 running on the NHMC computer cluster maintained in his lab. AP also wishes to thank the NKUOA undergraduate students Maria Pachi, Panayiotis Poulikarakos and Anastasios Mitrakos for helping in the field collection of specimens. Thanks are also due to Peter Subai for providing valuable literature regarding the studied land-snail genus. Finally, we wish to express our gratitude to Kostas Triantis and two anonymous reviewers for providing comments that significantly improved an earlier version of the manuscript.

References

Akaike, H., 1974. New look at statistical-model identification. IEEE Transactions on Automatic Control Ac 19, 716–723.
Beerli, P., Hotz, H., Uzzell, T., 1996. Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for aegean water frogs. Evolution 50, 1676–1687.
Bittkau, C., Comes, H.P., 2005. Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean Nigella arvensis alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. Molecular Ecology 14, 4065–4083.
Blondel, J., Aronson, J., 1999. Biology and Wildlife of the Mediterranean Region. Oxford University Press, Oxford.
Chiba, S., 1999. Accelerated evolution of land snails Mandarina in the oceanic Bonin Islands: evidence from mitochondrial DNA sequences. Evolution 53, 460–471.
Creutzburg, N., 1963. Paleogeographic evolution of crete from miocene till our days. Cretan Annals 15 (16), 336–342.
de Weerd, D.R.U., Gittenberger, E., 2005. Towards a monophyletic genus Albinaria (Gastropoda, Pulmonata): the first molecular study into the phylogenetic position of eastern Albinaria species. Zoological Journal of the Linnean Society 143, 531–542.
de Weerd, D.R.U., Groenenberg, D.S.J., Schilthuizen, M., Gittenberger, E., 2006. Reproductive character displacement by inversion of coiling in clausiliid snails (Gastropoda, Pulmonata). Biological Journal of the Linnean Society 88, 155–164.
de Weerd, D.R.U., Piel, W.H., Gittenberger, E., 2004. Widespread polyphyly among Alopiinae snail genera: when phylogeny mirrors biogeography more closely than morphology. Molecular Phylogenetics and Evolution 33, 533–548.
de Weerd, D.R.U., Schneider, D., Gittenberger, E., 2005. The provenance of the Greek land snail species Isabellaria pharsalica: molecular evidence of recent passive long-distance dispersal. Journal of Biogeography 32, 1571–1581.
Dermitzakis, D.M., 1990. Paleogeography, geodynamic processes and event stratigraphy during the late Cenozoic of the Aegean area. Accademia Nazionale de Lincei 85, 263–288.
Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biology 4, 699–710.
Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology 7, 214.
Drummond, A.J., Rambaut, A., 2009. Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. In: Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.-M. (Eds.), The phylogenetic handbook a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. University Press, Cambridge, pp. 564–590.
Elejalde, M.A., Madeira, M.J., Arrebola, J.R., Munoz, B., Gomez-Moliner, B.J., 2008. Molecular phylogeny, taxonomy and evolution of the land snail genus Iberus (Pulmonata: Helicidae). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 46, 193–202.
Felsenstein, J., 1985. Phylogenies and the comparative method. American Naturalist 125, 1–15.
Fiorentino, V., Salomone, N., Manganelli, G., Giusti, F., 2008. Phylogeography and morphological variability in land snails: the Sicilian Marmorana (Pulmonata, Helicidae). Biological Journal of the Linnean Society 94, 809–823.
Giokas, S., Karkoulis, P., Pafilis, P., Valakos, E., 2007. Relictual physiological ecology in the threatened land snail Codringtonia helenae: a cause for decline in a changing environment? Acta Oecologica – International Journal of Ecology 32, 269–278.
Gittenberger, E., Piel, W.H., Groenenberg, D.S.J., 2004. The Pleistocene glaciations and the evolutionary history of the polytypic snail species Arianta arbustorum (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 30, 64–73.
Goodacre, S.L., Wade, C.M., 2001. Patterns of genetic variation in Pacific island land snails: the distribution of cytochrome b lineages among Society Island Partula. Biological Journal of the Linnean Society 73, 131–138.
Hadjicharalambous, E., 1996. Contribution to the Study of the Ecology and Biology of the Genus Codringtonia Kobelt, 1898 (Gastropoda, Pulmonata). Biology. University of Athens, Athens, p. 284.
Harris, A.J., Xiang, Q.Y., 2009. Estimating ancestral distributions of lineages with uncertain sister groups: a statistical approach to dispersal–vicariance analysis and a case using Aesculus L. (Sapindaceae) including fossils. Journal of Systematic and Evolutionary 47, 349–368.
Huelsenbeck, J.P., Crandall, K.A., 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. Annual Review of Ecology and Systematics 28, 437–466.
Hugall, A., Moritz, C., Moussalli, A., Stanisic, J., 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail Gnarosophia bellendenkerensis (Brazier 1875). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 6112–6117.
Johnson, M.S., O'Brien, E.K., Fitzpatrick, J.J., 2010. Deep, hierarchical divergence of mitochondrial DNA in Amplirhagada land snails (Gastropoda: Camaenidae) from the Bonaparte Archipelago, Western Australia. Biological Journal of the Linnean Society 100, 141–153.
Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 111–120.
Klossa-Kilia, E., Kilias, G., Tryfonopoulos, G., Koukou, K., Sfenthourakis, S., Parmakelis, A., 2006. Molecular phylogeny of the Greek populations of the genus Ligidium (Isopoda, Oniscidea) using three mtDNA gene segments. Zoologica Scripta 35, 459–472.
Legakis, A., Maragou, P., 2009. The Red Data Book of the Threatened Animal Species of Greece. Hellenic Zoological Society, Athens (In Greek).
Lewis, P.O., 1998. A genetic algorithm for maximum-likelihood phylogeny inference using nucleotide sequence data. Molecular Biology and Evolution 15, 277–283.
Medail, F., Diadema, K., 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. Journal of Biogeography 36, 1333–1345.
Medail, F., Quezel, P., 1999. Biodiversity hotspots in the Mediterranean basin: setting global conservation priorities. Conservation Biology 13, 1510–1513.
Meulenkamp, J.E., 1985. Aspects of the late Cenozoic evolution of the Aegean region. In: Stanley, D.J., Wezel, F.C. (Eds.), Geological Evolution of the Mediterranean Basin. Springer, New York, pp. 307–321.
Nylander, J.A.A., Olsson, U., Alstrom, P., Sanmartin, I., 2008. Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: a Bayesian approach to dispersal–vicariance analysis of the thrushes (Aves: Turdus). Systematic Biology 57, 257–268.
Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Keskin, B., Vogler, A.P., 2009. Comparative phylogeography of tenebrionid beetles in the Aegean archipelago: the effect of dispersal ability and habitat preference. Molecular Ecology 18, 2503–2517.
Parmakelis, A., Klossa-Kilia, E., Kilias, G., Triantis, K.A., Sfenthourakis, S., 2008. Increased molecular divergence of two endemic Trachelipus (Isopoda, Oniscidea) species from Greece reveals patterns not congruent with current taxonomy. Biological Journal of the Linnean Society 95, 361–370.
Parmakelis, A., Mylonas, M., 2004. Dispersal and population structure of two sympatric species of the mediterranean land snail genus Mastus (Gastropoda, Pulmonata, Enidae). Biological Journal of the Linnean Society 83, 131–144.
Parmakelis, A., Pfenninger, M., Spanos, L., Papagiannakis, G., Louis, C., Mylonas, M., 2005. Inference of a radiation in Mastus (Gastropoda, Pulmonata, Enidae) on the island of Crete. Evolution 59, 991–1005.
Parmakelis, A., Spanos, E., Papagiannakis, G., Louis, C., Mylonas, M., 2003. Mitochondrial DNA phylogeny and morphological diversity in the genus Mastus (Beck, 1837): a study in a recent (Holocene) island group (Koufonisi, South-East Crete). Biological Journal of the Linnean Society 78, 383–399.
Parmakelis, A., Stathi, I., Chatzaki, M., Simaiakis, S., Spanos, L., Louis, C., Mylonas, M., 2006a. Evolution of Mesobuthus gibbosus (Brulle, 1832) (Scorpiones: Buthidae) in the northeastern Mediterranean region. Molecular Ecology 15, 2883–2894.
Parmakelis, A., Stathi, I., Spanos, L., Louis, C., Mylonas, M., 2006b. Phylogeography of Iurus dufoureius (Brulle, 1832) (Scorpiones, Iuridae). Journal of Biogeography 33, 251–260.
Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817–818.
Poulakakis, N., Lymberakis, P., Antoniou, A., Chalkia, D., Zouros, E., Mylonas, M., Valakos, E., 2003. Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizard

Podarcis erhardii (Squamata: Lacertidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 28, 38–46.
Poulakakis, N., Lymberakis, P., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M., 2005a. Phylogenetic relationships and evolutionary history of snake-eyed skink Ablepharus kitaibelii (Sauria: Scincidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 34, 245–256.
Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Pafilis, P., Zouros, E., Mylonas, M., 2005b. Phylogeography of Balkan wall lizard (Podarcis taurica) and its relatives inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Ecology 14, 2433–2443.
Poulakakis, N., Sfenthourakis, S., 2008. Molecular phylogeny and phylogeography of the Greek populations of the genus Orthometopon (Isopoda, Oniscidea) based on mitochondrial DNA sequences. Zoological Journal of the Linnean Society 152, 707–715.
Ronquist, F., 1997. Dispersal–vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. Systematic Biology 46, 195–203.
Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19, 1572–1574.
Salzmann, U., Haywood, A.M., Lunt, D.J., Valdes, P.J., Hill, D.J., 2008. A new global biome reconstruction and data-model comparison for the Middle Pliocene. Global Ecology and Biogeography 17, 432–447.
Sauer, J., Hausdorf, B., 2010. Reconstructing the evolutionary history of the radiation of the land snail genus Xerocrassa on Crete based on mitochondrial sequences and AFLP markers. BMC Evolutionary Biology 10, 299.
Sfenthourakis, S., Legakis, A., 2001. Hotspots of endemic terrestrial invertebrates in southern Greece. Biodiversity and Conservation 10, 1387–1417.
Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. Annals of the Entomological Society of America 87, 651–701.
Sotiropoulos, K., Eleftherakos, K., Dzukic, G., Kalezic, M.L., Legakis, A., Polymeni, R.M., 2007. Phylogeny and biogeography of the alpine newt Mesotriton alpestris (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 45, 211–226.
Steininger, F.F., Roegl, F., 1984. Paleogeography and palinspastic reconstruction of the Neogene of the Mediterranean and Paratethys. In: Dixon, J.E., Robertson, A.H.F. (Eds.), The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 659–668.
Subai, P., 2005. Revision of the genus Codringtonia Kobelt 1898 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae: Helicelinae). Archiv fuer Molluskenkunde 134, 65–119.
Swofford, D.L., 2002. PAUP*-Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
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.
Thanou, E., Fraguedakis-Tsolis, S., Chondropoulos, B., 2005. MtDNA variation and evaluation of phylogenetic relationships among karyotypically polymorphic populations of Microtus (Terricola) thomasi (Arvicolidae, Rodentia) from Greece. Biological Journal of the Linnean Society 84, 55–68.
Thomaz, D., Guiller, A., Clarke, B., 1996. Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences 263, 363–368.
Triantis, K.A., Mylonas, M., 2009. Greek Islands biology. In: Gillespie, R., Glague, D.A. (Eds.), Encyclopedia of Islands. University of California Press, Berkeley, pp. 388–392.
Tryfonopoulos, G., Thanou, E., Chondropoulos, B., Fraguedakis-Tsolis, S., 2008. MtDNA analysis reveals the ongoing speciation on Greek populations of Microtus (Terricola) thomasi (Arvicolidae, Rodentia). Biological Journal of the Linnean Society 95, 117–130.
Van Riel, P., Jordaens, K., Van Houtte, N., Martins, A.M.F., Verhagen, R., Backeljau, T., 2005. Molecular systematics of the endemic Leptaxini (Gastropoda: Pulmonata) on the Azores islands. Molecular Phylogenetics and Evolution 37, 132–143.
Watanabe, Y., Chiba, S., 2001. High within-population mitochondrial DNA variation due to microvicariance and population mixing in the land snail Euhadra quaesita (Pulmonata: Bradybaenidae). Molecular Ecology 10, 2635–2645.
Winnepenninckx, B., Backeljau, T.R.D.W., 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. Trends in Genetics 9, 407.
Yu, Y., Harris, A.J., He, X.J., 2010. Statistical Dispersal–Vicariance Analysis (S-DIVA): a tool for inferring biogeographic histories. Molecular Phylogenetics and Evolution 56, 848–850.
Zwickl, D.J., 2006. Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets Under the Maximum Likelihood Criterion. The University of Texas, Texas.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
(Τελευταία ενημέρωση: Ιούνιος 2013)

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΚΟΤΣΑΚΙΟΖΗ
Βιολόγος, Υποψήφια Διδάκτορας, ΕΚΠΑ
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τόπος και ημερομηνία γέννησης: Μυτιλήνη Λέσβου, 17-10-1984.
Tel: +30-210-727-4740, **e-mail:** pkotsakiozi@biol.uoa.gr
Web page: http://uaeco.biol.uoa.gr/uameco

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2007-2013: **Μεταπτυχιακές σπουδές για τη λήψη Διδακτορικού Διπλώματος**, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: Συγκριτική μελέτη των φυσιολογικών προσαρμογών στα χερσαία σαλιγκάρια του γένους *Codringtonia* Kobelt 1898. Επιβλέπων: Αναπλ. Καθηγητής Ε.Δ. Βαλάκος.

2006: **Πτυχίο Βιολογίας** (2002-2006), Βαθμός πτυχίου (6,82) «Λίαν Καλώς».

2002: Αριστούχος απόφοιτος Ενιαίου Λυκείου Πέτρας Λέσβου.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1. **2008-2009:** Ερευνητικό πρόγραμμα ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΣ (φορέας χρηματοδότησης ΕΚΠΑ): Οικοφυσιολογικές προσαρμογές του γένους *Codringtonia (Gastropoda, Pulmonata)*. Συντονιστής: Αν. Καθηγητής Ε.Δ. Βαλάκος. Συμμετοχή στο πρόγραμμα: κύρια ερευνήτρια.
2. **01/2010-12/2010:** Μέλος της ερευνητικής ομάδας στο ερευνητικό πρόγραμμα με τίτλο *«Η γενετική διαφοροποίηση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και η συν-εξέλιξη του με το πυρηνικό DNA σαν μηχανισμός ειδογένεσης στα χερσαία σαλιγκάρια της Ελλάδας»*. Συντονιστής: Επικ. Καθηγητής Α. Παρμακέλης. Συμμετοχή στο πρόγραμμα: ερευνήτρια.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Kotsakiozi P*.,** Pafilis P., Giokas S., Valakos E.D., 2012. A comparison of the physiological responses of two land snail species with different distributional ranges. *Journal of Molluscan Studies, 78 (2): 217-224.*
2. **Kotsakiozi, P.**, Parmakelis, A., Giokas, S., Papanikolaou, I., Valakos, E.D. 2012. Mitochondrial phylogeny and biogeographic history of the Greek endemic land-snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution, 62: 681-692*.
3. Parmakelis, A., **Kotsakiozi, P.**, Rand, D. 2013. Animal mitochondria, positive selection and cyto-nuclear coevolution: insights from pulmonates. *PLoS ONE 8(4): e61970. doi:10.1371/journal.pone.0061970.*
4. Parmakelis, A., **Kotsakiozi, P.,** Tropea, G., Yağmur, E.A., Stathi, I., Fet, V., Soleglad, M.E. 2013. DNA markers confirm presence of *Euscorpius avcii* Tropea et al., 2012 (Scorpiones: Euscorpiidae) on Samos Island, Greece. *Euscorpius-Occasional Publications in Scorpiology 161: 1-6.*
5. **Kotsakiozi P*.,** Rigal F., Valakos E.D., Parmakelis A., 2013. Decomposing the effects of intra-species variability, phylogeny, space and climate on the evolution of shell morphology: insights from the Greek endemic land snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). *Biological Journal of the Linnean Society, IN PRESS.*
6. Parmakelis A., **Kotsakiozi P.,** Stathi I., Poulikarakou S., Fet V., 2013. Molecular phylogeny of the Mediterranean scorpion genus *Euscorpius* Thorell 1876 (Scorpiones: Euscorpiidae) from Greece and adjacent regions. *Biological Journal of the Linnean Society, IN PRESS*.

7. **Kotsakiozi P*.,** Parmakelis A., Aggeli, I.K., Giokas, S., Gaitanaki, C., Valakos E.D., 2013. Water management and Heat-Shock proteins' expression in *Codringtonia* species, a study within a phylogenetic framework. ***IN PREPARATION.***

***** εργασίες στις οποίες είμαι η αντεπιστέλλων συγγραφέας.

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Parmakelis A., **Kotsakiozi P.,** Poulikarakou S., Stathi I., Fet V. Ancient scorpions of Greece: DNA phylogeny of Euscorpius (Scorpiones, Euscorpiidae). 12th International Congress of on the Zoogeography and Ecology of Greece and adjacent regions (12th ICZEGAR). Athens, Greece, June 2012.
2. **Kotsakiozi P.,** Parmakelis A., Giokas S., Valakos E.D. Water balance and morphological constraints in relation to distributional patterns in a land snail genus of Greece. Thermal Adaptation Science Meeting, Evolutionary and plastic responses of animal growth to different temperatures: adaptations and constraints. 28-30 April, 2011, Tartu, Estonia.
3. **Kotsakiozi P.,** Papanikolaou E., Parmakelis A., Giokas S., Pafilis P., Valakos E.D. The phylogeny of the endemic land snail genus of Greece *Codringtonia* (Gastropoda, Pulmonata) based on mtDNA sequence data. 11th International Congress of on the Zoogeography and Ecology of Greece and adjacent regions (11th ICZEGAR). Heraklion, Crete, Greece, 21-25 September 2009.
4. Giokas S., **Kotsakiozi P.,** Karkoulis P., Pafilis P., Valakos E.D. How variable are the seasonal ecophysiological adaptations of land snails in semi-arid ecosystems? 10th international congress on the zoogeography and ecology of Greece and adjacent regions, Patra, June 2006.

ΕΘΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Σιταρά Κ., **Κοτσακιόζη Π.,** Παρμακέλης Α. Κελυφική διαφοροποίηση του γένους *Mastus* στην Κρήτη με τη χρήση γεωμετρικής μορφομετρίας. 35ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Ναύπλιο, 23-25 Μαΐου 2013.
2. **Κοτσακιόζη Π.,** Παρμακέλης Α., Αγγελή Ι.Κ., Γαϊτανάκη Κ., Γκιώκας Σ., Βαλάκος Ε. Έκφραση των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ και αντίσταση στην αφυδάτωση στα είδη *Codringtonia* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Οικολογίας, «Οικολογικές διαδικασίες στο χώρο και το χρόνο». Αθήνα, Οκτώβριος 2012.
3. **Κοτσακιόζη Π.,** Παρμακέλης Α., Γκιώκας Σ., Βαλάκος Ε. Κελυφική διαφοροποίηση του γένους *Codringtonia* και η σχέση της με τη φυλογένεση και το περιβάλλον. 33ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Έδεσσα, 19-21 Μαϊου 2011.
4. **Κοτσακιόζη Π.,** Παρμακέλης Α., Κωνσταντάκης Α., Γκιώκας Σ., Βαλάκος Ε.Δ. Σχέσεις της οικονομίας νερού και της αντίστασης στην αφυδάτωση με το εύρος εξάπλωσης στα είδη του γένους *Codringtonia* (Gastropoda, Pulmonata). 5ο Πανελλήνιο συνέδριο οικολογίας, Πάτρα, Οκτώβριος 2010.
5. Κωνσταντάκης Α., **Κοτσακιόζη Π.,** Γκιώκας Σ., Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. Εποχικά πρότυπα φυσιολογίας στο *Codringtonia eucineta*. 32ο Πανελλήνιο συνέδριο ΕΕΒΕ, Καρπενήσι, 20-22 Μαϊου 2010.
6. **Κοτσακιόζη Π.,** Παπανικολάου Ε, Παρμακέλης Α. Γκιώκας Σ, Βαλάκος Ε.Δ. Επίπεδα μιτοχονδριακής διαφοροποίησης στα είδη *Codringtonia* της Ελλάδας (Γαστερόποδα, Πνευμονοφόρα). 32ο Πανελλήνιο συνέδριο ΕΕΒΕ, Καρπενήσι, 20-22 Μαϊου 2010.
7. Φίρμπας Π., **Κοτσακιόζη Π**., Γκιώκας Σ., Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. Οικοφυσιολογικές αποκρίσεις του είδους *Eobania vermiculata*. Η ζωή ανάμεσα σε διαπαύσεις. 31ο Πανελλήνιο συνέδριο ΕΕΒΕ, Πάτρα, Μάιος 2009.

8. Σαγώνας Κ., **Κοτσακιόζη Π.**, Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων σε είδη του Γένους Podarcis. 31° Πανελλήνιο συνέδριο ΕΕΒΕ, Πάτρα, Μάιος 2009.
9. **Κοτσακιόζη Π.,** Παρμακέλης Α. Γκιώκας Σ., Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. Οικοφυσιολογικές προσαρμογές των σαλιγκαριών της οικογένειας Helicidae κάτω από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Περιβάλλον ή φυλογένεση; 4° Πανελλήνιο συνέδριο οικολογίας, Βόλος, Οκτώβριος 2008.
10. **Κοτσακιόζη Π**., Γκιώκας Σ., Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. Οικοφυσιολογικές αποκρίσεις δύο ειδών χερσαίων σαλιγκαριών κατά τη διαθέριση. Ευκαιριακές και παγιωμένες στρατηγικές. 30° Πανελλήνιο συνέδριο ΕΕΒΕ, Θεσσαλονίκη, Μάιος 2008.
11. **Κοτσακιόζη Π.,** Γκιώκας Σ., Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. Εποχικές μεταβολές σε πρότυπα φυσιολογίας του χερσαίου σαλιγκαριού *Helix aspersa*: Μια ιστορία επιτυχίας. 29° Πανελλήνιο συνέδριο ΕΕΒΕ, Καβάλα, Μάιος 2007.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Σύνοψη ερευνητικού έργου

- ✓ **6 δημοσιευμένες εργασίες** σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά, **I.F.=13,98** (2,79/δημοσίευση)
- ✓ **4 αναφορές** στις δημοσιευμένες εργασίες, **h-index=2** (Google Scholar, Ιούλιος 2013)
- ✓ **371** πρωτότυπες καταχωρήσεις στη διεθνή τράπεζα γονιδίων (GeneBank of NCBI)
- ✓ **2** υποτροφίες για προπτυχιακές και μεταπτυχιακές σπουδές