



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Δομή πληθυσμών των ειδών του γένους
Codringtonia Kobelt 1898 & διερεύνηση υβριδικής
ζώνης με χρήση μοριακών δεικτών



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Παπαδάκη Χρυσούλα

Βιολόγος

Αθήνα, 2021

Επιβλέπων Καθηγητής

Παρμακέλης Αριστείδης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Οικολογίας και
Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παρμακέλης Αριστείδης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Τριάντης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Βαλάκος Δ. Ευστράτιος

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ



Στη μεγάλη νύχτα
Στη μικρή ημέρα
Στο μεγάλο ποτέ
Στο μικρό πάντα
Θα σε αγαπώ

Αυτό του τραγουδούσε.

|Ζακ Πρεβέρ| Στο μεγάλο ποτέ|

Στη μνήμη του πατέρα μου...
Για τον υποδειγματικό αγώνα σου.



Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
SUMMARY	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 - ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Γενικά	15
1.1.1 Χερσαία Γαστερόποδα	15
1.1.2 Χερσαία Μαλακοπανίδα Ελλάδος.....	15
1.2. Το Γένος <i>Codringtonia</i> Kobelt, 1898	16
1.2.1 Γεωγραφική Κατανομή	17
1.2.2 Περιγραφή των ειδών <i>Codringtonia</i>	19
1.2.3 Καθεστώς Προστασίας Γένους.....	20
1.2.4 Στοιχεία οικολογίας.....	20
1.2.5 Στοιχεία βιολογίας.....	21
1.3 Περιοχή Μελέτης	23
1.3.1 Εισαγωγικά Στοιχεία Πελοποννήσου	23
1.3.2 Εισαγωγικά Στοιχεία Στερεάς Ελλάδας.....	23
1.4 Παλαιογεωγραφία Περιοχής Μελέτης	24
1.4.1 Γενικά.....	24
1.4.2 Παλαιογεωγραφία Πελοποννήσου & Στερεάς Ελλάδας.....	25
1.5 Φυλογένεση, Φυλογεωγραφία και εκτίμηση φυλογενετικών σχέσεων με τη χρήση μοριακών δεικτών .	26
1.5.1 Φυλογενετική προσέγγιση του αριθμού ειδών ενός γένους -Δέντρο ειδών βάσει γενετικών τόπων.....	28
1.6 Μοριακοί δείκτες	29
1.6.1 Μιτοχονδριακοί δείκτες.....	29
1.6.2 Πυρηνικοί δείκτες.....	30
1.6.3 Μοριακοί δείκτες μελέτης.....	30
1.6.3.1 COI & COII– Υπομονάδα I & II της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Cytochrome Oxidase, Subunit I & II)	30
1.6.3.2 16S rDNA Μεγάλη Υπομονάδα Μιτοχονδριακού Ριβοσώματος.....	32
1.6.3.3 Τα πυρηνικά γονίδια ITS1 & ITS2 (nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 & 2).....	32

1.7 Πληθυσμιακή Γενετική και Δομή Πληθυσμών	33
1.7.1 Γενετική Ποικιλότητα	34
1.7.1.1 Φυσική επιλογή	34
1.7.1.2 Γονιδιακή ροή.....	34
1.7.1.3 Γενετική παρέκκλιση (genetic drift)	35
1.8 Υβρίδια -Υβριδισμός -Ζώνες υβριδισμού	35
1.9 Μελέτη αλληλοεπικάλυψης θώκου	36
1.10 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	38
2.1 Περιοχή δειγματοληψίας	39
2.2 Σύνολο δεδομένων	40
2.3 Μοριακές Αναλύσεις	43
2.3.1 Εξαγωγή Ολικού Γενωμικού DNA – Μέθοδος CTAB 2X	43
2.3.2 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.....	43
2.3.3. Επιλογή και συγκεντρωτική παρουσίαση μοριακών δεικτών	44
2.3.4. Καθαρισμός του προϊόντος της PCR.....	45
2.3.5 .Προσδιορισμός Αλληλουχιών	46
2.3.6 Προσδιορισμός, Διόρθωση και Στοιχισή της Αλληλουχίας των προϊόντων της PCR.....	46
2.3.6.1 Επεξεργασία πυρηνικών αλληλουχιών (ITS1 & ITS2) με ετερόζυγες θέσεις.....	47
2.4 Μέθοδοι Φυλογενετικών Αναλύσεων και Επεξεργασίας Δεδομένων	47
2.4.1 Υπολογισμός γενετικών αποστάσεων.....	47
2.4.2. Δημιουργία σετ δεδομένων και Επιλογή μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης	48
2.4.3 Μέθοδοι Ανασύστασης Φυλογενετικών Δέντρων	48
2.4.3.1 Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference, BI).....	49
2.4.3.2 Μέγιστη Πιθανοφάνεια (Maximum Likelihood, ML)	50
2.5 Φυλογενετική προσέγγιση του αριθμού ειδών του γένους <i>Codringtonia</i>-Δέντρο ειδών με τη χρήση γενετικών δεικτών	50
2.5.1 Δέντρα ειδών.....	50
2.6 Μέθοδοι Μελέτης Της Γονιδιακής Ροής Και Της Γενετικής Ποικιλότητας.....	51
2.6.1 Γενετική ποικιλότητα	51
2.6.2 Γονιδιακή ροή	52
2.7 Δημογραφικές Αναλύσεις- Δείκτες Ουδετερότητας.....	53
2.7.1 Tajimas' D.....	53
2.7.2 Fu's FS	54
2.7.3 Ramos-Onsins & Rozas's R2.....	54
2.7.4 Μεθοδολογία μελέτης δημογραφίας πληθυσμών ειδών με χρήση Extended Bayesian Skyline Plots.....	54
2.8 Μεθοδολογία Μελέτης Αλληλοεπικάλυψης Θώκων (Niche Overlap) των ειδών του γένους <i>Codringtonia</i>	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3Ο-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
3.1 Εκτίμηση Γενετικών Αποστάσεων.....	59
3.2 Επιλογή μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης.....	59
3.3 Φυλογενετικές αναλύσεις.....	61
3.3.1. Μιτοχονδριακό σετ δεδομένων	61
3.3.2. Πυρηνικό σετ δεδομένων	62
3.3.3. Συνδυασμένη ανάλυση των πέντε γενετικών τόπων (πυρηνικών και μιτοχονδριακών).....	63
3.4 Αποτελέσματα δέντρου ειδών με τη χρήση γενετικών δεικτών	67
3.5 Αποτελέσματα Γενετικής Ποικιλότητας και Γονιδιακής Ροής	67
3.6 Αποτελέσματα Δημογραφικών Αναλύσεων-Δείκτες Ουδετερότητας-EBSPs	70
3.7 Αποτελέσματα Μελέτης Επικάλυψη Θώκων (Niche Overlap) των ειδών του γένους <i>Codringtonia</i>	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4Ο-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	82
4.1 Διερεύνησης της γενετικής ποικιλότητας και δομής των πληθυσμών των ειδών μέσω εκτίμησης γενετικών αποστάσεων και γενετικής διαφοροποίησης.....	83
4.2 Μελέτη δημογραφίας πληθυσμών ειδών	87
4.3 Διερεύνηση ενδεχομένου υβριδισμού μεταξύ 2 ζευγών ειδών του γένους (<i>C. elisabethae</i> - <i>C. gittenbergeri</i> & <i>C. helenae</i>-<i>C. intusplicata</i>).....	89
4.4 Μοντελοποίηση της αλληλοεπικάλυψης των θώκων των ειδών του γένους και ερμηνεία της παρατηρούμενης δομής.....	91
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	94
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	103

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του αναπληρωτή καθηγητή κ. Παρμακέλη, στο Τμήμα Βιολογίας και στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Οικολογία και Διαχείριση της Βιοποικιλότητας».

Αρχικά θα ήθελα να καταθέσω ότι αυτή η διπλωματική γράφτηκε σε μια πολύ δύσκολη φάση ζωής, η οποία εμπειρείχε και την απώλεια του πατέρα μου. Γι' αυτό κι η ολοκλήρωσή της πήρε παραπάνω χρονικό διάστημα από το αρχικά προβλεπόμενο.

Το ευτύχημα ωστόσο είναι ότι ολοκληρώθηκε, παρά τις αντιξοότητες.

Δε θα μπορούσε όμως αυτό να είχε επιτευχθεί χωρίς τη συνδρομή πολλών ανθρώπων.

Το ελάχιστο που μπορώ να κάνω λοιπόν, είναι να αναφέρω αυτά τα ονόματα και να ευχαριστήσω αυτούς τους ανθρώπους και εγγράφως.

Πρώτα και κύρια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου διατριβής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Παρμακέλη. Θα ήθελα λοιπόν να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία, το χώρο και το χρόνο που μου έδωσε για να εργαστώ σε αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία, αλλά και για την εμπιστοσύνη και την κατανόηση που μου έδειξε για να ολοκληρωθεί αυτή η δουλειά.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον μεταδιδάκτορα Κώστα Κουγιουμουτζή για τις καινούργιες γνώσεις που μου έδωσε σε έναν εντελώς άγνωστο κόσμο για μένα, όπως είναι αυτός του προγραμματισμού και της μοντελοποίησης. Επίσης, θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για τη φιλική διάθεση, την κατανόηση και την υπομονή που μου έδειξε για να κατανοήσω κάποιες από τις αναλύσεις, όπως επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου έδωσε απλόχερα πρόσβαση στους πολύτιμους κώδικες προγραμματισμού του για να τους χρησιμοποιήσω στη δική μου διατριβή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου της Μοριακής Βιολογίας με τα οποία συναντηθήκαμε και συγχρωτιστήκαμε κάτω από την ίδια εργαστηριακή «σκέπη». Τα παρουσιάζω ονομαστικά παρακάτω: την υποψήφια διδάκτωρ Πέννη Λάμπρη, τον πολύ καλό φίλο και συνεργάτη Γιάννη Αλεξίου, την Χριστίνα Μπουραντά και την Κατερίνα Ζαφειρίου.

Ακολούθως, θα ήθελα να αναφερθώ σε ένα δίκτυο ανθρώπων που γνώρισα (και συνεργαστήκαμε σε κάποιες περιπτώσεις) στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής και στο παρόν Μεταπτυχιακό πρόγραμμα, και να τους ευχαριστήσω για τη συμπαράσταση και την υποστηρικτική και φιλική διάθεση όλο αυτό το δύσκολο διάστημα: τον Κώστα Πρόιο, την Κατερίνα Γούλα, την Γαβριέλα Κελαϊδή και την Κωνσταντίνα Σηλιοπούλου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις πανεπιστημιακές (και μη) μου αδελφές και φίλες ζωής, Δήμητρα Σ, Δήμητρα Κ, Ευδοκία, Σοφία, Αλκυόνη, Λουκία, Φωτεινή, Ματίνα, Ελενίτσα και Εύα για το κουράγιο και τη βοήθεια που μου έδωσαν σε όλη τη μεταπτυχιακή μου πορεία αλλά και συνολικά όλη αυτή τη δύσκολη περίοδο. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δάφνη για τη συμβουλευτική, αφυπνιστική κι αγχολυτική της συνδρομή τον τελευταίο έναν χρόνο.

Και φυσικά, πίσω από όλη αυτή την προσπάθεια, ευχαριστώ τους αφανείς ήρωες, τα μέλη της οικογένειάς μου.

Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ τον πατέρα μου Αντώνη, στου οποίου τη μνήμη αφιερώνω αυτή τη διπλωματική, που με έμαθε να αγωνίζομαι μέχρι τέλους, και με υποστήριξε σθεναρά και ποικιλοτρόπως σε όποια επιλογή κι αν έκανα, τη μητέρα μου Ελένη, για την υποδειγματική στωικότητα, την ήρεμη δύναμη και την κατευναστική της παρουσία, και την αδελφή μου Ματίνα για τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση, τις εύστοχες παρατηρήσεις στο κομμάτι της οργάνωσης και της αποφυγής του αυτό-σαμποτάζ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το *σύντροφο* μου Αντρέα, που από την αρχή αυτού του μεταπτυχιακού στάθηκε δίπλα μου σθεναρά, με στήριξε και με στηρίζει ηθικά και συναισθηματικά, ανέχτηκε τις παραξενιές μου, κι υπέμεινε δυσκολίες, αγκάλιασε κι υποστήριξε όλα τα θέλω μου, και μέχρι και σήμερα μου συμπαραστέκεται στα πολύ δύσκολα, χαίρεται με την πρόοδό μου και στέκεται ακλόνητος και ένθερμος υποστηρικτής σε όποιο στόχο κι αν θέσω, σε όποια επιλογή κι αν κάνω.

Σας ευχαριστώ όλους από καρδιάς.

Περίληψη

Το γένος *Codringtonia* (Gastropoda, Pulmonata) περιλαμβάνει επτά ενδημικά είδη χερσαίων βραχόβιων σαλιγκαριών, τα οποία παρουσιάζουν εντοπισμένη και μωσαϊκή κατανομή, αποκλειστικά στην ηπειρωτική Ελλάδα. Όλα τα είδη έχουν ενταχθεί στον Ερυθρό Κατάλογο και χαρακτηρίζονται ως τρωτά, ή κινδυνεύοντα, καθώς οι πληθυσμοί τους έχουν συρρικνωθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Παρουσιάζουν 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, η μωσαϊκότητα της κατανομής, η μικρή χωρική κλίμακα της διαφοροποίησης και οι ιδιαιτερότητες του βιολογικού κύκλου του γένους έχουν κεντρίσει επανειλημμένως το ενδιαφέρον των ερευνητών. Συγκεκριμένα, πριν από αυτή τη μελέτη, είχε πραγματοποιηθεί μια εκτενέστερη συγκριτική διδακτορική μελέτη όλων των ειδών του γένους, η οποία επίλυσε τη φυλογένεση του και έδωσε απαντήσεις σε καίρια ερωτήματα σχετικά με την ιστορία της διαφοροποίησης του. Ταυτόχρονα, έθεσε και τα θεμέλια για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης, ενώ κάποια από τα αποτελέσματά της γέννησαν νέα ερωτήματα προς διερεύνηση.

Ως εκ τούτου, η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποσκοπεί στην περαιτέρω κατανόηση και μελέτη της εξελικτικής ιστορίας και της οικολογίας των ενδημικών ειδών του γένους *Codringtonia*. Εστιάζει σε ερωτήματα που αφορούν στη γενετική δομή των πληθυσμών των ειδών, στη μελέτη της δημογραφίας τους, στην επανεξέταση των κατανομών τους μέσω μοντελοποίησης της αλληλοεπικάλυψης των θώκων τους αλλά και στην εξέταση του ενδεχομένου υβριδισμού μεταξύ δύο στενά συγγενικών ειδών του γένους μελέτης (*C. elisabethae* & *C. gittenbergeri*). Για τις ανάγκες των αναλύσεων, χρησιμοποιήθηκαν τρία μιτοχονδριακά γονίδια (COI, COII, 16S) και δύο πυρηνικά γονίδια (ITS1, ITS2) και δημιουργήθηκαν τρία ενοποιημένα σετ δεδομένων, ένα με τους τρεις μιτοχονδριακούς τόπους (105 δείγματα), ένα με τα δύο πυρηνικά γονίδια (91 δείγματα), και ένα με ενοποιημένους μιτοχονδριακούς και πυρηνικούς τόπους των 81 ατόμων, από όλα τα είδη του γένους αντίστοιχα.

Η γενετική ποικιλότητα και η γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών των επτά ειδών του γένους *Codringtonia* εξετάστηκε τόσο σε διαειδικό όσο και σε ενδοειδικό επίπεδο, υπολογίζοντας τις γενετικές αποστάσεις, την απλοτυπική και νουκλεοτιδική ποικιλότητα και τον συντελεστή «συγκαταγωγής» F_{ST} -αντλώντας έτσι και συμπεράσματα για τις πληθυσμιακές δομές τους. Συνολικά, οι πληθυσμοί των ειδών του γένους *Codringtonia* παρουσίασαν αρκετά αυξημένη απλοτυπική ποικιλότητα και γενετική διαφοροποίηση, κυρίως στους μιτοχονδριακούς τόπους, κάτι που ενδεχομένως οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα διασποράς των χερσαίων σαλιγκαριών. Συγκεκριμένα, το ζεύγος ειδών με τη μεγαλύτερη μιτοχονδριακή διαειδική γενετική διαφοροποίηση ήταν το *C. parnassia* με το *C. eucineta*, λόγω των διαφορετικών προτύπων κατανομής τους, ενώ η μικρότερη μιτοχονδριακή αλλά και πυρηνική εντοπίστηκε ανάμεσα στα *C. elisabethae* και *C. gittenbergeri*, που εμφανίζουν παρόμοια κατανομή, χωρίς ωστόσο να έχουν βρεθεί σε συμπατρία. Σε ενδοειδικό επίπεδο, η έμμεση εκτίμηση της γονιδιακής ροής των πληθυσμών πραγματοποιήθηκε μέσα από την αξιολόγηση του δείκτη F_{ST} κατά ζεύγη.

Επιπλέον, η εμφάνιση πιο έντονης εσωτερικής δομής σε κάποιους πληθυσμούς με διαφορετικό απλότυπο ανά βράχο, στα είδη *C. intusplicata*, *C. codringtonii* και *C. parnassia* υποδηλώνει πιθανότατα την ύπαρξη δήμων.

Η δημογραφική ιστορία των πληθυσμών των ειδών του γένους *Codringtonia*, αρχικά επιχειρήθηκε να εκτιμηθεί με τους δείκτες ουδετερότητας Tajima's D, Fu's Fs και Rozas R² χρησιμοποιώντας ξεχωριστά τα δυο σύνολα μιτοχονδριακών και πυρηνικών τόπων. Επιπλέον, για την ανακατασκευή της εξέλιξης των προγονικών πληθυσμών του γένους, χρησιμοποιήθηκε μια μεθοδολογία Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας, τα Extended Bayesian Skyline Plots (EBSPs), χρησιμοποιώντας και τους πέντε γενετικούς τόπους. Οι τιμές των δεικτών ουδετερότητας δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, υποδεικνύοντας πως οι αλληλουχίες δεν υπόκεινται σε φυσική επιλογή και πως οι πληθυσμοί έχουν πιθανώς σταθερό μέγεθος. Ανιχνεύτηκαν ωστόσο, μερικές εξαιρέσεις. Στο μιτοχονδριακό σετ δεδομένων του είδους *C. gittenbergeri* υπήρξαν ενδείξεις περίσσειας πρόσφατων μεταλλάξεων και κατ' επέκταση πλεονάζοντας αριθμός σπάνιων αλληλομόρφων, που οφείλεται πιθανόν σε πρόσφατη εξάπλωση του πληθυσμού. Αντίστοιχα, στο *C. helenae* για τον πληθυσμό στην κορυφή του όρους Μαίναλου, στο μιτοχόνδριο υπήρξαν ενδείξεις για την ύπαρξη θετικής επιλογής και στον πυρήνα ένδειξη για απόκλιση του από ένα σταθερό μέγεθος, υποδεικνύοντας ότι ο πληθυσμός εμφανίζει πρόσφατη πληθυσμιακή εξάπλωση. Επιπλέον, το μοτίβο της υψηλής απλοτυπικής και της χαμηλής νουκλεοτιδικής ποικιλότητας μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη φαινομένου του ιδρυτή ή φαινομένου στενωπού. Αυτή η υπόθεση μπορεί να συνδεθεί και με προηγούμενα ευρήματα που αφορούν στην αδυναμία διατήρησης του υδατικού ισοζυγίου που εμφανίζει το *C. helenae*. Σε ότι αφορά τα αποτελέσματα των EBSPs, κανένας πληθυσμός των ενδημικών ειδών του γένους *Codringtonia* δεν εμφάνισε ενδείξεις προγονικών στενωπών ή εξαπλώσεων. Οι πιο έντονες πληθυσμιακές μεταπτώσεις με ακόλουθες αυξητικές τάσεις, στους πληθυσμούς των *C. eucineta*, *C. intusplicata*, *C. helenae*, *C. elisabethae* και *C. parnassia*, υπέδειξαν πιθανές τρέχουσες στενωπούς, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με πρόσφατο κατακερματισμό των ενδιαιτημάτων τους λόγω της κλιματικής αλλαγής και των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Το *C. codringtonii*, εμφανίζει σταθερό μέγεθος, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε μεγαλύτερο εύρος κατανομής από το πλέον γνωστό. Τέλος, το *C. gittenbergeri*, φαίνεται να έχει σταθερό μέγεθος, με την τρέχουσα πληθυσμιακή του τάση να μοιάζει αύξουσα υποδεικνύουν πρόσφατη πληθυσμιακή εξάπλωση.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη, επιχειρήθηκε η περαιτέρω διερεύνηση του ενδεχόμενου υβριδισμού μεταξύ των ειδών (*C. gittenbergeri* και *C. elisabethae*) με την προσθήκη δύο πυρηνικών δεικτών, και με την αύξηση ατόμων στη συνολική φυλογένεση του γένους. Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι όχι μόνο το ζεύγος των ειδών *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae* αλλά και το ζεύγος *C. intusplicata* - *C. helenae*, εμφανίζουν ένα γενετικά αναμειγμένο πρότυπο μιας και μοιράζονται κοινούς απλότυπους στο εσωτερικό των κλάδων τους. Αυτό αποτελεί ένδειξη υβριδισμού ή εισροής, ιδιαίτερα για το ζεύγος *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae*, -όπου τα παρατηρούμενα πρότυπα σε πυρήνα και μιτοχόνδριο υποδηλώνουν μια αρκετά πρόσφατη διαφοροποίηση των ειδών. Η γεωγραφική εγγύτητα των κατανομών τους σε μικρή γεωγραφική έκταση, υποστηρίζει το ενδεχόμενο ύπαρξης ζώνης επαφής

στο πρόσφατο παρελθόν, είτε στο παρόν, ενισχύοντας έτσι την πιθανότητα δευτερογενούς γονιδιακής ροής μεταξύ των απογονικών πληθυσμών/ειδών.

Τέλος, για την περεταίρω κατανόηση των περιβαλλοντικών θώκων των ειδών του γένους *Codringtonia* και της αλληλοεπικάλυψης τους χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης D του Schoener, ο οποίος διακρίνει τα διαφορετικά χαρακτηριστικά τους. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτού του δείκτη έδειξαν μέτρια αλληλοεπικάλυψη, με τις μεγαλύτερες αλληλοεπικαλύψεις να εμφανίζονται μεταξύ ειδών που γεωγραφικά είναι πιο απομακρυσμένα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μιας και γίνεται αναφορά σε οικολογική επικάλυψη, υπάρχει πιθανότητα ένδειξης αλλοπάτριας ειδογένεσης με ελάχιστη οικολογική διαφοροποίηση. Τα υποψήφια για ενδεχόμενο υβριδισμό είδη (*C. gittenbergeri*, *C. elisabethae*) παρά την κοντινή γεωγραφική κατανομή τους εμφάνισαν αρκετά μικρή αλληλοεπικάλυψη, κάτι που ενισχύει την ενδεχόμενη ύπαρξη προγονικού υβριδισμού, ή το ενδεχόμενο να διαφοροποιήθηκαν τόσο εξαιτίας αλλοπάτριας ειδογένεσης, όσο και εξαιτίας διαφορετικών οικολογικών συνθηκών. Επίσης, η διαφοροποίηση των οικολογικών θώκων των ειδών του γένους εξηγήθηκε κυρίως από μεταβλητές που σχετίζονται με τη διαθεσιμότητα σε νερό στο περιβάλλον. Έτσι, μέσα από αυτή τη μοντελοποίηση της αλληλοεπικάλυψης των θώκων τους αναδείχθηκε ο σημαντικός ρόλος της ξηρασίας στα πρότυπα κατανομής του συγκεκριμένου γένους αλλά και οι προσαρμογές που εμφανίζουν καθότι είναι θερμοευαίσθητα είδη. Συγκεκριμένα, προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι τα είδη του γένους *Codringtonia* που ζουν πιο νότια ή σε πιο ζεστές και ξηρές περιοχές έχουν την τάση να εκφράζουν πρωτεΐνες θερμικού σοκ μόνιμα και σε υψηλότερα επίπεδα.

Summary

The rock-dwelling land snail genus *Codringtonia* (Gastropoda, Pulmonata) consists of seven species. This genus is endemic to Greece, and exhibits a restricted and mosaic distribution in the Peloponnese peninsula and Central Greece. Since their populations have declined significantly over the last half century, *Codringtonia* species are registered in the Red List of endangered animals as vulnerable, with exception of *C. codringtonii* which is assessed as endangered. These species have an unusual life cycle as they reproduce during spring, which is uncommon 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 have piqued the interest of many researchers. More specifically, before this study, a PhD Thesis had been conducted that contained all *Codringtonia* species. That thesis, resolved the phylogeny of the genus and replied to main questions concerning its differentiation history, using a comparative framework. At the same time, it laid the foundations for the realization of the current study, as some of its results gave rise to new questions to be explored.

Therefore, the present thesis aims to further investigate the evolutionary history and ecology of the endemic species of the genus *Codringtonia* by focusing on questions concerning their population genetic structure, their demographic history, the spatial overlap in their distributions using niche overlap modelling, and the potential for hybridization of two closely related species (*C. elisabethae* & *C. gittenbergeri*). For the purpose of the analysis, sequence data originating from three mitochondrial genes (COI, COII, 16S) and two nuclear genes (ITS1, ITS2) were used for creating three concatenated datasets; one using the mitochondrial sequences (105 samples), one with the nuclear ones (91 samples), and one combining both (81 samples), from all species of the genus respectively.

Both the intraspecific and interspecific levels of the genetic diversity and differentiation of the populations of the seven species were examined by measuring the genetic distance, the haplotype and nucleotide diversity and the fixation index F_{ST} , to draw conclusions about their population structure. Overall, the sequences of mitochondrial regions revealed high haplotype diversity and genetic differentiation among the population of the genus, probably due to the low dispersal ability of land snails. Specifically, the highest mitochondrial interspecific genetic differentiation appeared between the species *C. parnassia* and *C. eucineta*, because of their different distribution patterns. While the smallest mitochondrial and nuclear genetic differentiation was identified between *C. elisabethae* and *C. gittenbergeri*, -species with similar geographical distribution, but not in sympatry. Moreover, to indirectly estimate patterns of gene flow at an intraspecific level, pair-wise F_{ST} values were calculated. Furthermore, the strongly structured populations with different haplotype per rock in *C. intuspicata*, *C. codringtonii* and *C. parnassia*, suggested the existence of neighboring demes.

To detect signatures of demographic changes in populations of *Codringtonia* species, Tajima's D , Fu's F_s and Rozas R^2 neutrality tests were calculated using the concatenated datasets of mitochondrial and nuclear sequences. Moreover, Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) analysis was run to estimate the effective population size of the species over time, by using all five genetic markers. In general, there was not statistical significance in the neutrality

testing, implying there is no evidence of natural selection and that population sizes are constant. However, there were few exceptions. In the mitochondrial dataset of *C. gittenbergeri* there was evidence of an excess of rare alleles due to the quite large number of recent mutations, reflecting recent demographic growth. Also, the mitochondrial sequences of the population of *C. helenae* in Mount Mainalo indicated positive selection, while the nuclear dataset showed deviation from constant population size because of recent population expansion. Moreover, the combination of high haplotype diversity and low nucleotide diversity is likely due to rapid demographic expansion from a small effective population size, suggesting a founder event or a population bottleneck. The possibility of these events may be linked with the difficulty of this particular species to conserve its tissue water. Regarding the results of EBSPs, none of the populations of the genus *Codringtonia* showed signs of ancestral bottlenecks or expansions. Furthermore, the population profile of *C. eucineta*, *C. intusplicata*, *C. helenae*, *C. elisabethae* and *C. parnassia*, showed major population shifts with an upward trend, suggesting potential current bottlenecks, which may be related to recent range reductions of habitats due to climatic and/or anthropogenic events. *C. codringtonii* populations seem to be of a constant size, which may be due to a wider distribution range than already observed. Finally, *C. gittenbergeri* populations seem to be of a constant size too, with an upward current trend, indicating recent expansion.

Moreover, this study examined the potential hybridization between two closely related *Codringtonia* species (*C. gittenbergeri* - *C. elisabethae*) by using nuclear markers and increasing the number of specimens in the phylogenetic analysis of the genus. Interestingly, not only the pair of *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae* but also *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae* showed a mixed genetic pattern by sharing common haplotypes within their clades. This might be an indication of hybridization or introgression, especially between *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae*, -as the observed genetic patterns in nuclear and mitochondrial sequences depicts recent speciation. The geographical proximity of their distributions in a limited spatial scale, probably represents a remnant of past hybridization and may reflect ancestral continuous distribution of the studied taxa or supports the possibility of a contact zone in the present, thus enhancing the possibility of secondary gene flow between the ancestral populations / species.

Finally, further examination of the ecological niche of the species was acquired by measuring niche overlap using the metric D. Overall, the results of this metric showed moderate niche overlap, with the most extensive overlaps among species that are the most distant geographically. In these cases, allopatric speciation with limited ecological differentiation could provide an explanation. Furthermore, the overlap of the suspected for hybridization species (*C. gittenbergeri*, *C. elisabethae*) was restricted, possibly due to ancestral hybridization or because of allopatric speciation or different ecological conditions. Also, the differentiation in environmental niches was predominantly explained by variables related to water availability. Hence, the niche modelling highlighted the fundamental impact of drought on the distribution patterns of this genus and their adaptations as heat-sensitive species. In particular, a previous study showed that the species distributed farther south or at lower altitudes express constantly higher levels of heat shock proteins, permanently.

Κατάλογος Συντομογραφιών

Ελληνικές Συντμήσεις

Υ: ύψος κελύφους

Π: πλάτος κελύφους

ΥΣ: ύψος ανοίγματος κελύφους

ΠΣ πλάτος ανοίγματος κελύφους

ΜΠ: Μέγιστη Πιθανοφάνεια

ΜΣ: Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία

ΜΦ: Μέγιστη Φειδωλότητα

Αγγλικές Συντμήσεις

VU: Vulnerable

EN: Endangered

EBSP: Extended Bayesian Skyline Plot

IUCN: International Union for Conservation of Nature

16S rDNA: γονίδιο για τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, (16S ribosomal DNA)

COI: υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Cytochrome Oxidase subunit I)

COII: υπομονάδα II της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Cytochrome Oxidase subunit II)

ITS1: εσωτερικό μεταγραφόμενο διαστήμα 1 (Internal Transcribed Spacer 1)

ITS2: εσωτερικό μεταγραφόμενο διαστήμα 2 (Internal Transcribed Spacer 2)

G: παράμετρος Γάμμα (gamma)

I: Παράμετρος Αμετάβλητων Νουκλεοτιδικών Θέσεων (Invariable)

GTR: Γενικευμένο Αντιστρεπτό Μοντέλο (Generalised time-reversible model)

HKY: Hasegawa-Kishino-Yano Μοντέλο

K80+I: Kimura80 Μοντέλο με παράμετρο I

F81: Felsenstein 1981

SYM + I+ G: Συμμετρικό Μοντέλο με παραμέτρους I + G (Symmetrical Model +I+G)

Κεφάλαιο 1ο - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

1.1.1 Χερσαία Γαστερόποδα

Τα Γαστερόποδα αποτελούν την πιο πλούσια σε είδη Ομοταξία του Φύλου των Μαλακίων. Μολονότι η αμφίπλευρη συμμετρία αποτελεί χαρακτηριστικό του Φύλου, τα Γαστερόποδα αποτελούν εξαίρεση, καθότι την έχουν απωλέσει σε σώμα και κέλυφος εμφανίζοντας έτσι μια ενιαία περιέλιξη. Επίσης, τα Γαστερόποδα είναι η μόνη Ομοταξία που έχει αντιπροσώπους στην ξηρά, τα Χερσαία Γαστερόποδα.

Τα Χερσαία Γαστερόποδα, στα οποία συγκαταλέγονται τα χερσαία σαλιγκάρια και οι γυμνοσάλιαγκες, είναι μία από τις πιο ποικίλες και ενδιαφέρουσες ομάδες των χερσαίων ζώων από πλευράς ταξινόμησης, μορφολογίας και λειτουργιών (Bouchet, 1992). Με περισσότερα από 24.000 αναγνωρισμένα είδη και τουλάχιστον 11.000 επιπλέον μη περιγραφέντων taxa, τα χερσαία σαλιγκάρια και οι γυμνοσάλιαγκες αποτελούν τη δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα χερσαίων ζώων στη Γη (Lydeard et al., 2004; Chapman, 2009; Rosenberg, 2014), μετά τα χερσαία αρθρόποδα (~ 7 εκατομμύρια, Stork, 2018).

Τα χερσαία σαλιγκάρια, σε παλαιότερες ταξινομήσεις ανήκαν σε τρεις υφομοταξίες των Γαστεροπόδων: τα Προσωβράχια (Prosobranchia), τα Οπισθοβράχια (Opisthobranchia) και τα Πνευμονοφόρα (Pulmonata). Ωστόσο, παρόλο που πλέον δεν αποτελούν επίσημες ταξινομικές βαθμίδες λόγω του πολυφυλετικού τους χαρακτήρα (Jörger et al., 2010), οι ερευνητές εξακολουθούν μέχρι σήμερα να χρησιμοποιούν τον όρο πνευμονοφόρα καθότι φέρουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, φέρουν την ικανότητα να αναπνέουν αέρα εξαιτίας της τροποποίησης του μανδύα τους σε πνεύμονα (Bouchet, 2005), έχουν έναν μονό κόλπο, έναν νεφρό, συμμετρικό νευρικό σύστημα, είναι ερμαφρόδιτα και μπορεί να φέρουν ακόντια (Barnes, 1982; Chase, 2001). Στην πλειονότητά τους, τα χερσαία σαλιγκάρια της Ευρώπης είναι πνευμονοφόρα.

1.1.2 Χερσαία Μαλακοπανίδα Ελλάδος

Η Ελλάδα, αν και πολύ μικρότερη από πολλές ευρωπαϊκές χώρες έχει ιδιαίτερα πλούσια μαλακοπανίδα. Αυτό οφείλεται στην πολύ μεγάλη ποικιλομορφία που εμφανίζει ο ελληνικός χώρος εξαιτίας της γεωλογικής του εξέλιξης αλλά και στις σημερινές συνθήκες που επικρατούν. Συγκεκριμένα, τα οικοσυστήματα, το ανάγλυφο, τα ασβεστούχα εδάφη, το κλίμα, κι η επίδραση του ανθρώπου έπαιξαν και συνεχίζουν να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παρουσία και την ποικιλότητα που εμφανίζουν τα χερσαία σαλιγκάρια στην Ελλάδα (Mylonas, 1982). Όλα τα προαναφερθέντα, μαζί με την πολύ μεγάλη γεωμορφολογική διαμερισματοποίηση της χώρας, τα οικολογικά και γεωγραφικά νησιά της, τη σύνθετη παλαιογεωγραφική ιστορία της, και το ρόλο της ως πλειστοκαινικό καταφύγιο, συντελούν επίσης στην εμφάνιση πολύ υψηλών ποσοστών ενδημισμού σε επίπεδο είδους στη χώρα (Mylonas, 1982; Vardinoyannis et al., 2018). Μέχρι τώρα, ο αριθμός των ειδών των χερσαίων σαλιγκαριών στην Ελλάδα εκτιμάται ότι συγκροτείται από 695 αναγνωρισμένα είδη, τα οποία ανήκουν σε 46 οικογένειες και 145 γένη (Vardinoyannis et al., 2018). Από αυτά τα είδη, το 59 % είναι ενδημικά, με επτά από τα 145 γένη να εντοπίζονται αποκλειστικά στην Ελλάδα (Vardinoyannis et al., 2018). Σε ένα από αυτά τα γένη συγκαταλέγεται και το γένος *Codringtonia* που αποτελεί και το γένος μελέτης αυτής της εργασίας.

1.2. Το Γένος *Codringtonia* Kobelt, 1898

Το *Codringtonia* Kobelt, 1898 πρόκειται για ένα ενδημικό γένος που απαντάται αποκλειστικά στην Ελλάδα. Το τυπικό είδος του γένους είναι το *Codringtonia codringtonii* (Subai, 2005). Η περιγραφή του είδους αυτού βασίστηκε σε δείγματα που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Ναβαρίνου από το Βρετανό ναύαρχο που συμμετείχε στη ναυμαχία του Ναβαρίνου το 1827, τον Sir Edward Codrington. Όταν ο Gray περιέγραψε το νέο είδος σαλιγκαριού για πρώτη φορά, το κατέταξε στο γένος *Helix* και προς τιμήν του Βρετανού ναυάρχου το ονόμασε *Helix codringtonii* (Vardinoyannis et al., 2018). Το 1898 ο Kobelt περιέγραψε ένα νέο γένος, το γένος *Codringtonia*, στο οποίο ανήκουν πλέον όλα τα είδη που περιεγραφήκαν μέχρι τότε αλλά και μεταγενέστερα. Έπειτα, από πληθώρα ταξινομικών ανακατατάξεων από διάφορους ερευνητές κατά το 19^ο αιώνα, κι από την αναγνώριση του *Codringtonia* ως νέο διακριτό γένος από τον Kobelt, το όνομα παραμένει μέχρι και σήμερα έγκυρο.

Σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση που πραγματοποιήθηκε από τον Subai (2005), το γένος περιλαμβάνει οχτώ είδη (**Πίνακας 1**): *Codringtonia 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 ιδιαίτερα διαφοροποιημένο *C. neocrassa* Zilch 1952. Η συστηματική κατάταξη των ειδών βασίστηκε σε μορφολογικά χαρακτηριστικά του αναπαραγωγικού συστήματος και του κελύφους. Ωστόσο, ύστερα από τη φυλογένεση του γένους με τη χρήση μιτοχονδριακών δεικτών προέκυψε ότι το είδος *C. neocrassa* ανήκει σε ξεχωριστό γένος, το γένος *Neocrassa*, με μοναδικό είδος το *Neocrassa neocrassa* που έχει κατανομή στη βόρεια Ελλάδα, την Κέρκυρα και τη νότια Αλβανία (Kotsakiozi et al., 2012; Mollusca Base, 2019).

Πίνακας 1. Η συστηματική κατάταξη των ειδών του γένους *Codringtonia* (Subai 2005).

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

1.2.1 Γεωγραφική Κατανομή

Τα επτά είδη του γένους *Codringtonia* είναι ενδημικά και παρουσιάζουν εντοπισμένη και μωσαϊκή κατανομή αποκλειστικά στην ηπειρωτική Ελλάδα. (Εικόνα 1.1). Συγκεκριμένα, τέσσερα από τα επτά είδη εντοπίζονται αποκλειστικά στην Πελοπόννησο (*C. codringtonii*, *C. helenae*, *C. gittenbergeri*, *C. elisabethae*), δύο κατανέμονται τόσο σε Στερεά Ελλάδα όσο και στην Πελοπόννησο (*C. intusplicata*, *C. eucineta*) και ένα είδος (*C. parnassia*) απαντάται αποκλειστικά στη Στερεά Ελλάδα. Όπως προαναφέρθηκε και νωρίτερα, τυπικό είδος του γένους αποτελεί το *C. codringtonii* που εμφανίζεται στην περιοχή του Ναβαρίνου (Νότια Πελοπόννησος). Τα συγγενέστερα γένη στο *Codringtonia* θεωρούνται τα *Levantina* και *Assyriella* (Subai, 2005; Hadjicharalambous, 1996; Κοτσακιάζη, 2013).

Παρακάτω παρουσιάζεται λεπτομερώς η κατανομή ανά είδος, βασισμένη στην αναθεώρηση του Subai (2005) και τη διδακτορική διατριβή της Κοτσακιάζη (2013).

Το *C. codringtonii* έχει περιορισμένη κατανομή στο νοτιοδυτικό άκρο της Πελοποννήσου. Όλες οι γνωστές θέσεις του εντοπίζονται στη δυτική Μεσσηνία. Η περιοχή έχει έκταση 50χλμ. από το βορρά έως το νότο και 20χλμ. από ανατολή έως δύση. Άτομα του είδους έχουν βρεθεί τόσο σε απόσταση 60μ. πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (στη Βασιλίτσα) έως και 500μ. στο όρος Λυκόδημο. (Subai, 2005).

Το *C. helenae* απαντάται αποκλειστικά στην Πελοπόννησο. Η τυπική περιοχή εξάπλωσης του είδους είναι στην Αρκαδία, περίπου 3,7χλμ. από το Περθώρι, προς τη Μονή Επάνω Χρέπας. Κατά κύριο λόγο, επεκτείνεται στο κέντρο της Πελοποννήσου. Τα όρια της κατανομής είναι το όρος Μαίναλο στο βορρά, το βορειότερο τμήμα του Ταΰγετου στα νότια, η περιφερειακή οδός Τριπόλεως – Λεβιδίου στα ανατολικά και η οδός Μεγαλόπολης – Λεονταρίου στα δυτικά. Η οριζόντια κατανομή φτάνει τα 50χλμ. από το βορρά έως το νότο και 25χλμ. από τα ανατολικά προς τα δυτικά. Άτομα του είδους έχουν βρεθεί από 470μ. πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (Καλύβια) έως και 1950μ. υψόμετρο (όρος Μαίναλο).

Το *C. gittenbergeri* κατανέμεται στην Πελοπόννησο και συγκεκριμένα νοτιοανατολικά του όρους Πάρνωνα. Η τυπική περιοχή εξάπλωσης είναι στην Αρκαδία, 7χλμ. από τον Άγιο Πέτρο. Η περιοχή εξάπλωσης είναι αρκετά περιορισμένη και έχει έκταση περίπου 30χλμ. από το βορρά έως το νότο και 25χλμ. από ανατολικά προς δυτικά. Έχουν βρεθεί άτομα του είδους από 500μ. πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (κοιλιάδα Δαφνών) έως και 1800μ. υψόμετρο (ΒΔ του Κοσμά στο όρος Πάρνωνα).

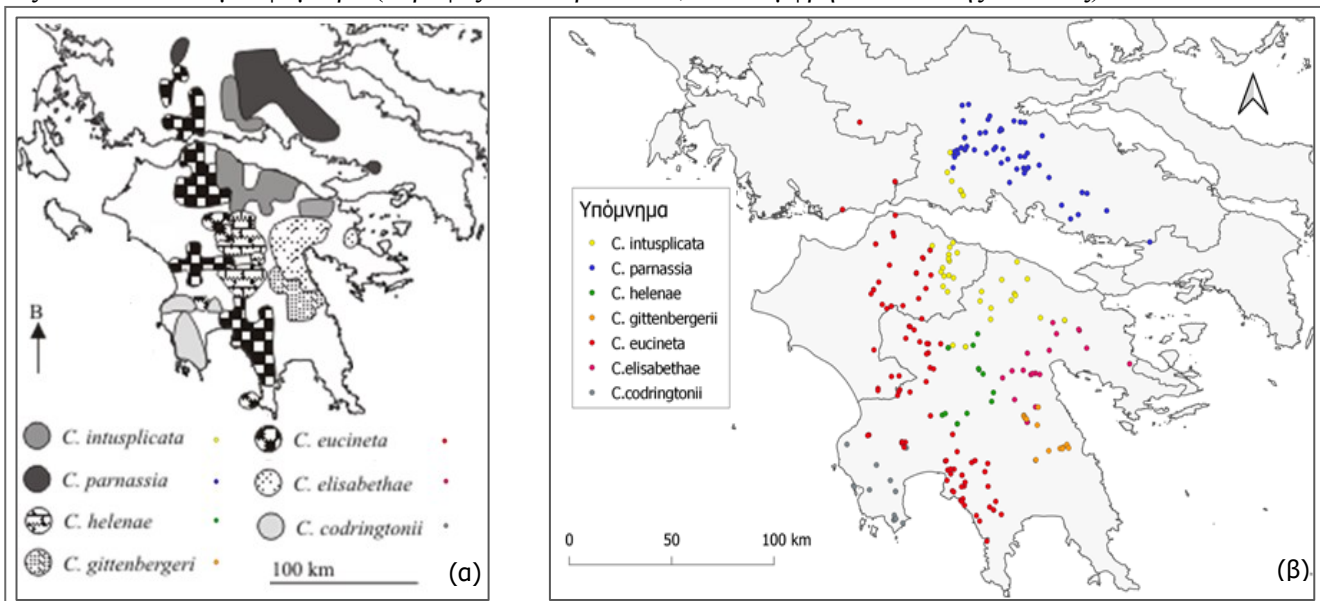
Το *C. elisabethae* ζει στην Πελοπόννησο με τυπική τοποθεσία την Αργολίδα, 7χλμ. από τον Αχλαδόκαμπο προς το Άργος σε σημείο 850μ. πάνω από το επίπεδο της θάλασσας. Γενικότερα, εντοπίζονται άτομα στους νομούς Κορινθίας, Αρκαδίας, Αργολίδας και Λακωνίας.

Η κύρια εξάπλωση του *C. intusplicata* είναι στη Στερεά Ελλάδα και τη βόρεια Πελοπόννησο. Εκτείνεται από το όρος Χελμός, το όρος Ζήρια (Κυλλήνη) και το όρος Ολίγυρτος καθώς και στους πρόποδες τους, στους νομούς Αχαΐας και Κορινθίας αντίστοιχα. Επιπλέον, υπάρχουν και κάποια σημεία στην Αργολίδα και την Αρκαδία που έχουν βρεθεί άτομα του είδους. Όσον αφορά την Στερεά Ελλάδα, υπάρχουν πληθυσμοί στην Φωκίδα και το βόρειο

τμήμα του Κορινθιακού κόλπου. Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί άτομα στην κοιλάδα του Μόρνου καθώς και στα περίχωρα των Βαρδουσιών και του Λιδορικίου.

Το *C. eucineta* έχει μια ευρεία κατανομή σε Στερεά Ελλάδα και Πελοπόννησο. Ο ολότυπος του είδους αναφέρεται σε πληθυσμό στην Καλαμάτα, Μεσσηνίας. Το βορειότερο τμήμα της ξεκινά από το φαράγγι του Τρικεριώτη νότια του Καρπενησίου στην Ευρυτανία. Τα όρη Καλιακούδα και Παναιτωλικό αλλά και τα βουνά βόρεια της Ναύπακτου αποτελούν ενδιαιτήματα για το είδος. Το νοτιότερο άκρο της κατανομής του εντοπίζεται στην Πελοπόννησο. Πληθυσμοί υπάρχουν στην Αχαΐα, την βορειοδυτική Αρκαδία και σε ένα μικρό κομμάτι της βορειοανατολικής Αρκαδίας καθώς και στην βόρεια Ηλεία. Στο νότιο άκρο της Πελοποννήσου, στην βόρεια Μεσσηνία εντοπίζονται άτομα του είδους. Η κατανομή επεκτείνεται μέχρι τον Ταΰγετο και διατρέχει την περιοχή από την βόρεια πλευρά του Δυρραχίου Αρκαδίας, πάνω στον Ταΰγετο στην περιοχή της δυτικής Μεσσηνίας και μέχρι την δυτική Λακωνία έως την χερσόνησο της Μάνης. Η κατανομή στον άξονα βορρά προς νότο υπολογίζεται περίπου στα 250χλμ., ενώ η δυτικοανατολική είναι περίου 30-35χλμ.. Τέλος, έχουν εντοπιστεί άτομα σε υψόμετρο λίγα μέτρα πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (Ψαθόπυργος, Ροδιά) έως 1800μ. πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (όρος Παναχαϊκό).

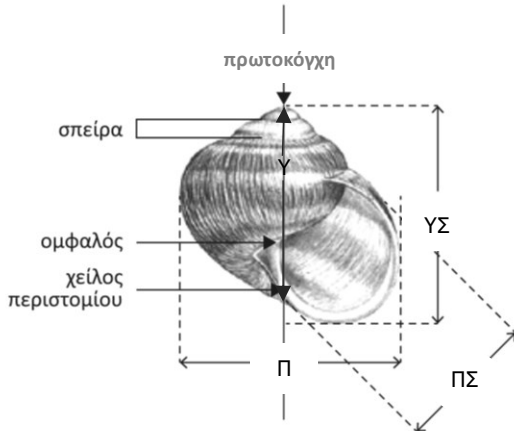
Το *C. parnassia* εξαπλώνεται αποκλειστικά στη Στερεά Ελλάδα. Οι πληθυσμοί του εντοπίζονται στους νομούς Ευρυτανίας, Φθιώτιδας, Φωκίδας και Βοιωτίας. Το βορειοδυτικότερο τμήμα της κατανομής είναι το όρος Τυμφρηστός στην Ευρυτανία. Επιπλέον, έχουν βρεθεί άτομα βορειοδυτικά της Αττικής, στο όρος Κιθαιρώνας. Πληθυσμοί του είδους εντοπίζονται από λίγα μέτρα πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (Λουτρά Θερμοπύλων) έως και 2000-2400μ. υψόμετρο (κορυφές του Παρνασσού, του Τυμφρηστού και της Γκιώνας).



Εικόνα 1.1. (α)Χάρτης των περιοχών κατανομής των ειδών του γένους *Codringtonia*. Επανασχεδιασμός του χάρτη από Subai (2005) και Κοτσακιάζη (2013). (β) Χάρτης με σημεία όπου έχει παρατηρηθεί το είδος (συντεταγμένες από Κοτσακιάζη 2014, γεωγραφική αποδελτίωση από Subai (2005) και στοιχεία από μουσείο Βέρνης). Κάθε διαφορετικό μοτίβο (α) ή χρώμα σε κουκκίδα (β) αντιπροσωπεύει διαφορετικό είδος.

1.2.2 Περιγραφή των ειδών *Codringtonia*

Τα είδη του γένους *Codringtonia* παρουσιάζουν μερικές εμφανείς μορφολογικές διαφορές που συμβάλλουν στη διάκριση των ειδών. Οι σημαντικότερες διαφορές τους εστιάζονται στο μέγεθος, στο σχήμα και το χρώμα του κελύφους (Hadjicharalambous, 1996). Ωστόσο, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη ότι αυτοί οι χαρακτήρες επηρεάζονται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, ταυτόχρονα με τη φαινοτυπική πλαστικότητα που ενυπάρχει στους πληθυσμούς, η διάκριση των ειδών αποκλειστικά από το κέλυφός τους, καθίσταται δύσκολη έως κι ενίοτε ανέφικτη (Hadjicharalambous, 1996).



Εικόνα 1.2. Χαρακτηριστικά του κελύφους χειρσαίου σαλιγκαριού, όπου Υ το ύψος και Π το πλάτος του κελύφους, ΥΣ το ύψος και ΠΣ το πλάτος του ανοίγματος.

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.

Το είδος *C. helenae* είναι ένα μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, στο κέλυφος του οποίου επίσης παρατηρούνται στενές ραβδώσεις. Το είδος αυτό έχει καλυμμένο ομφαλό, ενώ σε κάποιους πληθυσμούς μπορεί να υπάρχει ένα άνοιγμα ή ενίοτε εμφανίζεται είναι ημικαλυμμένος. 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.

Το είδος *C. gittenbergeri* 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.

Το είδος *C. elisabethae* θεωρείται μεγάλο ως μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, με σκληρό ανοιχτόχρωμο κέλυφος, με κυρίως αχνές καφετί 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.

Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του κελύφους όλων των ειδών αναφέρονται στις παραγράφους που ακολουθούν και φωτογραφίες αυτών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**. Η περιγραφή στηρίζεται στην τελευταία αναθεώρηση από τον Subai (2005). Για τις διαστάσεις του κελύφους έχουν χρησιμοποιηθεί 4 μετρήσεις (**Εικόνα 1.2**), 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 αναθεώρηση του γένους.

Το είδος *C. codringtonii* αποτελεί ένα μεγάλο είδος σαλιγκαριού, το κέλυφος το οποίου είναι κωνικό-σφαιρικό, καφέ χρώματος και με ανοιχτόχρωμες ραβδώσεις στην επιφάνεια του.

Το είδος *C. eucineta* αποτελεί μεγάλο ως μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, με ανοιχτόχρωμο καφέ κέλυφος. Έχει καλυμμένο τον ομφαλό, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις φέρει 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.

Το είδος *C. intusplicata* είναι ένα μικρό ως μεσαίου μεγέθους είδος σαλιγκαριού, με υπόλευκο κέλυφος με πολύ λεπτές, 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.

Το είδος *C. parnassia* θεωρείται μικρό ως μεσαίου μεγέθους σαλιγκαριού, με ανοιχτόχρωμο κέλυφος που φέρει στενές ραβδώσεις. Ο ομφαλός τους είναι καλυμμένος, ή φέρει μια μικρή τομή. Η πρωτοκόγχη τους είναι 1,5- 1,75 σπείρες ενώ τα ενήλικα διαθέτουν 3,75-5,25 σπείρες. 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.







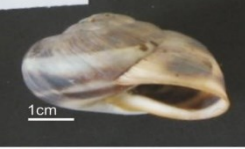








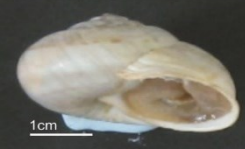
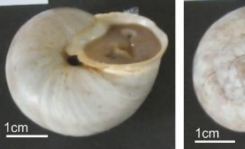

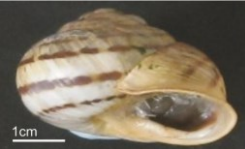


1.2.3 Καθεστώς Προστασίας Γένους

Από το 1996, η Χατζηχαραλάμπους στη διδακτορική της διατριβή αναφέρει ότι οι φυσικοί πληθυσμοί των ειδών του γένους εμφανίζουν αισθητή μείωση (Hadjicharalambous, 1996) με φθίνουσα πληθυσμιακή τάση, κάτι που φαίνεται να υποστηρίζει και η Διεθνής Ένωση Προστασίας της Φύσης (International Union for Conservation of Nature, IUCN, 2011). Η μεν το αποδίδει μερικώς στο ότι όλα τα είδη του γένους είναι εδώδιμα (Hadjicharalambous, 1996) κι η δε στην κλιματική αλλαγή, εξαιτίας της οποίας τα είδη έχουν υποστεί μετατόπιση και μεταβολή του ενδιαίτηματός τους (IUCN, 2011). Σήμερα, όλα τα είδη εντάσσονται στο κόκκινο βιβλίο των απειλούμενων ζώων της Ελλάδας χαρακτηριζόμενα ως τρωτά (vulnerable-VU) (Legakis & Maragou, 2009). Ενώ, σε παγκόσμιο επίπεδο, η πιο πρόσφατη αξιολόγηση της IUCN τα εντάσσει στον Ερυθρό Κατάλογο χαρακτηρίζοντάς τα όλα επίσης ως τρωτά. Εξαιρέση αποτελεί το τυπικό είδος του γένους, το *C. codringtonii*, που το συγκαταλέγει στα κινδυνεύοντα (endangered-EN), εξαιτίας τόσο της περιορισμένης κατανομής του στη δυτική Μεσηνία, όσο και της επίδρασης της ξηρασίας στους πληθυσμούς του (IUCN, 2011) (Πίνακας 2).

1.2.4 Στοιχεία οικολογίας

Τα είδη *Codringtonia* είναι σαλιγκάρια μεγάλου μεγέθους (Subai, 2005). Εμφανίζονται σε ποικιλία μικροενδιαιτημάτων. Συναντώνται σε βιότοπους με μακία βλάστηση, δάση φυλλοβόλων και κωνοφόρων, με εξαίρεση τα δάση πεύκης. Αναγκαία αλλά όχι ικανή συνθήκη για την παρουσία των συγκεκριμένων ειδών σε ένα βιότοπο είναι η ύπαρξη ασβεστολιθικών βράχων, καθότι οι σχισμές τους αποτελούν το βασικό τους ενδιαίτημα (Hadjicharalambous, 1996). Απαντώνται σε περιοχές ποικίλου υψομετρικού εύρους, ξεκινώντας σχεδόν από το επίπεδο της θάλασσας με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα το τυπικό είδος *C. codringtonii* που εντοπίζεται στο Ναβαρίνο (3μ.) έως και σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 2000μ., όπως το *C. parnassia* στη Γκίωνα (Subai 2005).

Πίνακας 2. Φωτογραφίες κελυφών(Κοτσακιάζη, 2013) και καθεστώς προστασίας ανά είδος (EN: κινδυνεύον, VU:τρωτό)

Είδος	Φωτογραφίες ατόμων ανά είδος & Καθεστώς Προστασίας IUCN			
<i>C. codringtonii</i>				EN
<i>C. helena</i>				VU
<i>C. gittenbergeri</i>				VU
<i>C. elisabethae</i>				VU
<i>C. eucineta</i>				VU
<i>C. intusplicata</i>				VU
<i>C. parnassia</i>				VU

1.2.5 Στοιχεία βιολογίας

Ο βιολογικός κύκλος οριοθετείται χρονικά αλλά και αναπτυξιακά, από τη στιγμή της γέννησης έως τη σεξουαλική ωρίμανση, ενώ συνδέεται επίσης και με τις στρατηγικές αναπαραγωγής και επιβίωσης που ακολουθούν τα άτομα (Κοτσακιάζη, 2013). Στα χερσαία σαλιγκάρια, το στάδιο της αναπαραγωγικής ωρίμανσης καθορίζεται από τον πλήρη σχηματισμό του χείλους. Για τα είδη του γένους *Codringtonia*, η αναπαραγωγική ωρίμανση πραγματοποιείται τέσσερα χρόνια μετά από τη γέννηση τους, ενώ κάποια άτομα μπορεί να αποκλίνουν θετικά ή αρνητικά χρονικά, γεγονός που σχετίζεται με το ρυθμό ανάπτυξής τους (Hadjicharalambous, 1996). Όταν οι καιρικές συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές, τα σαλιγκάρια διακόπτουν τη δραστηριότητά τους και πέφτουν σε διάπαυση.

Για τα είδη του γένους μελέτης, η αναπαραγωγική περίοδος αρχίζει λίγες εβδομάδες μετά το τέλος της διαχείμασης, όπου πυροδοτείται από τη θερμοκρασία όταν αυτή υπερβαίνει τους 15 °C. Ως εκ τούτου, η αναπαραγωγή είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις ετήσιες κλιματικές συνθήκες. Συνήθως, ξεκινά στα τέλη Φεβρουαρίου έως τα μέσα Μαρτίου, διαρκεί περίπου 2 με 2,5 μήνες και ολοκληρώνεται το Μάιο μιας και το καλοκαίρι, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών δεν παρατηρείται αναπαραγωγική δραστηριότητα. (Hadjicharalambous, 1996). Ωστόσο, η αναπαραγωγή του *Codringtonia* κατά τους ανοιξιάτικους μήνες μοιάζει ασυνήθιστη, διότι είναι συμπεριφορά που απαντάται κατά κύριο λόγο στα είδη σαλιγκαριών που κατανέμονται πιο βόρεια, καθότι τα σαλιγκάρια της νότιας Ελλάδας αναπαράγονται συνήθως το φθινόπωρο (Parnakelis & Mylonas, 2002). Η αναπαραγωγή την άνοιξη θεωρείται μια υπολειμματική στρατηγική των ειδών από περιόδους, όπου η καταλληλότερη κλιματολογικά περίοδος αναπαραγωγής ήταν η άνοιξη, όπως η τελευταία παγετώδης περίοδος (Hadjicharalambous, 1996).

Όπως και στα υπόλοιπα είδη χερσαίων σαλιγκαριών, έτσι και στα είδη του γένους *Codringtonia*, την αναπαραγωγή σηματοδοτεί ένας μεγάλης διάρκειας ερωτικός χορός, που θα οδηγήσει στην ανταλλαγή σπερματοφόρων μεταξύ των ατόμων. Ένα μήνα μετά από το ζευγάρισμα, η ωοαπόθεση πραγματοποιείται σε φωλιά (τρύπα στο έδαφος), η κατασκευή της οποίας μπορεί να διαρκέσει έως και 48 ώρες, ενώ η ωοαπόθεση διαρκεί περίπου ένα 24ωρο (18-56 αυγά ανά φωλιά). Μετά το πέρας της διαδικασίας, η φωλιά σφραγίζεται με μείγμα χώματος και βλέννας από το ίδιο το ζώο, ενώ ένα μήνα περίπου μετά εκκολάπτονται τα αυγά και τα μικρά παραμένουν στις φωλιές τους μέχρι τις πρώτες βροχές του φθινοπώρου. Τα σαλιγκάρια ακολουθούν r-στρατηγική, η οποία συνοδεύεται από την επένδυση στην ωοαπόθεση κι εκκόλαψη πολυάριθμων αυγών με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας, λόγω κυρίως της ξηρασίας και θηρευτών (Hadjicharalambous, 1996; Κοτσακιάζης, 2013).

Μετά τη δραστηριοποίηση των ειδών κατά το φθινόπωρο, το χειμώνα πέφτουν σε διαχείμαση για να ενεργοποιηθούν ξανά την άνοιξη κατά τη διαδικασία της αναπαραγωγής. Επίσης, παύουν τη δραστηριότητά τους και κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (διαθέριση), μια στρατηγική που πραγματοποιείται ευκαιριακά και εξαρτάται άμεσα από τις κλιματικές συνθήκες (Hadjicharalambous, 1996). Ως εκ τούτου, τα είδη *Codringtonia* εμφανίζουν δύο περιόδους δραστηριότητας και δύο περιόδους διάπαυσης (Giokas *et al.*, 2007), Τόσο η χειμερινή όσο και η καλοκαιρινή διάπαυση είναι σχετικά καθορισμένης διάρκειας (Hadjicharalambous, 1996). Η διάπαυση είναι ένα είδος αερόβιας νάρκης στην οποία καταφεύγουν πολλά είδη οργανισμών (σπονδυλωτά και ασπόνδυλα). Η κατάσταση αυτή επέρχεται μέσω πληθώρας σημάτων όπως είναι η ξηρασία, οι υψηλές θερμοκρασίες, το χιόνι, μειωμένη διαθεσιμότητα τροφής. Απαιτεί πλήθος φυσιολογικών και συμπεριφορικών μηχανισμών, που αποσκοπούν στη μείωση του μεταβολικού ρυθμού και την εξασφάλιση επαρκών ενεργειακών αποθεμάτων για την επιβίωση των ζώων (Κοτσακιάζης, 2013). Τα χερσαία γαστερόποδα, όταν πέφτουν σε διάπαυση δημιουργούν ένα κάλυμμα από βλέννα, το επίφραγμα, το οποίο φράζει το στόμιο με αποτέλεσμα να μειώνονται οι απώλειες νερού (Barnhart, 1983).

1.3 Περιοχή Μελέτης

Η περιοχή μελέτης εκτείνεται στα γεωγραφικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου και της Στερεάς Ελλάδας – κυρίως στην κεντρική ηπειρωτική περιοχή της (Εικόνα 1.3.)



Εικόνα 1.3. Απεικόνιση περιοχής μελέτης με γκρινά χρώμα.

1.3.1 Εισαγωγικά Στοιχεία Πελοποννήσου

Το γεωγραφικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου περιλαμβάνει τη μεγαλύτερη χερσόνησο της Ελλάδας, με έκταση 21.649 τετραγωνικά χιλιόμετρα (περίπου το 16.4% της επικράτειας). Ανατολικά βρέχεται από το Αιγαίο Πέλαγος, δυτικά από το Ιόνιο, βόρεια από τον Κορινθιακό κόλπο και νότια από το Μυρτώο πέλαγος. Το γεωμορφολογικό ανάγλυφο της Πελοποννήσου είναι κυρίως ορεινό και απότομο. Στα βόρεια της υψώνονται τρεις ορεινοί όγκοι πάνω από 2000 μέτρα, ο Ερύμανθου, ο Χελμός και η Ζήρια. Στην κεντρική Πελοπόννησο κυριαρχεί το Μαίναλο, ενώ νοτιότερα υπάρχουν οι οροσειρές του Ταυγέτου και του Πάρνωνα, με ψηλότερη την κορυφή του Ταυγέτου, τον Προφήτη Ηλεία. Οι μεγαλύτερες πεδιάδες αναπτύσσονται παραλιακά στα βορειοδυτικά (Αχαΐα, Ηλεία) και στα ανατολικά (Αργος) αλλά και στις κοιλάδες των ποταμών Ευρώτα στη Λακωνία και Πάμισου στη Μεσσηνία. Το κλίμα της Πελοποννήσου είναι γενικά μεσογειακό ή ξηρού θέρους υποτροπικό και χαρακτηρίζεται από θερμό και παρατεταμένης ξηρασίας καλοκαίρι και ήπιο, βροχερό χειμώνα.. Στην Πελοπόννησο εμφανίζονται όλες σχεδόν οι γεωλογικές ζώνες με κυριότερα υπόβαθρα όπως ασβεστόλιθοι, φλύσχης, άμμος, κροκαλοπαγείς σχηματισμοί, άργιλος κ. ά (WWF Ελλάς, 2012). Επιπλέον, η Πελοπόννησος εμφανίζει από τα μεγαλύτερα ποσοστά ενδημισμού σε χερσαία σαλιγκάρια (52%) στην Ελλάδα (Vardinoyannis et al., 2018).

1.3.2 Εισαγωγικά Στοιχεία Στερεάς Ελλάδας

Το γεωγραφικό διαμέρισμα της Στερεάς Ελλάδας εμφανίζεται ως μία εγκάρσια ορεινή ζώνη στον κύριο κορμό της χώρας, ανοιχτή τόσο στο Ιόνιο στα δυτικά και στο Αιγαίο πέλαγος στα ανατολικά. Στα νότια βρέχεται από τον κορινθιακό κόλπο και στα βόρεια συνορεύει με Θεσσαλία και Ήπειρο. Η έκτασή της αντιστοιχεί στο 18.1% της Ελλάδας (23.913 τετραγωνικά χιλιόμετρα). Η μορφολογία του εδάφους της χαρακτηρίζεται από έντονους ορεινούς όγκους. Στην κεντρική Ελλάδα κυριαρχεί ένα ορεινό σύμπλεγμα με τρία ψηλότερα βουνά τη Γκιώνα, τα Βαρδούσια και τον Παρνασσό (όλα πάνω από 2.400 μέτρα υψόμετρο). Προς τα δυτικά ξεχωρίζουν τα Ακαρνανικά όρη, στα ανατολικά υψώνονται δύο οροσειρές με ψηλότερο βουνό τον Καλλίδρομο ενώ η άλλη οροσειρά περιλαμβάνει τα όρη Ελικώνας, Κιθαιρώνας, Πατέρας, Πάρνηθα, Πεντέλη, και Υμηττό. Οι πεδιάδες με εξαίρεση της Αιτωλοακαρνανίας και της Βοιωτίας, είναι λίγες. Στη Στερεά Ελλάδα εμφανίζονται επίσης, σχεδόν όλες οι γεωλογικές ζώνες. Τα κυριότερα πετρώματα της περιοχής είναι ασβεστόλιθοι, φλύσχης και σχιστόλιθοι (WWF Ελλάς, 2012).

1.4 Παλαιογεωγραφία Περιοχής Μελέτης

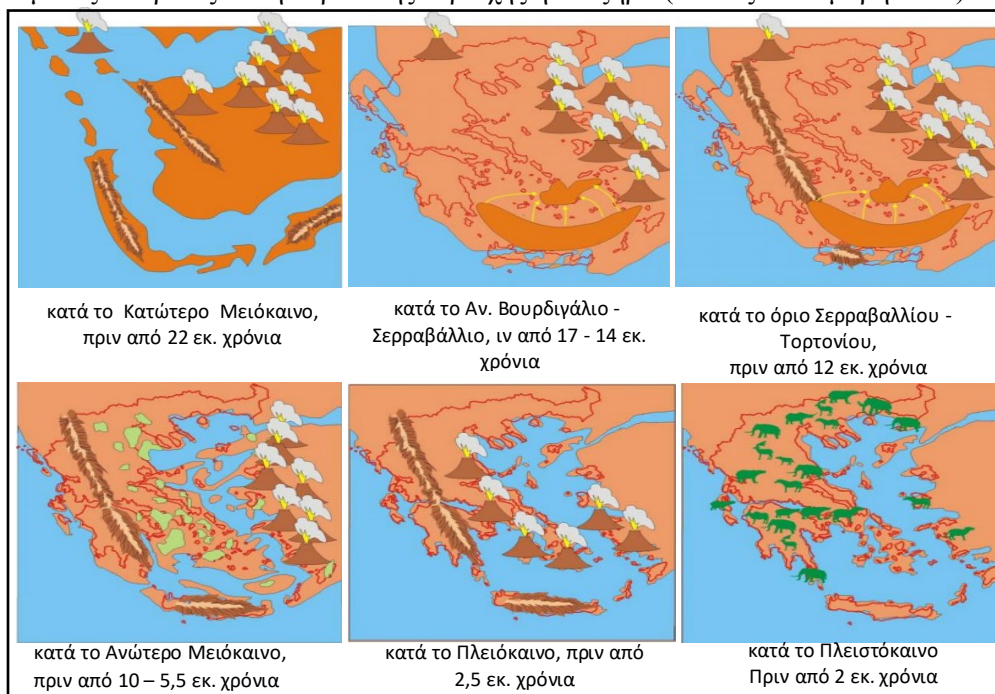
1.4.1 Γενικά

Κατά τη διάρκεια της Μεσοζωικής-Καινοζωικής περιόδου ο ελλαδικός χώρος αποτελούσε τμήμα του βυθού της Τηθύος θάλασσας, ως το τέλος της Ιουρασικής περιόδου. Σταδιακά, άρχισαν να αναδύονται τα πρώτα μεγάλου πάχους ιζήματα, που αποτέθηκαν στο θαλασσεύοντα ελληνικό χώρο, τα οποία όμως αργότερα, κατά το μέσον της Κρητιδικής περιόδου (100-120 εκατ. έτη πριν), καλύφθηκαν ξανά από την θάλασσα. Ουσιαστικά, η ιστορία του ελλαδικού χώρου ξεκινά κατά το Ολιγόκαινο (30 Mya). Την περίοδο αυτή το Αιγαίο αποτελούσε ενιαία ηπειρωτική περιοχή, γνωστή ως Αιγαίδα, η οποία καταλάμβανε τη Μικρά Ασία, τη σημερινή ηπειρωτική Ελλάδα, τα νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου, και εκτεινόταν νότια περιλαμβάνοντας και την Κρήτη. Στο βορρά ο ελλαδικός χώρος χωριζόταν από την κεντρική Ευρώπη με τη θάλασσα της Παρατηθύος (Φοίτος & Καμάρη 2009).

Κατά το Βουρδιγάλιο (17 Mya), η επικοινωνία της Μεσογείου με τον Ινδικό ωκεανό διακόπηκε με αποτέλεσμα το κλίμα να γίνει υγρό και ξηρό. Στη συνέχεια, στο Σεραβάλιο (14,5-12 Mya), ο ενιαίος όγκος ξηράς στην περιοχή του Αιγαίου άρχισε να κατακερματίζεται. Ακολούθησε ο σχηματισμός λιμνών με γλυκά και υφάλμυρα νερά, και στο βορρά συνδέθηκε η ηπειρωτική Ελλάδα με την κεντρική Ευρώπη. Στο Τορτόνιο (10,5-7,5 Mya), η λεκάνη του Κρητικού Πελάγους κατέληξε να καθιζάνει με αποτέλεσμα την εισροή θαλάσσιων υδάτων και την απαρχή της δημιουργίας του Αιγαίου Πελάγους. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε βάθυνση του Κρητικού Πελάγους αλλά και ανύψωση ορεινών όγκων (Ιδη). Η εισροή των γλυφών ή/και θαλάσσιων νερών οδήγησε στον κατακερματισμό της Κρήτης και την αποκοπή της από την ενιαία μάζα ξηράς. Εν συνεχεία, βορειότερα, η θάλασσα που διείσδυσε χώρισε τις Κυκλάδες από τα νησιά του Αν. Αιγαίου και την Πελοπόννησο. Ωστόσο, οι σύνδεση των Κυκλάδων διατηρήθηκε τόσο με την Αττική όσο και με τη νότιο Εύβοια.

Κατά το Μεσσηνίο (6,5-5,5 Mya), λόγω σύγκρουσης της βορειοδυτικής Αφρικής με την Ιβηρική χερσόνησο, τα στενά του Γιβραλτάρ έκλεισαν, με αποτέλεσμα η επικοινωνία της Μεσογείου με τον Ατλαντικό Ωκεανό να διακοπεί. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη αποστράγγιση της περιοχής και στη γνωστή «κρίση αλατότητας». Χαρακτηριστικά της κρίσης ήταν η ανύψωση πολλών περιοχών και οι εκτεταμένες γέφυρες ξηράς που αποτέλεσαν διαδρόμους επικοινωνίας και μετακίνησης πολλών πανιδικών και χλωριδικών στοιχείων, καθώς και η δημιουργία μεγάλων και αλμυρών λιμνών και κλειστών θαλασσών στην περιοχή του Αιγαίου, οι οποίες όμως θα πρέπει να ήταν «νεκρές» εξαιτίας της υψηλής αλατότητας (Demitzakis 1990). Η κρίση αλατότητας οδήγησε σε πιο άνυδρο κλίμα. Η Πικερμική πανίδα που βρέθηκε στις περιοχές της Σάμου, της Κω, της Εύβοιας και της Αττικής, αποτελεί απόδειξη της μετακίνησης ζώων της Αφρικής προς τον ελλαδικό χώρο. Στις γεωλογικές περιόδους που ακολούθησαν μετά το Μειόκαινο, η Αιγαίδα άρχισε να αλλάζει λόγω ευστατικών και τεκτονικών κινήσεων.

Με την έναρξη του Πλειστοκαίνου (2 Mya) ξεκινούν οι παγετώδεις και οι μεσοπαγετώδεις περιόδους. Οι παγετώνες κατά το Πλειστόκαινο προκάλεσαν μείωση της στάθμης της θάλασσας από 100 έως 180 μέτρα σε σχέση με σήμερα. Οι μεταβολές της θαλάσσιας στάθμης καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου αυτής οδήγησαν άλλες φορές σε συνένωση περιοχών και άλλες φορές σε αποχωρισμό τους. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία διόδων, για τη μετακίνηση και διακίνηση των πληθυσμών και τη μετέπειτα καταστροφή τους. Στη διάρκεια της τελευταίας παγετώδους περιόδου η Πελοπόννησος ήταν ενωμένη με την κεντρική Ελλάδα τόσο στα βορειοδυτικά της όσο και στα βορειοανατολικά μέσω του Ισθμού της Κορίνθου ενώ ο Κορινθιακός Κόλπος σχημάτιζε λίμνη. Μεταξύ της Αργολίδας και της Αττικής εκτεινόταν μια πεδιάδα στην οποία τα σημερινά νησιά πρόβαλαν ως απομονωμένοι λόφοι. Τα στενά μεταξύ Εύβοιας και ηπειρωτικής περιοχής ήταν ξηρά (Φοίτος & Καμάρη 2009).



Εικόνα 1.4. Παλαιογεωγραφική αναπαράσταση του ελλαδικού χώρου το διάστημα μεταξύ 22-2 εκ. χρόνων πριν (Επανασχεδιασμός από Δερμιτζάκης & Ντρίνια, 2010).

1.4.2 Παλαιογεωγραφία Πελοποννήσου & Στερεάς Ελλάδας

Η ξηρά που σχηματίστηκε κατά το ανώτερο Ηώκαινο (περίπου 33.000.000 χρόνια πριν), από τα ανατολικά προς τα δυτικά, σαν συνέχεια της Αιγαΐδας στην περιοχή που σήμερα ονομάζουμε Πελοπόννησο έχει μια πολύπλοκη και περιπετειώδη ιστορία (Ιατρού, 1986). Κατά το Μέσο προς Ανώτερο Μειόκαινο (περίπου 17.000.000 χρόνια πριν) αποκόπηκε από την υπόλοιπη Αιγαϊκή ξηρά, με διάφορα ρήγματα, η "Πελοπόννησος". Η αποκοπή από την ξηρά που αντιστοιχούσε στη σημερινή Στερεά Ελλάδα έγινε με ρήγματα που σχημάτισαν τον Πατραϊκό και τον πρόδρομο του Κορινθιακού κόλπου. Ταυτόχρονα έγινε και η αποκοπή από την Κρήτη με ρήγματα νότια των Αντικυθήρων ενώ η αποκοπή από τη Ζάκυνθο έγινε αργότερα (Ιατρού, 1986). Κατά το Πλειόκαινο (περίπου 2.000.000 χρόνια πριν) μεγάλο μέρος της Πελοποννήσου σκεπάζεται από θάλασσα και παραμένουν σαν ξηρά μόνο οι περιοχές της Αργολίδας, του Πάρνωνα-Κυθήρων, του Ταυγέτου και τμήματα της κεντρικής και

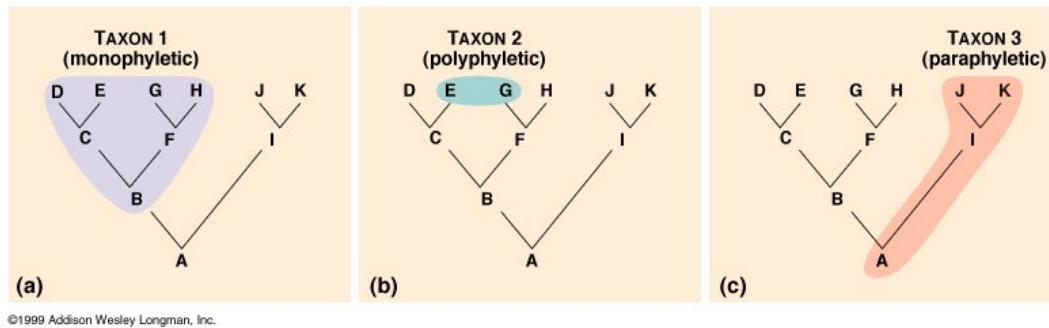
κεντροδυτικής Πελοποννήσου. Μετά τις Βαλαχικές ορογενετικές κινήσεις του Πλειστοκαίνου το βόρειο τμήμα της Πελοποννήσου ξαναεμφανίζεται και ξανασυνδέεται με τη Στερεά Ελλάδα, με τον οριστικό διαχωρισμό τους να πραγματοποιείται αργότερα (περίπου 900.000 χρόνια πριν) (Ιατρού, 1986).

1.5 Φυλογένεση, Φυλογεωγραφία και εκτίμηση φυλογενετικών σχέσεων με τη χρήση μοριακών δεικτών

Ο όρος Φυλογένεση (από τα φυλή, φῦλον και γεννῶ, γένεση, γενετικός, δηλαδή η προέλευση/γέννηση της φυλής) επινοήθηκε από τον αναπτυξιακό βιολόγο Ernst Haeckel το 1866 και στη συνέχεια υιοθετήθηκε από τον Δαρβίνο το 1869 (McLennan, 2010). Συνολικά, ο Haeckel αντιμετώπιζε την φυλογένεση ως την προσπάθεια εντοπισμού και μελέτης του κοινού προγόνου (Mayr and Bock, 2002). Από τότε έχουν υπάρξει και άλλοι ορισμοί με κυριότερο αυτό του Hennig (1966), ο οποίος προσέγγιζε τη μελέτη της φυλογένεσης ως μια διαδικασία που ξεκινούσε, αντί να καταλήγει, στο προγονικό είδος (Dopazo & Leonardo, 2006). Σήμερα, ο όρος χρησιμοποιείται με πολύ πιο ευρύ τρόπο (Ax, 1985), περιγράφοντας τη μελέτη των σχέσεων μεταξύ ειδών και πληθυσμών, αποσκοπώντας στην ανεύρεση των εξελικτικών κρίκων που τα συνδέουν (Felsenstein, 2003). Βασική (δαρβινική) αρχή αυτής της διαδικασίας είναι ότι όλοι οι οργανισμοί έχουν προέλθει από έναν κοινό πρόγονο που ήταν η πρώτη μορφή ζωής που εμφανίστηκε στη Γη.

Η ανασύσταση της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών μελέτης απεικονίζεται σε διακλαδισμένα διαγράμματα, τα φυλογενετικά δέντρα, και βασίζεται σε συγκεκριμένα στοιχεία, τους «χαρακτήρες» (Gregory, 2008; Wiley & Lieberman, 2011). Τα φυλογενετικά δέντρα εμπεριέχουν την έννοια του χρόνου και πληροφορία σχετικά με τους προγόνους, τη διάρκεια των εξελικτικών γραμμών και την ποσότητα των εξελικτικών αλλαγών που έχουν συμβεί. Επιπλέον, οι χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι είτε φαινοτυπικοί (μορφολογικοί χαρακτήρες, πρωτεΐνες κ.α.) είτε γενετικοί (αλληλουχίες DNA, μικροδορυφορικούς τόπους, AFLPs κ.α.) (Dopazo & Leonardo, 2006; Wiley & Lieberman, 2011).

Βασική προϋπόθεση στη Φυλογένεση είναι η ομολογία των χαρακτήρων, δηλαδή η χρήση βιολογικών χαρακτηριστικών που έχουν προέλθει μέσω κοινής καταγωγής, έτσι ώστε να είναι εφικτή η διαπίστωση της τελευταίας (Wiley & Lieberman, 2011). Η φυλογενετική συστηματική αναγνωρίζει τρία βασικά πρότυπα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ δύο ζευγών taxa (Avice, 2000): α) τη **μονοφυλία** (monophyly) ή μονοφυλετική ομάδα, β) την **παραφυλία** (paraphyly) ή παραφυλετική ομάδα και γ) την **πολυφυλία** (polyphyly) ή πολυφυλετική ομάδα (**Εικόνα 1.5**). Ως **μονοφυλία** ορίζεται η ταξινομική ομαδοποίηση που περιλαμβάνει τον αποκλειστικό κοινό πρόγονο αλλά υποχρεωτικά και όλους τους απογόνους του. Πρακτικά, σε ένα κλαδόγραμμα ως μονοφυλία θεωρείται κάθε κόμβος μαζί με όλους τους κλάδους που εκφύονται από αυτόν (**Εικόνα 1.5a**) και καθορίζεται αποκλειστικά από συναπομορφίες. Πολυφυλίες, είναι ομαδοποιήσεις ταξινομικών ομάδων που δεν μοιράζονται πρόσφατο κοινό πρόγονο (**Εικόνα 1.5b**). Τέλος, μία ομαδοποίηση που αποκλείει κάποιους από τους απογονικούς κλάδους και υποστηρίζεται από συμπλησιομορφίες (η κοινή παρουσία πλησιομορφικών χαρακτήρων που διατηρούνται από το προγονικό taxon στα απογονικά χωρίς αλλαγές) χαρακτηρίζεται ως παραφυλία (**Εικόνα 1.5c**).



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Εικόνα 1.5. Απεικόνιση φυλογενετικών ταξινομικών ομαδοποιήσεων (πηγή εικόνας: https://www.mun.ca/biology/scarr/Taxon_types.htm)

Η χρήση των γενετικών χαρακτήρων και συγκεκριμένα η δυνατότητα αλληλούχισης του DNA, είναι αυτή που έδωσε γένεση και στο πεδίο της Μοριακής Φυλογένεσης, προσέγγιση η οποία χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, η Μοριακή Φυλογένεση βασίζεται στη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών χρησιμοποιώντας τους γενετικούς δείκτες (συνήθως αλληλουχίες DNA) και επιχειρεί να εκτιμήσει και να ποσοτικοποιήσει με τη βοήθεια στατιστικών προσεγγίσεων τις διαφορές μεταξύ αυτών ώστε να ερμηνεύσει τις σχέσεις της εκάστοτε μονάδας μελέτης. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, εκτιμώνται οι σχέσεις είτε βάσει χαρακτήρων, είτε βάσει γενετικών αποστάσεων ή βάσει εξελικτικών μοντέλων (Kuhner and Felsenstein, 1994).

Η απεικόνιση των σχέσεων αυτών στο χώρο και η μελέτη της ιστορίας και της διαμόρφωσής τους πραγματοποιείται από τον κλάδο της Φυλογεωγραφίας (Avisé et al., 1987). Ο όρος **Φυλογεωγραφία** ασχολείται με τη μελέτη των αρχών και των διαδικασιών που καθορίζουν τα γεωγραφικά πρότυπα κατανομής των γενεαλογικών γραμμών, ειδικά εκείνων εντός του είδους καθώς και μεταξύ συγγενικών ειδών (Avisé 2000). Κύριοι στόχοι της φυλογεωγραφίας λοιπόν, είναι η κατανόηση των χωρικών και χρονικών συνιστωσών της δομής των πληθυσμών και η ερμηνεία των εξελικτικών και οικολογικών διαδικασιών που ευθύνονται για την εκάστοτε δομή (Beheregaray 2008). Συνολικά, οι εξελικτικές σχέσεις και οι γεωγραφικές κατανομές αποτελούν τους βασικούς άξονες της φυλογεωγραφίας πάνω στους οποίους «χαρτογραφούνται» οι υπό μελέτη γονιδιακές γενεαλογίες (Avisé 2000, Freeland et al. 2011). Ως εκ τούτου, οι φυλογεωγράφοι επιχειρούν να ερμηνεύσουν τον τρόπο και το βαθμό στον οποίο οι διάφορες ιστορικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη δημογραφία των πληθυσμών, έχουν αφήσει τα εξελικτικά τους αποτυπώματα στη σύγχρονη γεωγραφική κατανομή των γονιδιακών γραμμών των (Avisé, 2000; Freeland et al. 2011).

Ωστόσο, η στοχαστικότητα των γενετικών διεργασιών κι η ενδεχόμενη ιστορική πολυπλοκότητα των μελετώμενων τάξεων αποτελούν εν δυνάμει τροχοπέδη στις φυλογεωγραφικές μελέτες (Knowles 2004) καθότι απαιτούνται εκτενή δεδομένα από πηγές όπως λ.χ. παλαιογεωγραφίας, γεωλογίας, μοριακής οικολογίας και πληθυσμιακής γενετικής, δημογραφίας και ηθολογίας (Avisé, 2000). Ο συγκερασμός λοιπόν, μικροεξελικτικών

και μακροεξελικτικών διεργασιών κρίνεται απαραίτητος για την ανίχνευση και την κατανόηση των φυλογεωγραφικών προτύπων των οργανισμών, καθότι η φυλογεωγραφία καλύπτει ποικίλα εναλλακτικά σενάρια σχετικά με την ερμηνεία των χωρικών διευθετήσεων των οργανισμών και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Στη πιο απλή της μορφή, ασχολείται με τη χωρική κατανομή των απλοτύπων, των οποίων οι φυλογενετικές σχέσεις είναι γνωστές ή μπορούν να εκτιμηθούν. Μελετά δύο βασικά και μάλιστα ανταγωνιστικά ιστορικά φαινόμενα: τον βικαριανισμό και τη διασπορά -που καθορίζουν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, την προέλευση του χωρικού διαχωρισμού των ταξινομικών μονάδων.

Στην περίπτωση του βικαριανισμού, μεγάλο ρόλο διαδραματίζουν περιβαλλοντικά φαινόμενα όπως φαινόμενα ορογένεσης, αποχωρισμός ηπειρωτικών μαζών, ευστατικές μεταβολές κ.ά. (Avise, 2000). Ως αποτέλεσμα, οι πληθυσμοί ή άλλες ανώτερες ταξινομικές μονάδες, διαχωρίζονται όταν η λίγο έως πολύ συνεχής κατανομή της προγονικής μορφής κατακερματίζεται και εν τέλει απομονώνονται, γεγονός που δυσχεραίνει ή αποτρέπει τη γονιδιακή ροή μεταξύ τους και σταδιακά ευνοείται η διαδικασία της ειδογένεσης. Από την άλλη μεριά, κατά τη διασπορά, μια ταξινομική μονάδα αποκτά τη σημερινή της κατανομή μέσω ενεργητικής ή παθητικής διασποράς από ένα ή περισσότερα προγονικά κέντρα προέλευσης (Briggs, 2000).

Τέλος, άξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια, οι φυλογενετικές μέθοδοι στη φυλογεωγραφία έχουν εξελιχθεί με πιο εκλεπτυσμένο τρόπο. Συγκεκριμένα, η αναγνώριση και υιοθέτηση του πληθυσμιακού μοντέλου σύγκλισης/σύμφυσης («coalescent model») σε διάφορες μεθόδους (π.χ. BEAST) έχει συνεισφέρει σημαντικά στην αντικειμενικότερη προσέγγιση αναφορικά με τους τρόπους εξέλιξης και εξάπλωσης των ειδών ή των πληθυσμών. Επιπλέον, η υιοθέτηση του μοντέλου αυτού έχει παροτρύνει την συνδυαστική χρήση πολλαπλών γενετικών δεικτών και την ορθότερη εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ ειδών (Hickerson et al., 2010).

1.5.1 Φυλογενετική προσέγγιση του αριθμού ειδών ενός γένους -Δέντρο ειδών βάσει γενετικών τόπων

Οι προβληματικές προσεγγίσεις αναγνώρισης κάποιων ειδών σε συνδυασμό με την μεγάλη παραγωγή γενετικών δεδομένων, οδήγησε σε εκρηκτική ανάπτυξη νέων αλγορίθμων και μεθοδολογιών με στόχο την οριοθέτηση των ειδών ενός τάξου. Συγκεκριμένα, η οριοθέτηση των ειδών βάσει γενετικών τόπων, αποτελεί τη διαδικασία καθορισμού εκείνων των ομάδων ατόμων που συνθέτουν διαφορετικούς πληθυσμούς είτε ενός είδους είτε διαφορετικών ειδών. Ουσιαστικά, αναφέρεται στην αναγνώριση της βιολογικής ποικιλότητας σε επίπεδο είδους. Σε γενικές γραμμές, οι διαφορετικές μέθοδοι οριοθέτησης ειδών διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες (Camargo, 2013): Η πρώτη κατηγορία αφορά μεθόδους που οριοθετούν νέα είδη βάσει ενός γονιδίου ή βάσει γενετικών αποστάσεων. Η δεύτερη ευρύτερη κατηγορία μεθόδων οριοθέτησης ειδών αφορά εκείνες που λαμβάνουν υπόψη περισσότερους από έναν γενετικούς τόπους και μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε μεθόδους που απαιτούν μια a priori υπόθεση για τον αριθμό των ειδών του μελετώμενου τάξου και σε εκείνες που δεν απαιτούν τέτοιου τύπου πληροφορίες.

1.6.2 Πυρηνικοί δείκτες

Η χρησιμοποίηση πυρηνικών δεικτών γενετικών τόπων σε μελέτες εξέλιξης και πληθυσμιακής γενετικής, θεωρείται ότι συμβάλλει καθοριστικά στην κατανόηση αρκετών εξελικτικών διαδικασιών και επιτρέπει στη μελέτη του παρελθόντος των μελετώμενων οργανισμών σε μεγαλύτερο βάθος από ότι άλλοι ευρέως χρησιμοποιούμενοι μιτοχονδριακοί γενετικοί τόποι. Οι πυρηνικοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σε μελέτες γενετικής πληθυσμών είναι σχεδόν αποκλειστικά μικροδορυφορικές αλληλουχίες και ριβοσωμικά γονίδια (rDNA), καθότι ο καθορισμός των απλοτύπων σε αυτές τις περιπτώσεις είναι απλός. Συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση στους μικροδορυφορικούς τόπους οφείλεται κυρίως στο διαφορετικό ρυθμό επαναλήψεων του μικροδορυφορικού τύπου. Αντίστοιχα, τα ριβοσωμικά γονίδια ακολουθούν εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) και όλα τα αντίγραφα έχουν την ίδια αλληλουχία (Zhang & Hewitt, 2003) με υπάρχουσες σαφώς εξαερίσεις (Culver et al., 2001). Επιπροσθέτως, η ευρεία χρήση ριβοσωμικών γονιδίων σε εξελικτικές μελέτες, όπως η επίλυση φυλογενετικών σχέσεων σε ανώτερες ταξινομικές βαθμίδες (Olsen & Woese, 1993), αποδίδεται στο γεγονός ότι διαθέτουν χαρακτηριστικά όπως οι διαφορετικοί ρυθμοί εξέλιξης των περιοχών τους και ο τυχαίος αριθμός των επαναλήψεών τους που εξυπηρετούν στην αντιμετώπιση διαφόρων ερωτημάτων διαφορετικής φύσεως/υφής.

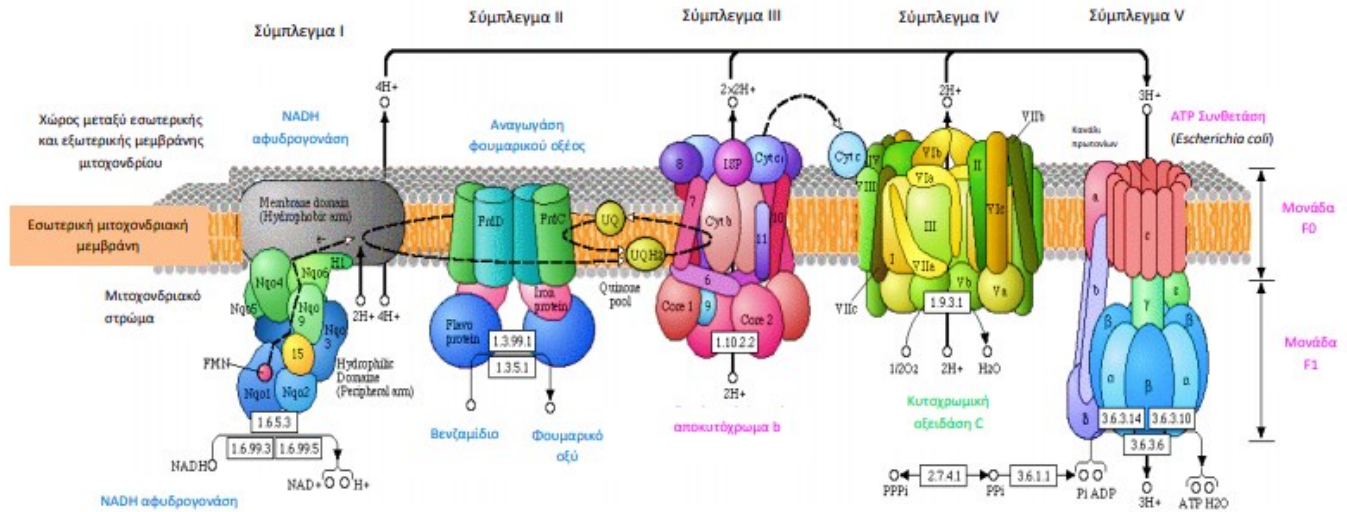
1.6.3 Μοριακοί δείκτες μελέτης

Η συνδυασμένη χρήση τόσο μιτοχονδριακών όσο και πυρηνικών δεικτών προσφέρει μια πιο πλήρη και αξιόπιστη ιστορία στη μοριακή και τη χωρική ιστορία των μελετώμενων taxa (Arnold, 2006; Fisher-Reid & Wiens, 2011; Breure et al, 2012; Baird et al., 2017; Hirano et al., 2017; Neiber & Hausdorf, 2017). Ως εκ τούτου, στην προσπάθεια να εμπλουτιστεί η ανασύσταση της φυλογεωγραφικής ιστορίας του γένους *Codringtonia*, να ανιχνευθεί το ενδεχόμενο υβριδισμού μεταξύ δύο αδελφών ειδών του γένους, αλλά και να μελετηθεί η δομή πληθυσμών στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός συντηρημένων και πιο ταχέως διαφοροποιούμενων δεικτών προκειμένου να αποσαφηνιστούν περαιτέρω οι σχέσεις των ειδών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τρία μιτοχονδριακά γονίδια: το γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI), το γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα II της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COII), και το γονίδιο για τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα (16S rDNA). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο ριβοσωμικοί πυρηνικοί τόποι: οι εσωτερικοί μεταγραφόμενοι παράγοντες ITS1 και ITS2 (Internal Transcribed Spacer 1 & 2).

1.6.3.1 COI & COII– Υπομονάδα I & II της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Cytochrome Oxidase, Subunit I & II)

Οι τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI, COII, COIII) αποτελούν πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA και ο ρόλος τους σχετίζεται με την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Εδράζονται στο σύμπλεγμα IV (Εικόνα 1.7.).

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ



Εικόνα 1.7. Ένζυμα αναπνευστικής αλυσίδας και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Το γονίδιο COI κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης και το γονίδιο COII κωδικοποιεί την υπομονάδα II αντίστοιχα. Το προϊόν της μεταγραφής και μετάφρασης τους συνδέεται με άλλα κυρίως πρωτεϊνικά μόρια ενώ δομούν το ενζυμικό σύμπλοκο IV της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Τα ένζυμα αυτά είναι διαμεμβρανικά στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια.

Το γονίδιο COI είναι ένα από τα μεγαλύτερα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και προτιμάται σε φυλογενετικές αναλύσεις λόγω του μεγάλου μεγέθους του, που προσφέρει περισσότερες θέσεις άρα και πληροφορίες, αλλά και λόγω του ότι περιέχει τόσο συντηρημένες όσο και πολυμορφικές αλληλουχίες (Elejalde et al, 2008; Chueca et al, 2015; Chueca et al, 2018). Οι περιοχές που αποτελούν το ενεργό κέντρο της υπομονάδας είναι πολύ πιο συντηρημένες από άλλες αλληλουχίες του ίδιου γονιδίου (Park et al. 2009). Επομένως, η εξέλιξη αυτού του γονιδίου είναι αρκετά γρήγορη ώστε να μπορεί να διαχωρίσει όχι μόνο στενά συγγενικά είδη, αλλά και φυλογεωγραφικές ομάδες μέσα σε ένα είδος. Παρότι το COI πρέπει να μελετηθεί μαζί με άλλα μιτοχονδριακά γονίδια για τη διαλεύκανση τέτοιων περιπτώσεων πρόσφατου διαχωρισμού (Kotsakiozi et al, 2012) αυτό το γονίδιο φαίνεται να παρέχει βαθύτερη φυλογενετική γνώση σε σχέση με άλλα μιτοχονδριακά, επειδή οι αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία συμβαίνουν πιο αργά σε σχέση με τα υπόλοιπα μιτοχονδριακά γονίδια (Simon et al. 1994). Έτσι, το συγκεκριμένο γονίδιο συμβάλλει στην διερεύνηση βαθύτερων φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στα γένη και τα είδη.

Το γονίδιο COII έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά σε φυλογενέσεις διάφορων οργανισμών (Piaggio & Spicer, 2001), έχει χρησιμοποιηθεί λιγότερο όμως στην ομάδα των χερσαίων γαστερόποδων (Hugall et al., 2002; Kotsakiozi et al, 2012; Horsáková et al, 2019).

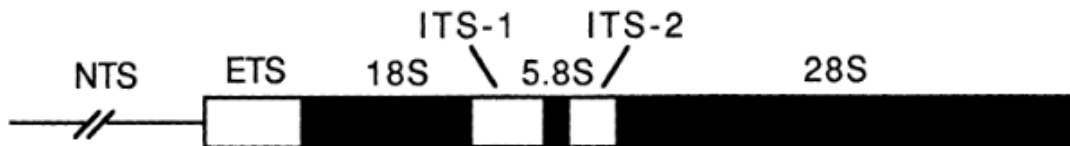
1.6.3.2 16S rDNA Μεγάλη Υπομονάδα Μιτοχονδριακού Ριβοσώματος

Από τα 37 γονίδια που περιέχει το μιτοχονδριακό DNA, τα δύο κωδικοποιούνται προς ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), τόσο για τη μικρή όσο και για τη μεγάλη υπομονάδα των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων. Συγκεκριμένα, το 16S γονίδιο, η έκφραση του οποίου πραγματοποιείται στη μήτρα το μιτοχονδρίου, κωδικοποιεί τη μεγάλη υπομονάδα.

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 (Kotsakiozi et al, 2012; Abu-Bakar et al, 2014; Kornillios et al, 2015; Chueca et al, 2018; Horsáková et al, 2019). Συνεπώς, επιλύει τις σχέσεις των ειδών πιο κοντά στη βάση του φυλογενετικού δέντρου. Τέλος, επειδή, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι σχέσεις των εξεταζόμενων ειδών παρέμειναν ασαφείς, δημιουργήθηκε η ανάγκη επιπλέον αναζήτησης ενός περισσότερο αργού σημαντή, που θα είναι σε θέση να επιλύει βαθύτερες φυλογενέσεις, όπως είναι τα πυρηνικά γονίδια.

1.6.3.3 Τα πυρηνικά γονίδια ITS1 & ITS2 (nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 & 2)

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν δύο εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS1 & ITS2) που χωρίζουν τα ριβοσωμικά γονίδια 18S, 5.8S και 28S, και μια εξωτερικά μεταγραφόμενη περιοχή που βρίσκεται πριν από το 18S (ETS). Οι περιοχές αυτές περιέχουν σήματα που καθοδηγούν το rRNA μετάγραφο. Τα γειτονικά αντίγραφα των rDNA μονάδων χωρίζονται από ένα μη μεταγραφόμενο διάστημα (NTS). Αυτή η περιοχή περιέχει στοιχεία που δρουν σαν ενισχυτές μεταγραφής (Hillis & Dixon, 1991) (**Εικόνα 1.8**). Οι συγκεκριμένοι γονιδιακοί τόποι συναντώνται στο πυρηνικό ριβοσωμικό DNA (rDNA), με ξεκάθαρη δομική δράση και κωδικοποιούν νουκλεοτιδικές (κι όχι αμινοξικές) αλληλουχίες. Επομένως, μια μετάλλαξη σε ένα τέτοιο γονίδιο ίσως να μην αντανάκλα κάποια φαινοτυπική αλλαγή. Επιπλέον, τα πυρηνικά rDNA διαστήματα εξελίσσονται πιο γρήγορα από τις πυρηνικές rRNA περιοχές, διότι οι υποκαταστάσεις που μπορεί να συμβούν στα διαστήματα (ITS, ETS) δεν έχουν θανατηφόρες συνέπειες στον οργανισμό και για αυτό στις περιοχές αυτές παρατηρείται πιο γρήγορος εξελικτικός ρυθμός. Αντίθετα μεταλλάξεις στα rRNA γονίδια μπορούν να εμποδίσουν το σχηματισμό ριβοσωμάτων, γεγονός που επηρεάζει το μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης (Hwang & Kim, 1999).



Εικόνα 1.8. Οργάνωση μιας rDNA υπομονάδας, οι οποίες αποτελούν λειτουργικές κι οργανωμένες επαναλήψεις (ETS: εξωτερικά μεταγραφόμενη περιοχή, ITS1 & ITS2: εσωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές, IGS: διαγονιδιακές περιοχές που αποτελούνται από ETS και NTS διαστήματα μη μεταγραφόμενες περιοχές)

Ως εκ τούτου, τα ITS1 και ITS2 παρόλο που δεν κωδικοποιούν κάποιο λειτουργικό μόριο για να επιλέγεται η

διατήρηση της αλληλουχίας τους, εμφανίζουν σχετική μεταβλητότητα και εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς. Για αυτό το λόγο, αλλά και λόγω της ευκολίας ενίσχυσής τους, χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες στις φυλογενετικές αναλύσεις (Chueca et al, 2015; Kornillios et al, 2015; Chueca et al, 2018, Horsáková et al, 2019) αλλά και στη διεύρυνση φαινομένων υβριδισμού (Morii et al., 2015). Μάλιστα, το ITS1 αποτελεί καλύτερο μοριακό δείκτη για DNA barcoding από ότι το ITS2 στους ευκαρυώτες (Wang et al., 2015).

1.7 Πληθυσμιακή Γενετική και Δομή Πληθυσμών

Ως πληθυσμός ορίζεται μια ομάδα από άτομα του ίδιου είδους, τα οποία μοιράζονται μια κοινή γεωγραφική περιοχή, μία δεδομένη χρονική στιγμή και είναι ικανά να ανταλλάσσουν ελεύθερα γενετικό υλικό. Οι πληθυσμοί των οργανισμών του πλανήτη εμφανίζουν τεράστια ποικιλία αναφορικά με το μέγεθος, τη δομή και τη δυναμική τους. Η δομή σχετίζεται με τον τρόπο οργάνωσης των πληθυσμών. Από τη μία πλευρά, μπορεί να υπάρχει φανερή διάκριση ενός πληθυσμού από όλους τους άλλους, και του οποίου όλα τα άτομα που τον συνιστούν έχουν την ίδια πιθανότητα να αναπαραχθούν (παμμικτικός πληθυσμός). Από την άλλη πλευρά, ένας πληθυσμός μπορεί να υποδιαιρείται εξαιτίας της περιβαλλοντικής ετερογένειας (φράγματα) ή λόγω ηθολογίας, σε μικρότερους υποπληθυσμούς (δήμους), στους οποίους η πιθανότητα σύζευξης είναι μεγαλύτερη εντός του υποπληθυσμού παρά μεταξύ των υποπληθυσμών (Hartl, 2000). Επιπλέον, η δυναμική πληθυσμού απορρέει από τη δυνατότητα του πληθυσμού να αλλάζει το μέγεθος και το εύρος κατανομής μέσα στο χρόνο.

Η μελέτη και αποκρυπτογράφηση όλων αυτών των παραμέτρων των πληθυσμών, μαζί με τις εξελικτικές δυνάμεις που δρουν σε αυτούς, αποτελούν αντικείμενο της πληθυσμιακής γενετικής. Ουσιαστικά, η πληθυσμιακή γενετική ανιχνεύει τις αλλαγές της γενετικής σύστασης των πληθυσμών, οι οποίες διαφαίνονται στις συχνότητες των γονιδίων και των γονοτύπων που τους αντιπροσωπεύουν. Ταυτόχρονα, εξετάζει τις βασικές διεργασίες που υποκινούν τις εξελικτικές αλλαγές, δηλαδή τις μεταλλάξεις, τη φυσική επιλογή, τη γονιδιακή ροή και την τυχαία γενετική παρέκκλιση (Hartl & Clark, 1997; Griffiths et al., 1999). Προϋπόθεση αποτελεί η ύπαρξη της γενετικής ποικιλότητας για να δράσουν οι τρεις τελευταίες διαδικασίες.

Συγκεκριμένα, οι αρχές της πληθυσμιακής γενετικής προσπαθούν να εξηγήσουν την παρατηρούμενη γενετική διακύμανση μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους, εντός αλλά και μεταξύ των πληθυσμών του (Hartl, 2000). Επιπλέον, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η σύγκριση των γενετικών διαφορών επεκτείνεται και μεταξύ των ειδών του ίδιου γένους (Baltazar-Soares et al., 2017). Ο έλεγχος της γενετικής διαφοροποίησης πραγματοποιείται μετρώντας τις αλληλομορφικές συχνότητες που παρατηρούνται για κάθε μελετώμενο γενετικό τόπο σε κάθε πληθυσμό (Hartl & Clark, 1997; Griffiths et al., 1999) με τη χρήση μοριακών δεικτών, όπως μιτοχονδριακοί γενετικοί τόποι και μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Μια εξαιρετικά κρίσιμη θεώρηση που λαμβάνεται στη πληθυσμιακή γενετική είναι ότι οι γενετικοί τόποι που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της δομής των πληθυσμών είναι ουδέτεροι σε φυσική επιλογή. Ως εκ τούτου, οι διαφορές μεταξύ των πληθυσμών οφείλονται σε μεταλλάξεις και σε τυχαία γενετική παρέκκλιση.

1.7.1 Γενετική Ποικιλότητα

Η γενετική ποικιλότητα αναφέρεται στο συνολικό αριθμό των γενετικών χαρακτηριστικών που συνθέτουν το γενετικό προφίλ ενός είδους και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά γνωρίσματα κάθε πληθυσμού (Gillespie, 2004; Hedrick, 2005). Όλη η γενετική ποικιλότητα (όλα τα αλληλόμορφα για ένα γενετικό τόπο) σε έναν πληθυσμό αποτελεί τη γενετική δεξαμενή (gene pool) του, πάνω στην οποία μπορεί να δράσει η εξέλιξη. Οι γονιδιακές δεξαμενές είναι χρονικά συνεχείς ακόμη κι αν προστίθενται ή αφαιρούνται άτομα λόγω δημογραφικών γεγονότων (Pianka, 2006). Έτσι, μέσα σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον, η γενετική ποικιλότητα κρίνεται αναγκαία ώστε οι πληθυσμοί να αλλάζουν και να προσαρμόζονται, μέσω στοχαστικών διεργασιών, στις νέες συνθήκες. Η γενετική ποικιλότητα που παράγεται μέσα σε έναν πληθυσμό, δεν προκύπτει μόνο από τις μεταλλάξεις και από τον γενετικό ανασυνδυασμό. Υπάρχουν και εξωτερικές πηγές ποικιλότητας, όπως είναι η φυσική επιλογή, η γονιδιακή ροή και η γενετική παρέκκλιση (Gillespie, 2004; Hedrick, 2005).

1.7.1.1 Φυσική επιλογή

Σύμφωνα με το Δαρβίνο, η εξέλιξη προχωρά κατά κύριο λόγο βάσει της δράσης της φυσικής επιλογής. Η φυσική επιλογή δηλώνει το γεγονός ότι αναπαραγόμενες μονάδες (αλληλόμορφα, γενότυποι, πληθυσμοί ή και είδη) που εμφανίζουν γενετικές διαφορές έχουν διαφορετικές πιθανότητες αντιπροσώπευσής τους στις επόμενες γενιές (Wilson & Bossert, 2000). Αν κάποια από αυτά τα χαρακτηριστικά συντελούν περεταίρω στην επιβίωση και την αναπαραγωγή, τότε τα χαρακτηριστικά αυτά θα έχουν αυξημένη αντιπροσώπευση στην επόμενη γενιά. Αν, μάλιστα, η συγκεκριμένη φυσική επιλογή συνεχιστεί για πολλές γενιές, τα χαρακτηριστικά αυτά θα αποτελέσουν ιδιαίτερο γνώρισμα του είδους. Η δράση της φυσικής επιλογής υπολογίζεται με βάση την αρμοστικότητα (fitness), η οποία συνδέεται άρρηκτα με το αναπαραγωγικό πλεονέκτημα ενός γονοτύπου έναντι των άλλων.

1.7.1.2 Γονιδιακή ροή

Η γονιδιακή ροή είναι η μεταφορά αλληλομόρφων σε ενδο- και δια-πληθυσμιακό επίπεδο και πραγματοποιείται μέσω της μετανάστευσης και της μεταφοράς γαμετών (Hedrick, 2005). Η μετανάστευση επηρεάζει τη δεξαμενή γονιδίων κάθε πληθυσμού καθώς κάθε πληθυσμός παρουσιάζει αλληλόμορφα με συγκεκριμένη συχνότητα, η οποία διαφοροποιείται κάπως απ' αυτή των άλλων πληθυσμών. Όπως αναμένεται, όσο αυξάνει η γεωγραφική απόσταση μεταξύ πληθυσμών, τόσο μειώνεται και η γονιδιακή ροή μεταξύ και κατ' επέκταση τόσο περισσότερο διαφοροποιούνται τα αλληλόμορφα τους, άρα και ο συνακόλουθος φαινότυπος. Αντίστοιχα, αν η ροή μεταξύ δυο πληθυσμών είναι μεγάλη, τότε οι πληθυσμοί τείνουν να έχουν παρόμοιες αλληλικές συχνότητες, αποτρέποντας τη σαφή διάκριση αυτών των πληθυσμών.

Συνήθως η μεταφορά των αλληλομόρφων πραγματοποιείται μεταξύ πληθυσμών οι οποίοι ανήκουν στο ίδιο είδος. Σε μερικές περιπτώσεις, όμως, γίνεται υβριδισμός ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, τα οποία δεν είναι πλήρως αναπαραγωγικά απομονωμένα. Η ποικιλότητα που προέρχεται από υβριδισμό συχνά υπερβαίνει την εσωτερική ποικιλότητα καθενός από τα γονικά είδη.

1.7.1.3 Γενετική παρέκκλιση (genetic drift)

Η γενετική παρέκκλιση αποτελεί σημαντική εξελικτική διαδικασία που οδηγεί σε τυχαία αύξηση ή ελάττωση των αλληλομόρφων από γενιά σε γενιά, οδηγώντας στην τυχαία εγκαθίδρυση ή και απώλειά τους. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται πιο εύκολα σε μικρούς πληθυσμούς όπου υπερέχει η ενδογαμία, καθώς τυχαία γεγονότα ικανά να μεταβάλλουν τη συχνότητα των αλληλομόρφων συμβαίνουν διαρκώς και προς πολλές κατευθύνσεις, με αποτέλεσμα να μην γίνονται εύκολα αντιληπτά σε μεγάλους πληθυσμούς. Ωστόσο, αυτό δε σημαίνει ότι περιορίζεται στους μικρούς πληθυσμούς.

1.7.2 Θεωρία της σύμφυσης των γενεαλογικών γραμμών (coalescent theory)

Κεντρικός άξονας στη γενετική πληθυσμών είναι η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ένας πληθυσμός εξελίσσεται υπό ένα δεδομένο σύνολο συνθηκών. Η εξέλιξη υποδεικνύει διεργασίες μελλοντικών διαφοροποιήσεων καθότι ένας πληθυσμός αλλάζει τα χαρακτηριστικά του με την πάροδο του χρόνου. Ως εκ τούτου, στο παρελθόν η γενετική πληθυσμών αφορούσε περισσότερο προσεγγίσεις προσανατολισμένες στο «εν δυνάμει» παρά στο παρελθόν. Συγκεκριμένα, η θεωρία της γενετικής πληθυσμών είχε αρχικά βασιστεί σε εξισώσεις που προέβλεπαν συχνότητες αλληλομόρφων σε μελλοντικές γενιές, προσομοιώνοντας ολόκληρους πληθυσμούς (Ewens 1979).

Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά ενός φυσικού πληθυσμού εξετάζονται συνήθως λαμβάνοντας κάποια δείγματα από αυτόν. Έτσι, γεννώνται ενδιαφέροντα βιολογικά ερωτήματα που είναι ως επί των πλείστων αναδρομικά, με παρελθοντική στόχευση. Τέτοια ερωτήματα αφορούν στην ιστορία του πληθυσμού που προκάλεσε το δείγμα ή στους εξελικτικούς μηχανισμούς που ευθύνονται για τα χαρακτηριστικά που παρατηρούνται. Επομένως, για να προσεγγιστεί το παρελθόν από ένα δείγμα που λαμβάνεται από έναν σημερινό πληθυσμό, δημιουργήθηκε η ανάγκη για μια νέα θεώρηση. Η θεωρία της σύμφυσης των γενεαλογικών γραμμών (coalescent theory) προέκυψε από αυτή την αναγκαιότητα. Συγκεκριμένα, λαμβάνει υπόψη σαν αφετηρία ένα δείγμα από έναν πληθυσμό στο παρόν, και ανατρέχει πίσω στο χρόνο για να εντοπίσει παρελθοντικά γεγονότα φτάνοντας στον πιο κοινό πρόσφατο πρόγονο του δείγματος. μπορεί να εκτιμήσει φυλογεωγραφικές παραμέτρους του παρελθόντος (π.χ. μέγεθος πληθυσμού, χρόνος απόσχισης, ρυθμός μετανάστευσης), χρησιμοποιώντας γενετικά δεδομένα του παρόντος, ώστε οι γενετικές γενεαλογίες να προσομοιώνονται πίσω στο χρόνο υπό οποιοδήποτε δημογραφικό μοντέλο (Wakeley, 2008).

1.8 Υβρίδια -Υβριδισμός -Ζώνες υβριδισμού

Τα υβρίδια είναι οργανισμοί που προέρχονται από τη διασταύρωση ατόμων που ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Παρόλο που τα υβρίδια μεταξύ συγγενικών ειδών είναι συνήθως στείρα ή έχουν δραματικά μειωμένη αρμοστικότητα, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι βιώσιμα και γόνιμα. Τότε η περιοχή που τα πατρικά είδη υβριδίζονται ονομάζεται ζώνη υβριδισμού (hybridization zones) (Harrison & Larson, 2014).

Οι ζώνες υβριδισμού έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην εξέλιξη, διότι πραγματοποιείται ανάμιξη του γενετικού υλικού μεταξύ δύο ειδών και πολλές φορές έχουμε εισροή (introgression) του γενετικού υλικού του ενός είδους στο άλλο, διατηρώντας ωστόσο ένα μέρος της γονιδιακής τους δεξαμενής διακριτό (Anderson, 1949). Η ανάμιξη

του γενετικού υλικού των δύο ειδών στη ζώνη υβριδισμού εξαρτάται από τη γενιά των υβριδίων. Στην F1 γενιά τα υβρίδια είναι ετερόζυγα σε όλους τους γενετικούς τόπους, ενώ από την F2 και ύστερα, η αναλογία του γενετικού υλικού των πατρικών ειδών στα υβρίδια περιπλέκεται περεταίρω (Harrison & Larson, 2014). Η περιγραφή των ζωνών υβριδισμού περιγράφεται με βάση την αρμοστικότητα αλλά και τη γενιά των υβριδίων. Σε μια αδρή κατηγοριοποίηση, βασισμένη στην αρμοστικότητα των υβριδίων, οι ζώνες υβριδισμού μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: 1. Τα υβρίδια είναι εξίσου αρμοσμένα με τα πατρικά είδη. Ως εκ τούτου, η διασπορά των υβριδίων και κατ' επέκταση το εύρος της ζώνης υβριδισμού, εξαρτάται από τον χρόνο που υπάρχει η ζώνη υβριδισμού, καθώς και από τη δυνατότητα διασποράς των υβριδίων στο περιβάλλον τους. 2. Τα υβρίδια έχουν μειωμένη αρμοστικότητα σε σχέση με τα άτομα των πατρικών ειδών. Έτσι, η ζώνη υβριδισμού είναι μικρής χρονικής διάρκειας και χωρικής έκτασης. 3. Τα υβρίδια είναι πιο αρμοσμένα από τα πατρικά είδη, με αποτέλεσμα να συγκροτείται μια σταθερή και μακροχρόνια ζώνη υβριδισμού, η οποία μπορεί και να οδηγήσει σε ειδογένεση. (Heiser, 1973; Harrison & Larson, 2014).

Συνολικά, ο υβριδισμός ως φαινόμενο έρχεται να περιπλέξει ακόμα περισσότερο την ταξινομική αναγνώριση. Ωστόσο, η συνδυασμένη πλέον χρήση φαινοτυπικών, μορφολογικών και «ευρέως φάσματος» μοριακών δεδομένων λόγω της εμφάνισης νέων τεχνικών αλληλούχισης, έχουν αυξήσει δραματικά την ευαισθησία ανίχνευσης εισροών και φαινομένων υβριδισμού. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι με την έλευση νέων τεχνολογιών αλληλούχισης υψηλής απόδοσης και ισχυρότερων επεξεργαστών τις δύο τελευταίες δεκαετίες, ο αριθμός των μελετών που εστιάζουν στον έλεγχο του υβριδισμού μεταξύ ειδών έχει αυξηθεί κατά τάξεις μεγέθους.

1.9 Μελέτη αλληλοεπικάλυψης θώκου

Η έννοια του θώκου διαπερνά όλη την οικολογία και εμφανίζει πληθώρα ορισμών. Από τους πρώτους που χρησιμοποίησαν αυτό τον όρο ήταν ο Grinnell το 1917, ο οποίος θεώρησε το θώκο ως βασική μονάδα συμπεριφοράς και κατανομής. Παράλληλα μια από τις θεωρήσεις που άσκησε ιδιαίτερη επίδραση στην οικολογία είναι αυτή του Hutchinson (1957), η οποία εμπεριέχει το πλήρες εύρος των συνθηκών υπό τις οποίες ένας οργανισμός αναπαράγεται επιτυχώς. Ακολουθώντας μια διευρυμένη ορολογία, ο οικολογικός θώκος (ecological niche) υποδηλώνει το ρόλο μιας οργανισμικής μονάδας στο εκάστοτε οικοσύστημα, περιγράφοντας τόσο το εύρος των συνθηκών που είναι απαραίτητες για την εδραίωση (επιβίωση και αναπαραγωγή) της, όσο και τον οικολογικό της ρόλο στο οικοσύστημα (Polechová & Storch, 2019). Επιπλέον, ο όρος περιλαμβάνει όλες τις φυσικές, χημικές και βιολογικές συνθήκες που χρειάζεται αυτή η οργανισμική μονάδα για να ζήσει και να αναπαραχθεί, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις με το ενδιαίτημά της και τους άλλους οργανισμούς. Ως εκ τούτου, αντιπροσωπεύει μια πολύ βασική και θεμελιώδη οικολογική έννοια και αναδεικνύει τη δυναμική του ενδιαίτηματος ως προς την οργανισμική μονάδα και αντίστροφα. Ο θώκος μπορεί να αναφέρεται σε ένα άτομο, σε έναν πληθυσμό ή σε ένα είδος (Pianka, 2006).

Η ισχύς των δια-ειδικών αλληλεπιδράσεων χαρακτηρίζεται από μια ποσοτική έννοια που είναι γνωστή ως αλληλοεπικάλυψη θώκου (niche overlap) και πραγματοποιείται όταν δύο οργανικές μονάδες χρησιμοποιούν τους

ίδιους πόρους ή άλλες περιβαλλοντικές μεταβλητές (Badali & Zilman, 2020). Η επικάλυψη είναι πλήρης όταν δύο οργανικές μονάδες έχουν πανομοιότυπους θώκους, ενώ η επικάλυψη είναι μηδενική όταν οι θώκοι διαφοροποιούνται πλήρως. Συνήθως, οι θώκοι επικαλύπτονται εν μέρει, με ορισμένους πόρους να μοιράζονται και άλλους να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά από κάθε οργανική μονάδα. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η εκτεταμένη αλληλοεπικάλυψη θώκων μπορεί συχνά να συσχετίζεται με μειωμένο ανταγωνισμό, καθότι οι οργανισμικές μονάδες μπορεί να έχουν διαφοροποιηθεί και να χρησιμοποιούν διαφορετικούς πόρους.

Εκτός του οικολογικού τους θώκου, οι οργανισμικές μονάδες δεν αναμένεται να αφήσουν απογόνους, πόσο μάλλον να εδραιώσουν τους πληθυσμούς τους και να δημιουργήσουν κλάδους (ορισμός που αναφέρεται στον πρόγονο και τους επιζώντες ή/και εκλιπόντες απόγονους του) ικανούς να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν (Wiens & Graham, 2005). Αυτό συμβαίνει διότι η έννοια του θώκου αποτελεί συνάρτηση πολλών λειτουργικών χαρακτήρων (traits), τα οποία είτε αλλάζουν ιδιαίτερα γρήγορα (Schluter, 2000) είτε πολύ αργά (Wiens & Graham, 2005) μέσα στον εξελικτικό χρόνο. Η τάση των ειδών και των κλάδων τους να διατηρούν σταθερούς τους θώκους και τους σχετιζόμενους/συναφείς οικολογικούς χαρακτήρες τους με την πάροδο του χρόνου ονομάζεται συντηρητισμός θώκου (niche conservatism), ορισμός που διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τους Harvey & Pagel (1991). Συγκεκριμένα, ο συντηρητισμός θώκου συνδέεται άρρηκτα με χαρακτήρες που αφορούν αβιοτικές παραμέτρους, την αξιοποίηση πόρων και άλλες πτυχές των δια-ειδικών αλληλεπιδράσεων (Wiens & Graham, 2005). Ως εκ τούτου, ο συντηρητισμός θώκου είναι ικανός να πραγματοποιηθεί σε μία ποικιλία διαφορετικών χωρικών, χρονικών και φυλογενετικών κλιμάκων. Το γεγονός αυτό, τον καθιστά σχετικό με μια πληθώρα διαφορετικών ερευνητικών θεματολογιών με ερωτήματα σχετικά με βιογεωγραφικά πρότυπα (Wiens, 2011), στόχους διατήρησης (Hadly & Spaeth, 2009), και γεγονότων ειδογένεσης (Kozak & Wiens, 2006) κ.ά. και κατ' επέκταση άξιο μελέτης.

1.10 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

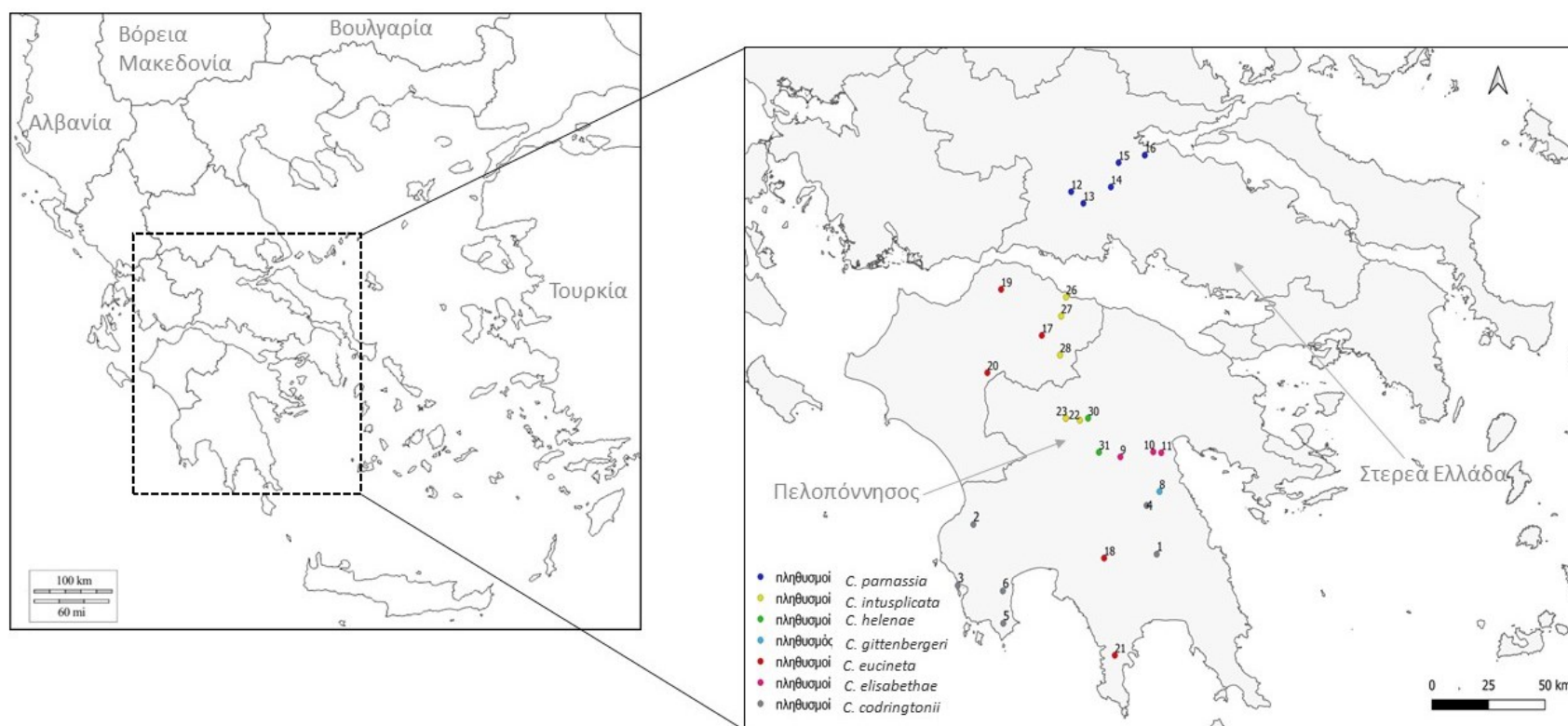
Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε αποσκοπώντας στην περαιτέρω κατανόηση και μελέτη της εξελικτικής ιστορίας και της οικολογίας των ενδημικών ειδών του γένους *Codringtonia*. Επιπλέον, επιχειρήθηκε η επανεξέταση των κατανομών τους. Όλα τα προαναφερθέντα εκτιμήθηκαν μέσω :

- I. Της διερεύνησης της γενετικής ποικιλότητας και δομής των πληθυσμών των ειδών
- II. Της μελέτης της δημογραφικής ιστορίας των πληθυσμών των ειδών
- III. Της εξέτασης του ενδεχομένου υβριδισμού μεταξύ δύο ειδών του γένους μελέτης (*C. elisabethae* & *C. gittenbergeri*)
- IV. Της μοντελοποίησης της αλληλοεπικάλυψης των θώκων των ειδών του γένους και ερμηνεία της παρατηρούμενης δομής τους

Κεφάλαιο 2ο-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Περιοχή δειγματοληψίας

Η περιοχή μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας εντοπίζεται στα γεωγραφικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου και της Στερεάς Ελλάδας (Εικόνα 2.1). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του διδακτορικού της Κοτσακιάζη (τα έτη 2007-2013). Οι σταθμοί δειγματοληψιών καθορίστηκαν με βάση τα όσα αναφέρονται από τον Subai (2005). Εξάιρεση αποτελεί η δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε (11/12/2018) στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η οποία αποσκοπούσε στον εμπλουτισμό των πληθυσμών του είδους *C. elisabethae* (πληθυσμός Νο.10 στον Πίνακα 2.1., Εικόνα 2.1) Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 120 άτομα από 31 πληθυσμούς του γένους *Codringtonia*.



Εικόνα 2.2. Σταθμοί δειγματοληψίας πληθυσμών του ενδημικού γένους *Codringtonia* στις περιφέρειες κατανομής τους στον ελληνικό χώρο (Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησος). Τα διαφορετικά χρώματα των κουκκίδων αντιπροσωπεύουν διαφορετικό είδος. Ως επί των πλείστον, οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά τη διδακτορική διατριβή της Κοτσακιάζη (2013) (Οι χάρτες σχεδιάστηκαν με τη χρήση του Συστήματος Γεωγραφικών Πληροφοριών QGIS 3.8.3).

2.2 Σύνολο δεδομένων

Το σύνολο των δεδομένων της παρούσας εργασίας περιλαμβάνει 120 δείγματα (αναλυτικά στον **Πίνακα Π1 του Παραρτήματος**) του γένους *Codringtonia*, τα οποία αντιπροσωπεύουν όλα τα κατ' όνομα είδη του γένους (Subai, 2005). Ο προσδιορισμός των ειδών προηγήθηκε από την Κοτσακιάζη (2013) και βασίστηκε στα ανατομικά χαρακτηριστικά του γεννητικού τους συστήματος σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά του κελύφους τους, όπως αυτά περιγράφονται από τον Subai (2005). Σε κάποιες περιπτώσεις, ο προσδιορισμός του είδους καθορίστηκε είτε από τη συλλογή τους στο πεδίο (5 δείγματα), είτε έπειτα από τη φυλογενετική ανάλυση (25 δείγματα) που πραγματοποιήθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Στον **Πίνακα 2.1** παρουσιάζεται συνολικά ο αριθμός των δειγμάτων που είτε ενισχύθηκαν επιτυχώς στην παρούσα εργασία, είτε αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank. Σε ότι αφορά τους πληθυσμούς μελέτης, το κάθε είδος *Codringtonia* (από τα εφτά) αντιπροσωπευόταν με 1-7 πληθυσμούς και ο κάθε πληθυσμός με 1-13 άτομα. Αναφορικά στα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις καθώς και πληροφορίες για τους σταθμούς δειγματοληψίας (**Εικόνα 2.1**) αναφέρονται στον **Πίνακα 2.2**. Αναλυτικότερα, 105 από τα 120 δείγματα παρέχουν πληροφορία και για τα τρία μιτοχονδριακά γονίδια μελέτης (COI, COII, 16S) και 91 δείγματα αντίστοιχα για τα δύο πυρηνικά γονίδια μελέτης (ITS1 και ITS2) (**Πίνακας 2.2**). Τα άτομα αυτά χρησιμοποιήθηκαν αντιστοίχως για τις ενοποιημένες αναλύσεις των αντίστοιχων φυλογενετικών δέντρων. Δεδομένα και για τα πέντε γονίδια συγκεντρώθηκαν επιτυχώς σε 81 από τα 120 άτομα (Πίνακας Π1 Παραρτήματος).

Επιπροσθέτως, στις φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξωομάδες (outgroups), δύο επιπλέον άτομα (122 συνολικά δείγματα), τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά γένη αλλά σχετίζονται με την υπό εξέταση ομάδα. Η χρήση της εξωομάδας μπορεί να υποδείξει τη θέση που καταλαμβάνει η ομάδα των οργανισμών μελέτης, καθότι αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για να οριστεί η ρίζα του εκάστοτε δέντρου. Συγκεκριμένα, ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Κοτσακιάζη (2013), ως εξωομάδες λειτούργησαν ένα άτομο του είδους *Levantina spiriplana* Kobelt, 1871 από το νησί Χάλκη και ένα άτομο του είδους *Assyriella naegelei* (Kobelt, 1901) από την Τουρκία (**Πίνακας Π1 Παραρτήματος**). Τα γένη αυτά ανήκουν στην οικογένεια *Helicidae*, όπως και το *Codringtonia*. Η επιλογή προέκυψε από το γεγονός ότι θεωρούνται τα πιο συγγενικά γένη ως προς το *Codringtonia* (Hadjicharalambous, 1996; Subai, 2005; Κοτσακιάζη, 2013).

Πίνακας 2.1. Συγκεντρωτικός αριθμός δειγμάτων που είτε ενισχύθηκαν επιτυχώς στην παρούσα εργασία, είτε αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank.

Ενισχύθηκαν	Υπό Μελέτη Γονίδια				
	ITS1	ITS2	COI	COII	16S
επιτυχώς	106	111	27	30	35
ανεπιτυχώς	16	11	13	10	6
σύνολο	122	122	40	40	41
Αντλήθηκαν από GenBank	–	–	82	82	81

Πίνακας 2.2. Παρουσίαση δειγμάτων του γένους *Codringtonia* που αναλύθηκαν (είδη και πληθυσμοί μελέτης κι αντίστοιχο κωδικό σε χάρτη Εικόνας 2.1, γεωγραφικά στοιχεία των περιοχών δειγματοληψίας, κωδικός ατόμων στα αντίστοιχα ενοποιημένα σετ δεδομένων για μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια) στην παρούσα μελέτη για πέντε γονιδιακούς τόπους

κωδικός χάρτη	Είδος	Περιοχή Δειγματοληψίας	Περιφέρεια	Κωδικός δείγματος	
				Μιτοχονδριακά γονίδια (COI, COII, 16S)	Πυρηνικά γονίδια (ITS1, ITS2)
1	<i>C. codringtonii</i>	Καλιθέα	A	Cc_KalR2_2, Cg_KalR1_1, Cg_KalR2_2	-
2		Ροδιά	A	CcRod1, CcRod2, CcRod3, CcRod4	CcRod1, CcRod2, CcRod3, CcRod4
3		Ναβαρίνο	A	CcNav1, CcNav2	CcNav2
4		Άγιος Πέτρος προς Μονή Μαλεβής	A	Cg_Mal1	-
5		Μονή Χρυσοκελαρίας	A	CcHr1	-
6		Μαθιάς	A	CcMath1	CcMath1
7		Άγιος Πέτρος	A	Cc_Mal_1	-
8	<i>C. gittenbergeri</i>	Άγιος Ιωάννης προς Μελιγού 1,5km πριν (13)	A	Cg_MelR1_1, Cg_MelR2_1, Cg_MelR3_1, Cg_MelR4_1, Cg_MelR4_2, Cg_MelR5_1, Cg_MelR5_2, Cg_MelR6_1, Cg_MelR6_2, Cg_MelR7_1, Cg_MelR7_2, Cg_MelR7_3, Cg_MelR7_4	Cg_MelR1_1, Cg_MelR4_2, Cg_MelR5_2, Cg_MelR7_1, Cg_MelR7_2, Cg_MelR7_3, Cg_MelR7_4
9	<i>C. elisabethae</i>	Στενό προς Τρίπολη 500m (5)	A	CeST6_1, CeST6_2, CeST6_3, CeST6_4, CeST6_5	CeST6_2, CeST6_3, CeST6_4
10		ΕΟ Άργους Τριπόλεως μετά τον Αχλαδόκαμπο, 12,7km προς Στενό	A	Ce_Ach_St_1, Ce_Ach_St_2, Ce_Ach_St_3, Ce_Ach_St_4, Ce_Ach_St_5	Ce_Ach_St_1, Ce_Ach_St_2, Ce_Ach_St_3, Ce_Ach_St_4, Ce_Ach_St_5
11		Αχλαδόκαμπος προς Άργος 5km	A	CeAA7_1	CeAA7_1
12	<i>C. parnassia</i>	Γκιώνα-Παλαιοβούνη	B	CpGio_1, CpGio_2, CpGio_3	CpGio_1, CpGio_2, CpGio_3
13		Γκιώνα Ευρυτανίας	B	-	CparPal2
14		Γραβιά προς Άμφισσα 27,5 km	B	CpGravR1, CpGravR2, CpGravR3, CpGravR4, CpGravR5_1, CpGravR5_2, CpGravR6_1, CpGravR6_2, CpGravR7,	CpGravR1, CpGravR2, CpGravR4, CpGravR5_1, CpGravR5_2, CpGravR6_1, CpGravR7
15		Σκαμνός, 1,2 km ανατολικά από Μπράλο προς Θερμοπύλες	B	CpSka_1	CpSka_1, CpSka_2

16		Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km	B	CpThe_1	CpThe_1, CpThe_2
17	<i>C. eucineta</i>	Καλάβρυτα προς Λαγκοβούνι 6 km	A	Ceu_LAG_2	Ceu_LAG_2
18		Μυστράς	A	CeuMist1, CeuMist2	
19		Παναχαϊκό, 1800m υψόμετρο	A	Ceu_PAN_1, Ceu_PAN_2, Ceu_PAN_3, Ceu_PAN_4	Ce_PAN1, Ce_PAN2, Ce_PAN3
20		Όρος Λάμπεια	A	-	CLAMB1
21		Πύρριχος Μάνης	A	-	CPIR1, CPIR2
22	<i>C. intusplicata</i>	Κορυφή όρους Μαινάλου	A	Ci_MEN_1, Ci_MEN_2, Ci_MEN_12	Ci_MEN_1, Ci_MEN_12
23		Μαίναλο 1053m	A	C_MEN_15R1, C_MEN_16R2, C_MEN_17R3, C_MEN_18R4_1, C_MEN_19R4_2	C_MEN_15R1, C_MEN_16R2, C_MEN_17R3, C_MEN_18R4_1
24		Μαίναλο 1455m	A	C_MEN_20R1, C_MEN_21R2_1, C_MEN_22R2_2, C_MEN_23R3_1, C_MEN_24R3_2	C_MEN_20R1, C_MEN_21R2_1, C_MEN_22R2_2, C_MEN_23R3_1, C_MEN_24R3_2
25		Μαίναλο 1633m	A	Ci_MEN_26R1_2, Ci_MEN_27R1_3, Ci_MEN_28R1_4, Ci_MEN_29R2_1, Ci_MEN_30R2_2, Ci_MEN_31R3,	Ci_MEN_26R1_2, Ci_MEN_27R1_3, Ci_MEN_28R1_4, Ci_MEN_29R2_1, Ci_MEN_30R2_2, Ci_MEN_31R3,
26		Διακοπτό	A	Ci_DIA_1, Ci_DIA_2	Ci_DIA_1, Ci_DIA_2
27		Διακοπτό προς Καλάβρυτα	A	Ci_MSP_1, Ci_MSP_2, Ci_MSP_3	Ci_MSP_1, Ci_MSP_2, Ci_MSP_3
28		Πλανητέρο, Χελμός	A	CiPLAN1, CiPLAN2, CiPLAN3	CiPLAN1, CiPLAN2, CiPLAN3
29	<i>C. helenae</i>	Κορυφή όρους Μαινάλου	A	Ch_MEN_3, Ch_MEN_4, Ch_MEN_5, Ch_MEN_6, Ch_MEN_7, Ch_MEN_8, Ch_MEN_9, Ch_MEN_10, Ch_MEN_11, Ch_MEN_14	Ch_MEN_3, Ch_MEN_4, Ch_MEN_7, Ch_MEN_8, Ch_MEN_9, Ch_MEN_10, Ch_MEN_11, Ch_MEN_13, Ch_MEN_14
30		Τρίπολη προς Λεβίδι 2km	A	Ch_LEV_1, Ch_LEV_2, Ch_LEV_3, Ch_LEV_4, Ch_LEV_5	Ch_LEV_1, Ch_LEV_2, Ch_LEV_3, Ch_LEV_4, Ch_LEV_5
31		Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km	A	ChTM4_1, ChTM4_2, ChTM4_3, ChTM5_1	ChTM4_1, ChTM4_2, ChTM4_3, ChTM5_1

-: καθόλου δείγματα ανά πληθυσμό, A: Πελοπόννησος, B: Στερεά Ελλάδα

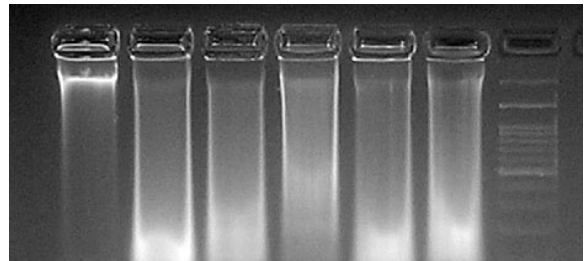
2.3 Μοριακές Αναλύσεις

2.3.1 Εξαγωγή Ολικού Γενομικού DNA – Μέθοδος CTAB 2X

Η εξαγωγή του συνολικού γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε από το μυϊκό ιστό του πόδα (τμήμα ~ 0,5 mm³) ατόμων διατηρημένα σε 100% αιθανόλη. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται ευρέως σε μοριακές μελέτες για την απομόνωση γενετικού υλικού από χερσαία μαλάκια, είναι αυτό των Winperreninckx et al. (1993) με CTAB 2x (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide), καθώς προλαμβάνονται τα προβλήματα που προκαλούν στην PCR οι πολυσακαχαρίτες που εντοπίζονται στη βλέννα τους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη εκδοχή του πρωτοκόλλου αυτού (βλ. Παράρτημα, ΠΡΟΤΟΚΟΛΛΟ 1), όπως περιγράφεται από τους Parmakelis et al. (2003).

Συγκεκριμένα, ο μυϊκός ιστός κάθε ατόμου, αφού τοποθετήθηκε σε νέα erpendorf, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για ένα βράδυ προς εξάτμιση της αιθανόλης. Την επομένη, αφού η αιθανόλη είχε πλήρως εξατμιστεί, κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 700 μl CTAB 2X extraction buffer, με προσθήκη 10 μl Proteinase K (20mg/ml), υπό ανάδευση (600 rpm) στους 60°C, μέχρι να διαλυθεί ολοκληρωτικά ο ιστός (4-5 ώρες). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των πρωτεϊνών με 700 μl χλωροφόρμιο και φυγοκέντρηση. Ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με χρήση παγωμένης (αποθηκευμένη στους -20°C) ισοπροπανόλης (1000 μL), τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20°C για 1 ώρα, φυγοκέντρηση και κατόπιν χρήση παγωμένης (αποθηκευμένη στους -20°C) 70% αιθανόλης (500 μl) και φυγοκέντρηση. Τέλος, αφού αφαιρέθηκε πλήρως η αιθανόλη, η πελέτα του DNA επαναδιαλύθηκε σε 50 μl διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Κάθε δείγμα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της εξαγωγής DNA, ηλεκτροφορήθηκαν 3 μl από κάθε δείγμα ολικού DNA, σε πήκτωμα αγαρόζης (2%), παρουσία 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide, 10 mg/ml). Έπειτα πραγματοποιήθηκε η οπτικοποίηση και η ψηφιακή φωτογράφιση τους σε θάλαμο ακτινών UV (υπεριώδους ακτινοβολίας) (Εικόνα 2.2.).

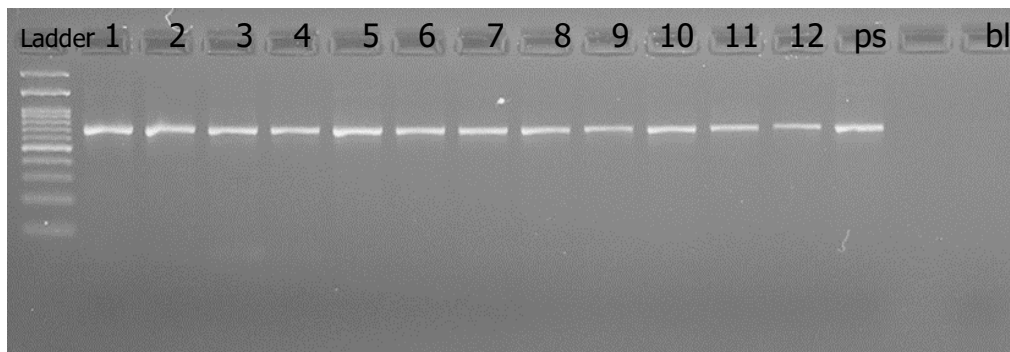


Εικόνα 2.2. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης ολικού γενωμικού DNA έξι ατόμων *C. elisabethae* σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (παρουσία EtBr, φωτογραφία προσωπικού αρχείου).

2.3.2 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Χρησιμοποιώντας γενετικό υλικό που είχε ήδη εξαχθεί από προηγούμενη μελέτη, αλλά και από την παρούσα μελέτη σαν αλληλουχία-μήτρα, ειδική θερμοσταθερή DNA πολυμεράση (Taq), ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (εκκινητές), διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), MgCl₂ ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και διπλά αποστειρωμένο νερό (ddH₂O), πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό γενετικών ή γονιδιακών τόπων από το ολικό γενομικό υλικό των ατόμων των παραπάνω πληθυσμών.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διαδοχή θερμοκρασιακών κύκλων οι οποίοι επιτρέπουν την αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου μορίου DNA μέσω θραύσης των δεσμών υδρογόνου που συνδέουν τις αζωτούχες βάσεις των νουκλεοτιδίων, τον υβριδισμό του αποδιατεταγμένου πλέον DNA με ειδικά σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (annealing) που έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε συντηρημένες θέσεις στην αρχή και στο τέλος της περιοχής προς στόχευση για πολλαπλασιασμό, και στην επιμήκυνση (extension) αυτών μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων (dNTPs) στο ελεύθερο 3' άκρο για τη δημιουργία δίκλωνου μορίου, αντίδραση που καταλύεται από μία πολυμεράση. Το τέλος της επιμήκυνσης σηματοδοτεί και την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου της PCR, όπου από την αρχική δίκλωνη αλυσίδα δημιουργούνται δύο de novo θυγατρικές δίκλωνες αλυσίδες. Οι κύκλοι αυτοί επαναλαμβάνονται για αριθμό εξαρτώμενο από το πρωτόκολλο. Τέλος, για να καλυφθούν τυχόν εναπομείναντες μονόκλωνες περιοχές, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται στους 72°C για 5-10 λεπτά, για να προσθέσει νουκλεοτίδια η Taq πολυμεράση. Παρακάτω, παρατίθενται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2.3.) ενώ αναλυτικά τα πρωτόκολλα ανά γονίδιο παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα (βλ. Παράρτημα, 3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ PCR). Ένα πρότυπο αποτέλεσμα της PCR παρατίθεται παρακάτω στην **Εικόνα 2.3.**



Εικόνα 2.3. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντος του ITS1 γονιδίου 12 ατόμων *C. elisabethae* σε πήκτωμα αγαρόζης 2% παρουσία EtBr. Το ps αναφέρεται στο θετικό μάρτυρα, κι αποτελεί δείγμα με ικανοποιητική ποσοτική θετική αντίδραση σε προηγούμενη PCR με τους αντίστοιχους εκκινητές για διαβεβαίωση ορθής ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Το bl αναφέρεται στο δείγμα ελέγχου των αντιδραστηρίων και η απουσία ζώνης προϊόντος πιστοποιεί την απουσία επιμόλυνσης καθότι δεν περιέχει DNA. Ο Ladder αποτελεί έναν μοριακό χάρακα με ζώνες γνωστού μήκους και παρέχει πληροφορίες για το μήκος των ζωνών για διαβεβαίωση της ενίσχυσης του επιθυμητού γονιδίου. Η διαφορετική ένταση του φθορισμού υποδηλώνει διαφορετική ποσοτική γονιδιακή ενίσχυση που παράγεται από τα μόρια του EtBr υπό το υπεριώδες φως. (φωτογραφία προσωπικού αρχείου).

2.3.3. Επιλογή και συγκεντρωτική παρουσίαση μοριακών δεικτών

Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι τρία μιτοχονδριακά γονίδια, το *16S rDNA*, η υπομονάδα I (*COI*) και η υπομονάδα II (*COII*) της κυτοχρωμικής οξειδάσης και δύο πυρηνικά γονίδια (ITS1 και ITS2) (Πίνακας 2.3.). Τα μιτοχονδριακά γονίδια επιλέχθηκαν σε συνέχεια της διδακτορικής διατριβής της κα Κοτσακιάζης (2013) καθότι χρησιμοποιούνται ευρέως στις μελέτες διερεύνησης φυλογενετικών σχέσεων (Avise, 1994, 2000; Galtier et al., 2009). Επιπλέον, κάποια επιπρόσθετα χαρακτηριστικά του μιτοχονδρίου, όπως είναι ο καλός χαρακτηρισμός του, η απλοειδία, η απουσία ανασυνδυασμού (Hagelberg 1994) και μεταθετών στοιχείων, ψευδογονιδίων,

ιντρονίων και επαναλαμβανόμενου DNA (Avise et al., 1987; Gissi et al., 2008), ο μητρικός τρόπος κληρονομιάς του (Birky, 2001), το καθιστούν χρήσιμο για τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας σε δια-ειδικό και ενδο-ειδικό επίπεδο. Τα πυρηνικά γονίδια, συμπληρώθηκαν στοχεύοντας στη μελέτη βαθύτερης φυλογένεσης του γένους αλλά και στη διερεύνηση του ενδεχόμενου υβριδισμού δυο αδελφών ειδών (*C.gittenbergeri*, *C. elisabethae*) (Morii et al., 2015, Κοτσακιάζη, 2013).

Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του γονιδίου *COI* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές L1490-Alb και H2198-Alb (Gittenberger, Piel & Groenenberg, 2004), για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του γονιδίου *COII* χρησιμοποιήθηκαν καθολικοί εκκινητές (Hugall et al., 2002), ενώ για τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου *16S rDNA* χρησιμοποιήθηκαν οι καθολικοί εκκινητές LR N13398 και 16SBR LR J12887 (Simon et al., 1994). Για τα πυρηνικά γονίδια χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1_sn_R και ITS1_sn_F (Hillis & Dixon, 1991) ενώ για το ITS2 οι LSU1 και LSU2 (Wade & Mordan, 2000). Στον **Πίνακα 2.3** συγκεντρώνονται οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

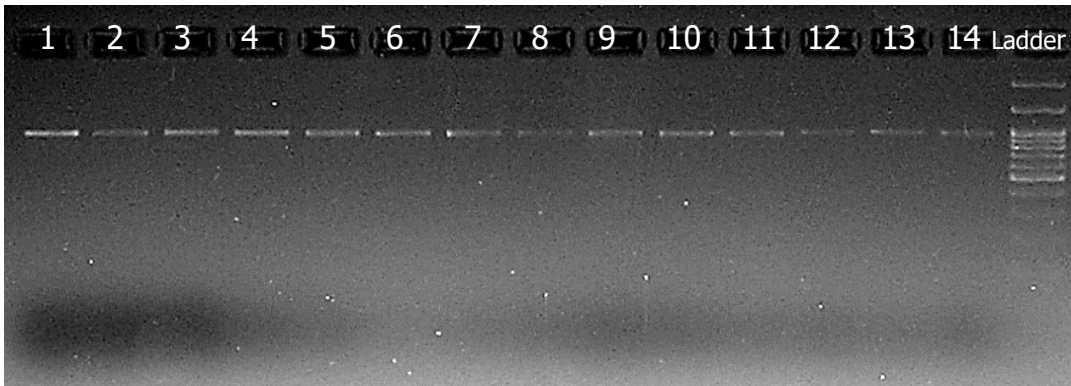
Πίνακας 2.3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων των γονιδίων *COI*, *COII*, *16S rDNA*, *ITS1* και *ITS2* στην παρούσα έρευνα, το μήκος του στοχευόμενου προϊόντος σε ζεύγη βάσεων (ζ.β.) και η πηγή προέλευσής τους

Γονίδιο	Όνομα εκκινητών	Αλληλουχία εκκινητών	Μήκος προϊόντος	Αναφορά
<i>COI</i>	L1490-Alb	5-ACTCAACGAATCATAAAGATATTGG-3	665 ζ.β.	Gittenberger, Piel & Groenenberg, 2004
	H2198-Alb	5-TATACTTCAGGATGACCAAAAAATCA-3		
<i>COII</i>	Snail_ <i>COII</i> _R	5-AAATAATGCTATTTTCATGAYCAYGC-3	509 ζ.β.	Hugall et al., 2002
	Snail_ <i>COII</i> _F	5-GCTCCGCAAATCTCTGARCAAYTG-3		
<i>16S rDNA</i>	16SAR LR N12887	5-CCGGTTTGAAGTCAGATCACGT-3	416 ζ.β.	Simon et al., 1994
	16SBR LR J13398	5-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3		
ITS1	ITS1_sn_R	5-TGCGTTCAAGATATCGATGTTCAA-3	596 ζ.β.	Hillis & Dixon, 1991
	ITS1_sn_F	5-TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT-3		
ITS2	LSU1	5 -CTAGCTGCGAGAATTAATGTGA-3	808 ζ.β.	Wade & Mordan, 2000
	LSU2	5-ACTTTCCCTCACGGTACTTG-3		

2.3.4. Καθαρισμός του προϊόντος της PCR

Η περαιτέρω χρησιμοποίηση του προϊόντος της PCR, με σκοπό τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, απαιτεί την απομάκρυνση υπολειμμάτων των εκκινητών, των νουκλεοτιδίων και της πολυμεράσης. Ο εν λόγω καθαρισμός πραγματοποιήθηκε είτε με πρωτόκολλο Οξικού Αμμωνίου (NH₄Ac) (βλ. Παράρτημα, ΠΡΟΤΟΚΟΛΛΟ 2), είτε με σειρά αντιδραστηρίων (NucleoSpin – Gel and PCR Clean-up) της εταιρείας

MACHEREY – NAGEL. Στη δεύτερη περίπτωση, η μέθοδος βασίζεται στη δέσμευση και αποδέσμευση του DNA σε μεμβράνη πυριτίου. Ένα πρότυπο αποτέλεσμα καθαρισμού PCR παρατίθεται παρακάτω στην **Εικόνα**



Εικόνα 2.4. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης καθαρισμού PCR προϊόντος του ITS2 γονιδίου 14 ατόμων *C. elisabethae* με πρωτόκολλο Οξικού Αμμωνίου σε πήκτωμα αγαρόζης 2% παρουσία EtBr (φωτογραφία προσωπικού αρχείου).

2.3.5 .Προσδιορισμός Αλληλουχιών

Τα καθαρισμένα προϊόντα στάλθηκαν σε plates προς αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger, μαζί με τους δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην εκάστοτε αντίδραση PCR. Ως εκ τούτου, προσδιορίστηκε η αλληλουχία και των δύο κλώνων του προϊόντος της PCR. Οι αλληλουχίες των δειγμάτων δόθηκαν σε μορφή ηλεκτρονικού αρχείου, ως αρχείο κειμένου (.fasta) και ως χρωματογράφημα.

2.3.6 Προσδιορισμός, Διόρθωση και Στοίχιση της Αλληλουχίας των προϊόντων της PCR

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε από την εταιρία αλληλούχισης CeMIA (Λάρισα) σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης (ABI3730XL DNA Analyzer της Applied Biosystems), χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο BigDye terminator (v.3.1.). Η συσκευή αυτή αναγνωρίζει τα σημασμένα νουκλεοτίδια της συντιθέμενης αλληλουχίας κατά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης προσδιορίστηκε η αλληλουχία και των δύο κλώνων του προϊόντος της PCR (forward και reverse) για κάθε δείγμα.

Αφού έγινε ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR, ακολούθησε έλεγχος και διόρθωση των αλληλουχιών. Για το σκοπό αυτό, σχηματίστηκε ένα κοινό contig των αλληλουχιών των δύο κλώνων κάθε δείγματος και στη συνέχεια αυτό διορθώθηκε με βάση το χρωματογράφημα. Σε ότι αφορά το χειρισμό γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, μετά τη διόρθωση, αφού μεταφράστηκαν σε αμινοξέα, πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος, πρώτον, για την εύρεση του σωστού πλαισίου ανάγνωσης της αλληλουχίας και, δεύτερον, για την ομολογία της πρωτεΐνης με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση γενετικών δεδομένων. Για τις προαναφερθείσες διαδικασίες, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CodonCode Aligner v.2.0.6., και το διαδικτυακό εργαλείο BLAST, της βάσης γενετικών δεδομένων του NCBI (ΥΠΕΡΣΥΝΔΕΣΜΟΣ:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) - μέσω του οποίου, ελέγχθηκε επίσης η αυθεντικότητα των αποκτηθέντων αλληλουχιών καθώς και η ομολογία τους με τα γονίδια στόχους. Μετά την ολοκλήρωση της διόρθωσης ακολούθησε η στοίχιση των αλληλουχιών με σκοπό την εύρεση των ομόλογων θέσεων των αλληλουχιών. Βάσει των διαφορών σε αυτές τις θέσεις, υπολογίζονται και οι εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη αλληλουχιών. Συνεπώς, η διαδικασία της στοίχισης κρίνεται εξαιρετικής σημασίας για την εύρεση των πραγματικών φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση ταξινομικών μονάδων (Collins *et al.* 1994).

2.3.6.1 Επεξεργασία πυρηνικών αλληλουχιών (ITS1 & ITS2) με ετερόζυγες θέσεις

Επειδή ορισμένες αλληλουχίες των πυρηνικών γονιδίων περιείχαν ετερόζυγες θέσεις στα χρωματογραφήματα (διπλές κορυφές), χρησιμοποιήθηκε μια μπεϋζιανή στατιστική μέθοδος ανακατασκευής απλοτύπων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή λειτουργεί εκτιμώντας την πιθανότητα του κάθε αλληλομόρφου, βασιζόμενο στα αλληλόμορφα που έχουν προέλθει από ομόζυγα άτομα από το ήδη υπάρχον σετ δεδομένων. Για αυτή τη διαδικασία, χωρίστηκαν τα άτομα ανά γονίδιο και ανά είδος κι ύστερα χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος PHASE (έκδοση 2.1.1) με προεπιλεγμένες ρυθμίσεις (Smith & Donnelly, 2001), όπως προτείνεται από το εγχειρίδιο του λογισμικού DnaSP (έκδοση 6.12.01; Rozas *et al.* 2017). Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στο PHASE ήταν 1000 επαναλήψεις (iterations), 1 ως διάστημα αραιώσης (thinning interval), 100 επαναλήψεις burn-in και 0.5 κατώφλι ύστερης πιθανότητας (posterior probability threshold) για τον προσδιορισμό των πιο πιθανών απλοτύπων για κάθε πυρηνική αλληλουχία. Τέλος, ύστερα από αυτή την επεξεργασία, για τις αναλύσεις τα δεδομένα μεταχειρίστηκαν κι αυτά ως απλοτυπικά

2.4 Μέθοδοι Φυλογενετικών Αναλύσεων και Επεξεργασίας Δεδομένων

2.4.1 Υπολογισμός γενετικών αποστάσεων

Γενετική απόσταση αποτελεί μέτρο της γενετικής παραλλακτικότητας δύο ή περισσότερων αλληλουχιών με κοινή καταγωγή και ανεξάρτητη εξέλιξη. Ουσιαστικά πραγματοποιείται καταμέτρηση των θέσεων στις οποίες διαφέρουν. Το ποσοστό διαφορετικών ομόλογων θέσεων ονομάζεται p (proportion) απόσταση (p -distance) και εκφράζεται ως ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση. Στην παρούσα μελέτη, ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με την εφαρμογή του K80 διπαραμετρικού μοντέλου του Kimura (1980), το οποίο λαμβάνει υπόψη τις συχνότητες των μεταπτώσεων και των μεταστροφών και υποθέτει πως όλες οι βάσεις εμφανίζονται με ίση συχνότητα. Έπειτα, υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις τόσο μεταξύ των ειδών (δια-ειδικά) όσο και εντός του κάθε είδους (ενδο-ειδικά), με τη χρήση του προγράμματος MEGA X (έκδοση 10.00.00, Stecher *et al.*, 2020). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο στο ενιαίο σύνολο δεδομένων (και στα πέντε γονίδια συνολικά) όσο και για το κάθε γονίδιο χωριστά. Το συγκεκριμένο μοντέλο υποκατάστασης επιλέχθηκε έτσι ώστε τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης να είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής της Κοτσακιάζης (2013).

2.4.2. Δημιουργία σετ δεδομένων και Επιλογή μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

Για τις ανάγκες των αναλύσεων δημιουργήθηκαν τρία ενοποιημένα σετ δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος SequenceMatrix (Vaidya et al., 2011), ένα για τους τρεις μιτοχονδριακούς τόπους (COI, COII, 16S), το οποίο περιλάμβανε 105 δείγματα, ένα που περιλάμβανε τα δύο πυρηνικά γονίδια (ITS1, ITS2) με 91 δείγματα, και ένα με ενοποιημένους μιτοχονδριακούς και πυρηνικούς τόπους των 81 ατόμων, από όλα τα είδη του γένους αντίστοιχα. Ως εξωομάδες χρησιμοποιήθηκαν τα είδη *Levantina spiriplana* και *Assyriella naegelei* και στις τρεις περιπτώσεις.

Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε κατάτμηση (partition) στο κάθε σύνολο δεδομένων, δηλαδή ορίστηκε εκ των προτέρων στο πρόγραμμα η θέση αρχής και τέλους του κάθε γονιδίου, καθώς και το αν επρόκειτο για γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη ή όχι (όπως τα COI, COII), όπου ορίστηκαν ακόμα μικρότερα υποσύνολα αλληλουχιών που αντιστοιχούσαν στις διαφορετικές θέσεις των κωδικονίων -μιας κι έχει φανεί ότι οι διαφορετικές θέσεις επιδέχονται διαφορετικές εξελικτικές πιέσεις και εξελίσσονται με διαφορετικό τρόπο (Bofkin and Goldman, 2007). Για την ανάλυση αυτών των υποσυνόλων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PartitionFinder (έκδοση v2.1.1., Lanfear et al., 2016) και επαναλήφθηκε για το κάθε σετ ενοποιημένων δεδομένων, αλλά και για κάθε ανάλυση, καθότι το πρόγραμμα ψάχνει σε διαφορετικό υποσύνολο μοντέλων φυλογενετικής ανάλυσης που είναι ενσωματωμένα στο εκάστοτε πρόγραμμα (στην προκειμένη MrBayes, raxmlGUI). Επίσης, θεωρήθηκε ότι τα υποσύνολα δεδομένων που φτιάχτηκαν έχουν συνδεδεμένα μήκη κλάδων (branch lengths=linked), η εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού των υποσυνόλων των αλληλουχιών έγινε με τον «greedy» αλγόριθμο και η επιλογή του μοντέλου βασίστηκε στο Bayesian Information Criterion (BIC) (Bayesian Inference Criterion; Schwarz, 1978). Τέλος, οι πολυμορφικές και οι συντηρημένες θέσεις στα διαφορετικά σετ δεδομένων υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος MEGA X (έκδοση 10.00.00, Stecher et al., 2020).

2.4.3 Μέθοδοι Ανασύστασης Φυλογενετικών Δέντρων

Σύμφωνα με τους Swofford et al. (1996), ο προσδιορισμός των φυλογενετικών σχέσεων είναι μία εκτιμητική διαδικασία. Πρακτικά, διατυπώνεται μια υπόθεση για μια εξελικτική διεργασία του παρελθόντος χρησιμοποιώντας ένα πολύ μικρό ποσοστό πληροφορίας, αυτό που εμπεριέχεται στο σύνολο των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν. Με βάση αυτά τα στοιχεία μπορούν να προκύψουν πολλά φυλογενετικά δέντρα. Γι' αυτό πρέπει να υπάρχει ένας τρόπος (κριτήρια) για την επιλογή ενός ή περισσότερων από αυτά που είναι ικανά να ερμηνεύσουν τις σχέσεις των υπό μελέτη αλληλουχιών. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα τρία σετ δεδομένων υποβλήθηκαν σε συνδυασμένη φυλογενετική ανάλυση για όλα τα γονίδια, ενοποιώντας τις αλληλουχίες από τους διαφορετικούς τόπους και λαμβάνοντας υπόψη ότι κάνοντας κάτι τέτοιο υπονοεί ότι όλοι οι τόποι έχουν την ίδια ιστορία, πράγμα το οποίο μπορεί να μην αντικατοπτρίζει την πραγματικότητα (Edwards, 2009). Ωστόσο, αυτό δε σημαίνει απαραίτητα ότι αυτή η προσέγγιση θα φέρει λάθος αποτελέσματα (Tonini et al., 2015), απλώς είναι κάτι που θα πρέπει να συνυπολογιστεί όταν κανείς εξετάζει τα αποτελέσματα. Το εγχείρημα της ανασύστασης των φυλογενέσεων της συγκεκριμένης εργασίας έγινε με τη χρήση δυο διαφορετικών μεθόδων: Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (Bayesian

Inference - BI) (Huelsenbeck & Ronquist 2001) και Μέγιστη Πιθανοφάνεια (Maximum Likelihood - ML) (Felsenstein 1981).

2.4.3.1 Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference, BI)

Η Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία είναι μια στατιστική διεργασία στην οποία παρατηρήσεις ή ενδείξεις λαμβάνονται υπόψη για την αναθεώρηση ή εξαγωγή νέου συμπεράσματος σχετικά με το τι είναι γνωστό υπό την προϋπόθεση ορισμένων υποθέσεων ή παραμέτρων. Στη Φυλογένεση, η μέθοδος BI προϋποθέτει ένα μοντέλο εξέλιξης και αναζητεί τα βέλτιστα δέντρα, τα οποία συμφωνούν τόσο με το μοντέλο όσο και με τα δεδομένα, και δεν επιδέχονται πλέον περαιτέρω βελτίωσης. Περιλαμβάνει τη συλλογή αποδείξεων, οι οποίες είναι είτε σύμφωνες είτε ασύμφωνες με μια δεδομένη υπόθεση. Καθώς συγκεντρώνονται οι αποδείξεις, ο βαθμός κατά τον οποίο πιστεύουμε στην αρχική υπόθεση αλλάζει. Με αρκετές αποδείξεις, ο βαθμός θα πρέπει είτε να μειωθεί αρκετά είτε να αυξηθεί. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό συγκρουόμενων υποθέσεων (υποθέσεις με ισχυρή στήριξη πρέπει να θεωρούνται σωστές και εκείνες με πολύ μικρή στήριξη πρέπει να απορρίπτονται). Η μέθοδος χρησιμοποιεί μια σημαντική αρχή, η οποία ονομάζεται εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability) και στηρίζεται στο θεώρημα του Bayes: $P(H/E) = [P(E/H) \times P(H)] / P(E)$, όπου H είναι η υπόθεση, $P(H)$ η πιθανότητα η υπόθεση να είναι σωστή πριν από τη συλλογή αποδείξεων (prior probability), $P(E/H)$ η πιθανοφάνεια των δεδομένων, $P(E)$ η οριακή πιθανότητα των αποδείξεων και $P(H/E)$ η εκ των υστέρων πιθανότητα της αρχικής υπόθεσης υπό το πρίσμα των παρατηρηθέντων δεδομένων. Το θεώρημα αποτελεί μια επανασταθμισμένη πιθανότητα, η οποία προκύπτει λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα. Η BI χρησιμοποιεί τη μέθοδο MCMC (Markov Chain Monte Carlo), η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως μια ομάδα ανεξάρτητων αναζητήσεων που περιστασιακά ανταλλάσσουν πληροφορίες. Ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος αλγόριθμος στην MCMC είναι ο Metropolis (Metropolis et al. 1953) και πιο συγκεκριμένα μία τροποποιημένη μορφή του που ονομάζεται Metropolis-Hastings (Hastings 1970). Σύμφωνα με τον αλγόριθμο αυτό, ο χώρος κατανομής όλων των πιθανών δέντρων μπορεί να απεικονιστεί ως ένα τοπίο με λόφους (hilly landscape). Στο τοπίο αυτό, τα κοντινά σημεία αντιπροσωπεύουν δέντρα με παρόμοια τοπολογία, ενώ το ύψος αντιπροσωπεύει την πιθανότητα του δέντρου στο συγκεκριμένο σημείο. Το ύψος και η θέση των λόφων στο τοπίο εξαρτάται από τα δεδομένα. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει στην αναζήτηση να διασχίσει μια κοιλάδα, χωρίς να παγιδευτεί σε ένα μη βέλτιστο λόφο. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια ομάδα δέντρων η οποία έχει αξιολογηθεί επανειλημμένα και συγκροτεί την κορυφή του λόφου (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

Η ανάλυση της Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος MrBayes (έκδοση 3.2.7., Ronquist et al., 2012). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ανεξάρτητες εκτελέσεις, κάθε μία εκ των οποίων περιελάμβανε τέσσερις αλυσίδες (chains). Σε κάθε ανάλυση, ο αριθμός των επαναλήψεων (γενεών) ορίστηκε σε 10^7 , ενώ κάθε 100 γενεές αποθηκευόταν το τρέχον δέντρο. Ως μέση τυπική απόκλιση του διαχωρισμού των συχνοτήτων (average standard deviation of split frequencies) των αναλύσεων, ορίστηκε η τιμή 0,01, το όριο της οποίας θεωρήθηκε ως το σημείο σταθεροποίησης της τιμής πιθανοφάνειας ($-\ln L$). Ως εκ τούτου,

το αρχικό 25% των συνολικά παραγόμενων δέντρων απορρίφθηκε (burn-in) για βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Από τα εναπομείναντα δέντρα, κατασκευάστηκε το συναινετικό δέντρο με βάση την εκ των υστέρων κατανομή των δέντρων ακολουθώντας τον κανόνα του 50% πλειοψηφικής αποδοχής δέντρου (50% majority rule consensus tree), ενώ οι εκ των υστέρων πιθανότητες υπολογίστηκαν ως το ποσοστό των δέντρων που υποστηρίζουν έναν κλάδο (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Οι πιθανότητες $\geq 95\%$ υποδηλώνουν σημαντική στατιστική υποστήριξη. Τέλος, τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν στο FigTree (έκδοση 1.4.4., Rambaut, 2012).

2.4.3.2 Μέγιστη Πιθανοφάνεια (Maximum Likelihood, ML)

Η Μέγιστη Πιθανοφάνεια είναι μια πιθανοθεωρητική μέθοδος, η οποία λαμβάνει ως παραμέτρους κάποιες ποσότητες, οι οποίες έχουν σταθερές αλλά άγνωστες τιμές. Η βέλτιστη εκτίμηση των τιμών αυτών είναι εκείνη που μεγιστοποιεί την πιθανότητα να πάρουμε τα δείγματα που έχουμε αρχικά παρατηρήσει. Συγκεκριμένα, υπολογίζει την πιθανότητα που έχει ένα συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων (αλληλουχιών) να παρατηρηθεί μέσα από τις σχέσεις που περιγράφει το αξιολογούμενο δέντρο, όταν οι αλληλουχίες εξελίσσονται σύμφωνα με ένα εξ' αρχής ορισμένο μοντέλο νουκλεοτιδικών υποκατάστασεων (Nei & Kumar 2000). Το δέντρο με τη μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας είναι τελικά αυτό που προτείνεται ως το πιο κοντινό προς το πραγματικό.

Η ανάλυση της Μέγιστης Πιθανοφάνειας, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος RAxML (έκδοση 8.2, Stamatakis, 2014) ξεχωριστά, στα τρία ενοποιημένα σύνολα δεδομένων (τρία μιτοχονδριακά γονίδια: COI, COII, 16S και δύο πυρηνικά γονίδια: ITS1, ITS2 και μαζί οι 5 τόποι), μέσω του raxml GUI (έκδοση 1.5b1, Silvestro and Michalak, 2012) που αποτελεί ένα γραφικό περιβάλλον εργασίας φιλικότερο προς το χρήστη, ικανό για την εκτέλεση φυλογενετικών αναλύσεων διαφορετικής πολυπλοκότητας. Για να αποφευχθεί η παγίδευση σε τοπικό βέλτιστο η ανάλυση επαναλήφθηκε 100 ανεξάρτητες φορές. Η στατιστική ισχύς της τοπολογίας για κάθε δέντρο εξετάστηκε με τη διεξαγωγή 1000 επαναλήψεων bootstrap (Felsenstein, 1985). Οι κλάδοι που εμφανίζονται στο τελικό δέντρο θα πρέπει να βρίσκονται τουλάχιστον στα μισά από τα δέντρα που εκτιμήθηκαν.

2.5 Φυλογενετική προσέγγιση του αριθμού ειδών του γένους *Codringtonia*-Δέντρο ειδών με τη χρήση γενετικών δεικτών

Για να συναχθεί το δέντρο των ειδών του γένους *Codringtonia* εφαρμόστηκε μία προσεγγίση βασισμένη στη θεωρία της σύμφυσης στο πλήρως ενοποιημένο σετ δεδομένων (μιτοχονδριακοί και πυρηνικοί γενετικοί τόποι): (1) το πακέτο "Species Tree Ancestral Reconstruction" (* BEAST),. Συγκεκριμένα, αποτελεί μπεϋζιανή προσέγγιση και λειτουργεί υπό το πρίσμα του multispecies coalescent model (Rannala and Yang, 2003).

2.5.1 Δέντρα ειδών

Για τον υπολογισμό της φυλογένεσης των ειδών χρησιμοποιήθηκε το πακέτο *BEAST v. 2.4.7. του προγράμματος BEAST2 (Bouckaert et al., 2019). Το πρόγραμμα λαμβάνει υπόψη τις αλληλουχίες καθώς και την αντιστοιχία τους σε είδη και υπολογίζει ταυτόχρονα τη φυλογένεση των ειδών αλλά και του κάθε γονιδίου ξεχωριστά. Στη μέθοδο συνυπολογίζεται η αβεβαιότητα της εκτίμησης των δέντρων γονιδίων, παραμέτρων του

μοντέλου υποκατάστασης καθώς και η πιθανότητα γεγονότων βαθιάς σύγκλισης (Heled & Drummond, 2010). Τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης δεν δόθηκαν a priori αλλά χρησιμοποιήθηκε το BEAST Model Test. Επιπλέον, για την εκτίμηση του μοριακού ρολογιού χρησιμοποιήθηκε το Χαλαρό Ασυσχετίστο Λογαριθμοκανονικό Ρολόι (Relaxed Uncorrelated Lognormal Clock) με Yule διαδικασία ειδογένεσης (Yule process of speciation) και τυχαίο δέντρο εκκίνησης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για 50×10^7 γενεές. Για τη διαπίστωση της σύγκλισης των αποτελεσμάτων των ανεξάρτητων αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Tracer v. 1.7.1. (Rambaut et al., 2018). Το δραστικό μέγεθος δείγματος (effective sample sizes, ESSs) των παραμέτρων, ήταν πάνω από 200, τιμή που θεωρείται επαρκές επίπεδο δειγματοληψίας. Για την ανάλυση απορρίφθηκε το 10% ως «burnin». Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα TreeAnnotator v.2.4.7 για την επιλογή του δέντρου με τη μέγιστη αθροιστική συχνότητα εμφάνισης των κλάδων του, στο σύνολο των δέντρων που συλλέχθηκαν προγράμματος BEAST2 (Bouckaert et al., 2019). Το συναινετικό δέντρο (Species tree) απεικονίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος FigTree v1.4.1 (Rambaut 2006-2009). Τα είδη ορίστηκαν σύμφωνα με την συστηματική του Subai. Στο τελικό δέντρο ειδών, όλες οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο ίδιο είδος αντιπροσωπεύονται από έναν τελικό κόμβο (tip/terminal node).

2.6 Μέθοδοι Μελέτης Της Γονιδιακής Ροής Και Της Γενετικής Ποικιλότητας

2.6.1 Γενετική ποικιλότητα

Η γενετική ποικιλότητα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ιστορία των ειδών, την περιβαλλοντική ετερογένεια και το πληθυσμιακό μέγεθος (Nei 1987; Avise 2000; Haig et al., 2010). Επιπλέον, ο ρυθμός της μιτοχονδριακής εξέλιξης και οι ιστορικοί παράγοντες συμβάλλουν ιδιαίτερα στη διαμόρφωση των προτύπων γενετικής ποικιλότητας (Davison; 2002; Hu et al., 2018).

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι δείκτες για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε επίπεδο πληθυσμού είναι αυτοί της απλοτυπικής (Hd) και νουκλεοτιδικής ποικιλότητας (π) (Goodall-Copestake et al., 2010). Αυτό συμβαίνει διότι, αυτοί οι δείκτες μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες, όπως το μέγεθος και την ηλικία των πληθυσμών, το βαθμό σύνδεσης/επαφής των πληθυσμών, το ενδεχόμενο υβριδισμού με συγγενικά είδη, το ρυθμό μετάλλαξης και τον αντίκτυπο της φυσικής επιλογής. (Goodall-Copestake et al., 2010). Εκτός από αυτούς τους βιολογικούς παράγοντες, οι Hd και π επηρεάζονται επίσης από μεθοδολογικά ζητήματα, όπως η επαρκής δειγματοληψία ατόμων ανά πληθυσμό (Kim et al., 2009; Goodall-Copestake et al., 2010). Αυτό συμβαίνει διότι, η χρήση λίγων ατόμων (n) ανά πληθυσμό ($n \leq 5$) μπορεί να οδηγήσει σε υπό- ή υπερεκτίμηση αυτών των δεικτών (Nei and Li, 1979; Nei, 1987). Τα μεγαλύτερα μεγέθη δειγμάτων μπορούν να διακρίνουν καλύτερα χαμηλής ποικιλότητας πληθυσμούς (Kim et al., 2009), από ότι πληθυσμούς μεγάλης ποικιλότητας (Goodall-Copestake et al., 2010).

Συγκεκριμένα, το Hd φαίνεται να επηρεάζεται όταν ο πληθυσμός έχει χαμηλή ποικιλότητα, γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητη η δειγματοληψία περισσότερων ατόμων ώστε να παραληφθούν τα χαμηλής συχνότητας αλληλόμορφα. Αντιθέτως, το π επηρεάζεται όταν η πληθυσμοί εμφανίζουν μεγάλη γενετική ποικιλότητα καθώς

διαφοροποιημένα αλληλόμορφα σε τέτοιους πληθυσμούς έχουν μεγάλο αντίκτυπο στις εκτιμήσεις που προκύπτουν από μικρό αριθμό δειγμάτων (Goodall-Copestake et al., 2012).

2.6.1.1. Απλοτυπική ποικιλότητα (H_d) & Νουκλεοτιδική Ποικιλότητα (π)

Η απλοτυπική ποικιλότητα (γνωστή κι ως γονιδιακή ποικιλότητα) αντιπροσωπεύει την πιθανότητα δύο τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες να είναι διαφορετικές (Nei, 1987).

Η νουκλεοτιδική ποικιλότητα (π) υπολογίζει το μέσο αριθμό των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση μεταξύ δύο αλληλουχιών DNA σε όλα τα πιθανά ζευγάρια εντός ενός πληθυσμού (Nei, & Li, 1979). Είναι ένας δείκτης που ποσοτικοποιεί τη μέση διαφοροποίηση των αλληλουχιών και βοηθά στην εκτίμηση του πολυμορφισμού εντός ενός πληθυσμού.

Ο υπολογισμός της απλοτυπικής ποικιλότητας (H_d), της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας (π) και του συνολικού αριθμού των απλοτύπων (h) πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα DnaSP (έκδοση 6.12.01; Rozas et al. 2017) ξεχωριστά στα δύο ενοποιημένα σετ δεδομένων του μιτοχονδριακών και των πυρηνικών γονιδίων, αντίστοιχα, με το σκεπτικό ότι κληρονομούνται μαζί, όπως έχει πραγματοποιηθεί και σε άλλες μελέτες (Aguirre-Ramirez et al., 2017; Ye Xu et al., 2019). Οι αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν ανά είδος, ενώ ομαδοποιήθηκαν περαιτέρω ενδοειδικά, με βάση τον πληθυσμό στον οποίο ανήκουν.

2.6.2 Γονιδιακή ροή

Η διερεύνηση της γενετικής δομής των πληθυσμών ανά είδος, του γένους *Codringtonia*, προσεγγίστηκε με τον υπολογισμό ενός από τους πιο βασικούς στατιστικούς δείκτες της γενετικής πληθυσμών, ο οποίος ανήκει σε μια ομάδα στατιστικών εργαλείων τα οποία αναπτύχθηκαν από τον Wright (1951) και επεκτάθηκαν από τον Cockerham (1969) και αναφέρονται ως F-statistics. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε ο συντελεστής «συγκαταγωγής» F_{ST} (fixation index ή coancestry coefficient), ο οποίος χρησιμοποιείται ως μέτρο της γενετικής διαφοροποίησης και υποδιαίρεσης των πληθυσμών και περιγράφει τη μείωση της ετεροζυγωτίας εντός των υποπληθυσμών σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό εξαιτίας της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (drift). Οι πολύ χαμηλές τιμές του δείκτη εμφανίζονται στην περίπτωση ενός παμμεικτικού πληθυσμού, αποκαλύπτοντας έτσι την πιθανή γενετική ροή μεταξύ τους. Αντίθετα, όταν ο πληθυσμός διαιρείται σε απομονωμένους υποπληθυσμούς με πρακτικά μηδενική γονιδιακή ροή μεταξύ τους, ο F_{ST} λαμβάνει τη θεωρητικά μέγιστη τιμή του που ισούται με τη μονάδα. Το 1992, οι Excoffier et al., εισήγαγαν, το δείκτη Φ_{ST} για τη χρήση του σε απλοειδικά δεδομένα, ο οποίος είναι ανάλογος του F_{ST} . Στην προκειμένη περίπτωση, εκτιμάται η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των απλοτύπων βασιζόμενη στην εκτίμηση της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας π εντός ενός πληθυσμού αντί για την ετεροζυγωτία, στα δύο ενοποιημένα σετ δεδομένων ξεχωριστά (μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων) τα οποία μεταχειρίστηκαν αμφότερα, ως απλοειδικά. Για τον υπολογισμό λοιπόν, των κατά ζεύγη τιμών F_{ST} χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Arlequin (έκδοση 3.5.2.2., Schneider, Excoffier & Laval, 2010), οι οποίες βασίστηκαν σε πίνακα νουκλεοτιδικών

διαφορών και η στατιστική τους υποστήριξη εξήχθη μέσω 1000 permutations (οι τιμές F_{ST} ήταν στατιστικά σημαντικές για p -value <0.05).

2.7 Δημογραφικές Αναλύσεις- Δείκτες Ουδετερότητας

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, στατιστικές δοκιμές οι οποίες αρχικά αναπτύχθηκαν για την αξιολόγηση της υπόθεσης ότι όλες οι μεταλλάξεις είναι επιλεκτικά ουδέτερες, πλέον εφαρμόζονται για τον έλεγχο πρόσφατης δημογραφικής εξάπλωσης (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Αυτές οι δοκιμές έχουν σχεδιαστεί για να διακρίνουν τις ουδέτερα εξελισσόμενες αλληλουχίες από αυτές που υπόκεινται σε κάποιου είδους εξελικτική πίεση όπως η κατευθυνόμενη ή η σταθεροποιούσα επιλογή, η δημογραφική επέκταση ή συρρίκνωση, η «συμπαράσυρση» (hitchhiking) και η διάχυση (introgression).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, για τον προσδιορισμό απόκλισης από την ουδετερότητα, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί δημογραφικοί δείκτες: Tajima's D (Tajima, 1989), Fu's F_s (Fu, 1997) και Ramos-Onsins and Rozas's R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), Η εκτίμηση των τριών δεικτών πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα DnaSP (έκδοση 6.12.01; Rozas et al. 2017), όπου οι «υβριδοποιημένες» αλληλουχίες των δυο ενοποιημένων συνόλων δεδομένων (3 μιτοχονδριακών και 2 πυρηνικών γονιδίων ξεχωριστά) ομαδοποιήθηκαν με βάση τον πληθυσμό και περαιτέρω στο είδος στο οποίο ανήκουν, ενώ τα δεδομένα επεξεργάστηκαν ως απλοτυπικά. Η στατιστική σημασία των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε μέσω του Coalescent Simulation με αριθμό αντιγράφων ίσο με 1000 όπως προτείνεται από το εγχειρίδιο του προγράμματος. Τέλος, για τη μελέτη της ιστορικής δημογραφίας των πληθυσμών των ειδών του γένους χρησιμοποιήθηκε μια μεθοδολογία Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας, τα Extended Bayesian Skyline Plots (EBSPs).

2.7.1 Tajimas' D

Ο Tajima's D αποτελεί έναν στατιστικό δείκτη που εισήγαγε ο F. Tajima το 1989 και προκύπτει μέσω της μελέτης της σχέσης μεταξύ των πολυμορφικών θέσεων και του μέσου αριθμού νουκλεοτιδικών διαφορών, με ανά ζεύγη σύγκριση. Μέσω αυτής της σχέσης δημιουργήθηκε μια στατιστική μέθοδος για τον έλεγχο της υπόθεσης της εξελικτικής ουδετερότητας, η οποία απαιτεί μόνο δεδομένα της γενετικής ποικιλότητας (πολυμορφισμών) από ένα τυχαίο δείγμα πληθυσμού, συνυπολογίζοντας επίσης, εάν βρίσκεται σε ισορροπία ή όχι. Ουσιαστικά, το Tajima's D τεστ ελέγχει την περίσσεια ουδέτερων πολυμορφισμών στην υπό εξέταση περιοχή. Επίσης, ο δείκτης αυτός βασίζεται στο μοντέλο των infinite sites απουσία ανασυνδυασμού, το οποίο θεωρεί πως κάθε μετάλλαξη συμβαίνει κάθε φορά σε διαφορετικό σημείο. Η μηδενική υπόθεση ορίζει πως οι αλληλουχίες εξελίσσονται ουδέτερα και οι αλλαγές οφείλονται σε δημογραφικές συνιστώσες. Όταν το Tajima's D τεστ είναι αρνητικό υποδηλώνει την ύπαρξη θετικής επιλογής. Αν είναι μηδέν, τότε δεν υπάρχει επιλογή, ενώ αν είναι θετικό υποδηλώνει περίσσεια πολυμορφισμών με ενδιάμεση συχνότητα κάτι που είναι ένδειξη για εξισορροπούσα επιλογή. Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το P -value (<0.05). Ωστόσο, ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα του D μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως, η γενετική στενωπός και η ετερογένεια των μεταλλακτικών ρυθμών (ειδικά στην περίπτωση mtDNA) (Tajima, 1989).

2.7.2 Fu's FS

Ο FS είναι ένας δείκτης που ορίστηκε από τον Fu το 1997. Υπολογίζει την πιθανότητα παρατήρησης ενός τυχαίου δείγματος το οποίο φέρει αριθμό αλληλομόρφων ίδιο ή μικρότερο από την παρατηρούμενη τιμή σύμφωνα με το παρατηρούμενο επίπεδο ποικιλομορφίας και την προϋπόθεση ότι όλα τα αλληλόμορφα επιλέγονται ουδέτερα (Fu, 1997). Μια αρνητική τιμή FS υποδεικνύει ότι υπάρχει περίσσεια πρόσφατων μεταλλάξεων και κατ' επέκταση πλεονάζον αριθμός σπάνιων αλληλομόρφων, που οφείλεται πιθανόν σε πρόσφατη εξάπλωση του πληθυσμού ή σε γενετική «συμπαράσυρση». Μια θετική τιμή είναι ενδεικτική της έλλειψης αλληλομόρφων που μπορεί να οφείλεται σε φαινόμενο στενωπού ή σε φαινόμενο πλεονεκτήματος του ετεροζυγώτη (overdominant selection). Γενικότερα διαφαίνεται ότι ο δείκτης Fu's Fs είναι πιο ευαίσθητος στην ανίχνευση πληθυσμιακής αύξησης και γενετικού στοστόπ από ότι το Tajima's D. (Fu, 1997; Ramos-Onsins and Rozas, 2002.). Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά όταν P-value <0.02.

2.7.3 Ramos-Onsins & Rozas's R2

Ο δείκτης R2 αναπτύχθηκε από τους Ramos-Onsins and Rozas το 2002 και βασίζεται στις διαφορές μεταξύ του αριθμού των υποκαταστάσεων που απαντώνται μόνο σε μία αλληλουχία (singletons) και του μέσου αριθμού των νουκλεοτιδικών διαφορών, όπως και ο Tajima's D. Είναι κατάλληλος για τη διάκριση ενός πληθυσμού που αυξάνεται από αυτόν που διατηρεί σταθερό μέγεθος, καθότι στην πρώτη περίπτωση υπάρχει περίσσεια μεταλλαγών σε εξωτερικούς κλάδους της γενεαλογίας και συνεπώς περίσσεια singletons (Tajima, 1989; Hudson, Slatkin & Maddison, 1992; Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Ο δείκτης R2 μαζί με τον Fs, αποτελούν τα ισχυρότερα εργαλεία για τη μελέτη πληθυσμιακής αύξησης (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Συγκεκριμένα, προτείνεται η χρήση του R2 για μικρότερο αριθμό δειγμάτων, ενώ ο Fs για μεγαλύτερη ποσότητα δεδομένων. Ωστόσο, ο συνδυασμός και των δύο δεικτών θεωρείται αποδοτικότερος καθώς χρησιμοποιούν διαφορετικά είδη πληροφορίας (Ramos-Onsins and Rozas, 2002). Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται επίσης το P-value (<0.05).

2.7.4 Μεθοδολογία μελέτης δημογραφίας πληθυσμών ειδών με χρήση Extended Bayesian Skyline Plots

Για την ανακατασκευή της εξέλιξης των προγονικών πληθυσμιακών δραστικών μεγεθών (N_e) των ειδών του γένους *Codringtonia*, έγινε η χρήση των Εκτεταμένων Μπεϋζιανών Skyline Plots διαγραμμάτων (Extended Bayesian Skyline Plot -EBSP) (Heled and Drummond, 2008) με τη χρήση του BEAST2 (Bouckaert et al., 2014). Γενικά, τα EBSPs χρησιμοποιούν έναν μη παραμετρικό αλγόριθμο της μεθόδου MCMC (Markov Chain Monte Carlo) επεκτείνοντας μία προηγούμενη μέθοδο, η οποία βασίζεται στη θεωρία της σύμφυσης των γενεαλογικών γραμμών. Επιπλέον, εκτιμούν τον αριθμό των δημογραφικών αλλαγών απευθείας από τα δεδομένα αφού βασίζονται στις γενεαλογίες των γονιδίων για την εκτίμηση των πληθυσμιακών μεγεθών σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Ως εκ τούτου, ελέγχουν για αποκλίσεις του πληθυσμού από το σταθερό μέγεθος, μιας και το N_e αποτελεί τη βάση για τις θεωρητικές μετρήσεις της γενετικής δομής ενός πληθυσμού και συνδέεται με την ανίχνευση

διεργασιών όπως είναι η γενετική παρέκκλιση και η ενδογαμία. Επιπλέον, το πλεονέκτημα των EBSPs σε σχέση με παλαιότερες μεθόδους, είναι ότι παρέχουν επιπλέον την ικανότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών γενετικών τόπων, αντισταθμίζοντας έτσι τον μικρό αριθμό δειγμάτων με πληροφορία που απορρέει από διαφορετικά γονίδια. Οποιοσδήποτε αριθμός μη συνδεδεμένων πυρηνικών ή μιτοχονδριακών γενετικών τόπων από άτομα του πληθυσμού μπορεί να συνδυαστεί στην ανάλυση για να συναχθούν συμπεράσματα που αφορούν στην πληθυσμιακή ιστορία του εκάστοτε είδους (Heled and Drummond, 2008).

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε όλα τα άτομα των πληθυσμών μαζί, ανά είδος. Έτσι προέκυψαν επτά EBSPs, όσα και τα είδη του γένους *Codringtonia*. Η ενοποίηση των πληθυσμών ανά είδος, έλαβε χώρα για να αποκτηθεί μια διαειδική/συνολική εικόνα της δημογραφίας τους γένους. Επιπλέον, υπήρχαν περιπτώσεις όπου ο αριθμός των ατόμων ανά πληθυσμό ήταν περιορισμένος. Επομένως, το να συμπεριληφθούν όλα τα άτομα τους είδους σε μία ευρύτερη ομάδα ήταν μονόδρομος. Για κάθε είδος, το EBSP προέκυψε από το ενοποιημένο σύνολο δεδομένων, το οποίο περιελάμβανε τρία μιτοχονδριακά (16S, COI, COII) και δύο πυρηνικά γονιδίων (ITS1, ITS2). Ακολουθώντας συνολικά τις οδηγίες του εγχειριδίου του BEAST2 (Bouckaert et al., 2014), χρησιμοποιήθηκε ένα αυστηρό ασυσχέτιστο λογαριθμοκανονικό ρολόι για όλα τα γονίδια, έχοντας μόνο γνωστούς τους ρυθμούς υποκατάστασης των μιτοχονδριακών γονιδίων (υπό το πρίσμα ενός μέσου ρυθμού), έτσι όπως περιεγράφηκαν στο διδακτορικό της Κοτσακιάζη (2013) (16S:2.5%, COI & COII:4%). Τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης δεν δόθηκαν a priori αλλά χρησιμοποιήθηκε το BEAST Model Test. Ακόμη, αλυσίδα MCMC εκτελέστηκε για 60 εκατομμύρια βήματα ή και περισσότερα, έως ότου το ESS ήταν μεγαλύτερο από 200, ενώ το sampling πραγματοποιούνταν κάθε 1000 βήματα. Το αρχικό 10% των συνολικά παραγόμενων δέντρων/samples απορρίφθηκε (burn-in) για βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι αλλαγές στο μέγεθος του πληθυσμού απεικονίστηκαν με τη χρήση του κώδικα στην R, που εμπεριέχεται στο εγχειρίδιο χρήσης του λογισμικού BEAST 2 (Bouckaert et al., 2014).

2.8 Μεθοδολογία Μελέτης Αλληλοεπικάλυψης Θώκων (Niche Overlap) των ειδών του γένους *Codringtonia*

Η χωρική υποδιαίρεση, κι ως εκ τούτου η διαφοροποίηση των οικολογικών θώκων, συχνά παίζει σημαντικό ρόλο στην ειδογένεση. Για τη μελέτη και τη σύγκριση της επικάλυψης θώκων των ειδών ενδιαφέροντος, χρησιμοποιήθηκε το πλαίσιο της εργασίας των Broennimann et al. (2012).

Συγκεκριμένα, αφού επιτεύχθηκε η εξομάλυνση των δεδομένων μέσω της εκτίμησης πυκνότητας πυρήνα (kernel density), χρησιμοποιήθηκαν δύο περιβαλλοντικοί άξονες που προέκυψαν από την Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA – Broennimann et al., 2012), βασισμένη σε 274 σημεία που εντοπίζονται στην περιοχή εξάπλωσης των ειδών του γένους μελέτης. Οι συντεταγμένες των σημείων αντλήθηκαν από τη διδακτορική διατριβή της Κοτσακιάζη (2013) και του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Βέρνης. Οι μη συγγραμμικοί περιβαλλοντικοί δείκτες πρόβλεψης (μεταβλητές) που χρησιμοποιήθηκαν, αντλήθηκαν από τις βάσεις κλιματικών δεδομένων WorldClim (Hijmans et al., 2005), ENVIREM (Bemmels, 2018) και SoilGrids (Hengl et al., 2017; <https://www.isric.org/explore/soilgrids/faq-soilgrids-2017>) σε ανάλυση 30 arc-seconds (ca. 1 km στον

Ισημερινό). Αφορούσαν κλιματικά δεδομένα όπως την εποχικότητα θερμοκρασίας, τη βροχόπτωση της ψυχρότερης εποχής, την πιθανή εξατμισοδιαπνοή, το δείκτη ξηρότητας/ξηρασίας και το δείκτη θερμικού φορτίου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δείκτες σχετικοί με τις ιδιότητες του εδάφους, όπως το pH, το ανάγλυφο/την τραχύτητα και το οργανικό του περιεχόμενο. Επιπλέον, ψηφιοποιήθηκαν από γεωλογικό χάρτη της Ελλάδος του Ινστιτούτου Γεωλογικών και Μεταλλευτικών Ερευνών (έκδοση 1983) οι ευρύτερες περιοχές κατανομής των ειδών (Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα) με ασβεστολιθικό υπόβαθρο στο QGIS v 3.8.3 (QGIS Development Team, 2018; <http://www.qgis.org>}), όπου και εντάχθηκαν στην ανάλυση. Οι παραπάνω περιβαλλοντικές μεταβλητές παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 2.4**.

Ύστερα, υπολογίστηκε ο παρατηρούμενος βαθμός αλληλοεπικάλυψης των θώκων μέσω της χρήσης του δείκτη D του Schoener (Schoener, 1970; Broennimann et al., 2012), ο οποίος κυμαίνεται από 0 (μηδενική επικάλυψη) έως 1 (πλήρης επικάλυψη - Schoener, 1968). Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η στατιστική σημασία των δοκιμών σύγκλισης θώκων (niche equivalence) και ομοιότητας (niche similarity) για κάθε ζεύγος ειδών, με βάση μια διαδικασία τυχαιοποίησης με 1000 παραλλαγές (permutations; Broennimann et al., 2012). Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκε μια μηδενική κατανομή (κατανομή πιθανότητας της στατιστικής δοκιμής όταν η μηδενική υπόθεση είναι αληθής) του βαθμού επικάλυψης (D_{RND}), η οποία στη συνέχεια συγκρίθηκε με την παρατηρούμενη τιμή D του Schoener (D_{OBS}) για να ανιχνευτεί το ενδεχόμενο της μετατόπισης θώκου με βάση την σύγκλιση και την ομοιότητα (η μετατόπιση υφίσταται όταν $D_{OBS} < D_{RND}$ και $p < 0,05$; Warren et al., 2008).

Σύμφωνα με τη μηδενική υπόθεση για τη δοκιμή σύγκλισης θώκων, η επικάλυψη θώκου ενός δεδομένου ζεύγους ειδών παραμένει αμετάβλητη ακόμη και μετά την τυχαία ανακατανομή των δεδομένων εμφάνισης μεταξύ των δύο γεωγραφικών περιοχών εξάπλωσης (συντηρητισμός θώκου - niche conservatism). Από την άλλη πλευρά, όταν ισχύει η μηδενική υπόθεση της δοκιμής ομοιότητας θώκων, υποδηλώνει πως η παρατηρούμενη επικάλυψη των θώκων εξηγείται από την τοπική ομοιότητα στις διαθέσιμες περιβαλλοντικές συνθήκες που υφίσταται στα δύο συγκριτικά εύρη εξάπλωσης των ειδών (Warren et al., 2008; Broennimann et al., 2012). Έτσι, η δοκιμή σύγκλισης και ομοιότητας θώκων ελέγχει εάν οι δύο θώκοι εναλλάσσονται και εάν η ομοιότητά τους όντως υφίσταται και δεν είναι απλά προϊόν στοχαστικότητας.

Όλες οι εξειδικευμένες αναλύσεις σύγκρισης των θώκων πραγματοποιήθηκαν με τη βιβλιοθήκη «ecospat» 3.0 (Broennimann et al., 2018) στη γλώσσα προγραμματισμού R 3.5.3 (R Core Development Team, 2019). Βασιζόμενοι των αποτελεσμάτων της Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών για κάθε taxon, πραγματοποιήθηκε ένας επιπρόσθετος έλεγχος (McCormack et al., 2010) για την απόκλιση θώκου (niche divergence) μεταξύ των υπό μελέτη taxa μέσω ενός Student's t-test. Ως εκ τούτου, η απόκλιση θώκου επιβεβαιώθηκε στις περιπτώσεις όπου το p-value του t-test ήταν στατιστικά σημαντικό ($< 0,05$).

Πίνακας 2.4. Αναλυτική παρουσίαση των εννέα περιβαλλοντικών μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη επικάλυψη θώκων του γένους *Codringtonia*

Συντομογραφία Μεταβλητής Στην Ανάλυση	Σύντομη Περιγραφή	Πηγή
bio_4	Εποχικότητα Θερμοκρασίας (Temperature Seasonality)	WorldClim
bio_19	Βροχόπτωση Ψυχρότερης Εποχής (Precipitation Of Coldest Quarter)	WorldClim
aridityIndexThorn thwaite	Δείκτης Ξηρότητας του Κλίματος (Thornthwaite, 1948) σε μια δεδομένη τοποθεσία (Index of the degree of water deficit below water need)	ENVIREM
PETDriestQuarter	Μέση Μηνιαία Εξαμυσοδιαπονή της ξηρότερης εποχής (Metzger et al., 2013) (mm/μήνα) (mean monthly PET of driest quarter, mm / month)	ENVIREM
PHIHOX_M_sl7_ 250m	Ο δείκτης pH σε διάλυμα νερού (pH index measured in water solution - predicted mean value of soil organic carbon mass fraction at standard depth of 200 cm from soil surface)	SoilGrids
Soil_Organic_Car bon_Content	Περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα εδάφους (Soil organic carbon content in the fine earth fraction)	SoilGrids
Terrain_Ruggedn ess	Τραχύτητα εδάφους (Riley et al., 1999) (to express the amount of elevation difference between adjacent cells of a digital elevation grid)	tri από spatialEco R βιβλιοθήκη
hli - Heat load index	Δείκτης θερμικού φορτίου (McCune & Keon, 2002) (Describes a southwest facing slope should have warmer temperatures than a southeast facing slope, even though the amount of solar radiation they receive is equivalent)	hli από spatialEco R βιβλιοθήκη
calcareous	περιοχές κατανομής των ειδών (Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα) με ασβεστολιθικό υπόβαθρο	ψηφιοποίηση από γεωλογικό χάρτη

Κεφάλαιο 3ο-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκτίμηση Γενετικών Αποστάσεων

Η μέση γενετική απόσταση εντός και μεταξύ των ειδών *Codringtonia* υπολογίστηκε με διαπαραμετρικό μοντέλο του Kimura. Στον **Πίνακα 3.1**, παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα για το ενοποιημένο σύνολο δεδομένων των τριών μιτοχονδριακών γονιδίων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι αλληλουχίες εντός του γένους διαφέρουν μεταξύ τους κατά μέσο όρο κατά 11.5%, ενώ με της εξω-ομάδας κατά μέσο όρο κατά 26.5%. Επιπλέον, οι διαφορές μεταξύ των ειδών *Codringtonia* κυμαίνονται από 1.3% (*C. elisabethae* με *C. gittenbergeri*) ως 17.3% (*C. parnassia* με *C. eucineta*), ενώ ένδο-ειδικά κυμαίνονται μεταξύ 0.2% (*C. gittenbergeri*) και 5.2% (*C. eucineta*). Αν εξετάσουμε ξεχωριστά τα γονίδια, για το γένος *Codringtonia* το COII φαίνεται να έχει υψηλότερο ρυθμό διαφοροποίησης από το COI, ενώ το 16S rDNA φαίνεται να έχει χαμηλότερο ρυθμό διαφοροποίησης από τα δύο προηγούμενα γονίδια. Οι γενετικές αποστάσεις για το κάθε ένα από τα τρία γονίδια χωριστά παρουσιάζονται στο Παράρτημα στους Πίνακες Π2, Π3, και Π4. Με το αντίστοιχο μοντέλο υπολογίστηκαν κι οι γενετικές αποστάσεις για το ενοποιημένο σύνολο δεδομένων των δυο πυρηνικών γονιδίων, οι οποίες συγκεντρώνονται στον **Πίνακα 3.2**. Στην προκειμένη, οι αλληλουχίες των ενδο-ομάδων διαφοροποιούνται μεταξύ τους κατά μέσο όρο κατά 1%, ενώ με της εξω-ομάδας στο 6.7%. Σε ότι αφορά τις δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις, η ελάχιστη απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών είναι 0.17% (*C. elisabethae* με *C. gittenbergeri*) και η μέγιστη 1.6% (*C. parnassia* με *C. intusplicata*), ενώ ενδο-ειδικά τα αντίστοιχα νούμερα είναι 0.02% (*C. gittenbergeri*) και 0.26% (*C. parnassia*). Αν μελετήσουμε ξεχωριστά τα δύο πυρηνικά γονίδια, το ITS2 (~1.7%) εμφανίζει μεγαλύτερο ρυθμό διαφοροποίησης από το ITS1 (0.77%). Οι γενετικές αποστάσεις για το κάθε ένα από τα δύο γονίδια χωριστά παρουσιάζονται στο Παράρτημα στους Πίνακες Π5 και Π6.

3.2 Επιλογή μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

Τα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που επιλέγονται ως καταλληλότερα διαφέρουν από πρόγραμμα σε πρόγραμμα κι εξαρτώνται από τις δυνατότητες που έχει το κάθε ένα να τα αναγνωρίσει. Ωστόσο, αυτό δε σημαίνει απαραίτητα ότι όλα τα μοντέλα διαφοροποιούνται πλήρως καθότι ακολουθούν μια, εν μέρει, εγκιβωτισμένη ιεραρχία. Ως εκ τούτου, επειδή κάποια μοντέλα «περιέχουν» τα υπόλοιπα, μπορούν να εξισωθούν με αυτά, αν οι παράμετροι πάρουν τις κατάλληλες τιμές.

Τα υποσύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν και που μπορεί να περιλαμβάνουν περισσότερους του ενός τόπους, οι οποίοι περιγράφονται από το ίδιο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης, δίνονται ξεχωριστά για το πρόγραμμα MrBayes καθώς και για το κάθε σετ δεδομένων στον **Πίνακα 3.3**. Για τα δεδομένα που περιγράφονται καλύτερα από το ίδιο μοντέλο αλλά παρόλα αυτά φαίνεται να ανήκουν σε διαφορετικό μπλοκ, ισχύει ότι μπορεί να περιγράφονται ναι μεν από το ίδιο μοντέλο, αλλά το PartitionFinder έχει εκτιμήσει ότι θα έχουν διαφορετικές παραμέτρους. Το μοντέλο υποκατάστασης που χρησιμοποιήθηκε για το πρόγραμμα RAxML για όλες τις καταταμίσεις (partitions) ήταν το GTRGAMMA (με ανάλυση ML and thorough bootstrap) .

Πίνακας 3.1. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών για το ενοποιημένο σετ δεδομένων και των τριών μιτοχονδριακών γονιδίων, εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

εντός		<i>Εξωομάδα</i>	<i>C.intusplacata</i>	<i>C.codringtonii</i>	<i>C.elisabethae</i>	<i>C.eucineta</i>	<i>C.gittenbergeri</i>	<i>C.helenae</i>	<i>C.parnassia</i>
0.126	<i>Εξωομάδα</i>		0.185	0.204	0.192	0.164	0.202	0.199	0.19
0.036	<i>C.intusplacata</i>	0.266		0.094	0.075	0.069	0.077	0.083	0.127
0.020	<i>C.codringtonii</i>	0.277	0.122		0.093	0.08	0.1	0.101	0.138
0.010	<i>C.elisabethae</i>	0.26	0.098	0.108		0.072	0.008	0.045	0.143
0.051	<i>C.eucineta</i>	0.252	0.113	0.115	0.102		0.078	0.079	0.128
0.002	<i>C.gittenbergeri</i>	0.266	0.096	0.111	0.013	0.104		0.048	0.149
0.007	<i>C.helenae</i>	0.265	0.104	0.114	0.053	0.107	0.052		0.144
0.039	<i>C.parnassia</i>	0.273	0.165	0.168	0.168	0.173	0.17	0.167	

Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις

Πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση.

Με **κόκκινο** χρώμα επισημαίνεται η **μέγιστη** τιμή, ενώ με **γαλάζιο** η **μικρότερη** σε ένδο- και δια- ειδικό επίπεδο, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι εξωομάδες.

Πίνακας 3.2. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών για το ενοποιημένο σετ δεδομένων και των δύο πυρηνικών γονιδίων, εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

		<i>Εξωομάδα</i>	<i>C.eucineta</i>	<i>C.intusplacata</i>	<i>C.codringtonii</i>	<i>C.elisabethae</i>	<i>C.gittenbergeri</i>	<i>C.helenae</i>	<i>C.parnassia</i>
0.0051	<i>Εξωομάδα</i>		0.06301	0.06661	0.06391	0.06116	0.06287	0.06523	0.06228
0.0006	<i>C.eucineta</i>	0.0659		0.01138	0.00288	0.00175	0.00397	0.01116	0.01382
0.0018	<i>C.intusplacata</i>	0.0700	0.0126		0.01051	0.00954	0.01044	0.00007	0.01418
0.0016	<i>C.codringtonii</i>	0.0672	0.0040	0.0122		0.00158	0.00248	0.01035	0.01360
0.0023	<i>C.elisabethae</i>	0.0648	0.0032	0.0116	0.0035		0.00044	0.00936	0.01195
0.0002	<i>C.gittenbergeri</i>	0.0655	0.0044	0.0115	0.0034	0.0017		0.01035	0.01285
0.0019	<i>C.helenae</i>	0.0687	0.0124	0.0019	0.0121	0.0115	0.0114		0.01427
0.0026	<i>C.parnassia</i>	0.0661	0.0154	0.0164	0.0157	0.0144	0.0143	0.0165	

Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις

Πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση.

Με **κόκκινο** χρώμα επισημαίνεται η **μέγιστη** τιμή, ενώ με **γαλάζιο** η **μικρότερη** σε ένδο- και δια- ειδικό επίπεδο, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι εξωομάδες.

Πίνακας 3.3. Τα υποσύνολα δεδομένων καθώς και τα μοντέλα που τα περιγράφουν καλύτερα για το πρόγραμμα MrBayes, και για τα τρία σετ δεδομένων.

Υποσύνολο	Ονόματα Partition	Καταλληλότερο Μοντέλο
<i>Ενοποιημένο Σύνολο δεδομένων Μιτοχονδριακών γονιδίων</i>		
1	COII_codon2, 16S_codon1	GTR+G
2	COI_codon1, COII_codon3	GTR+G
3	COII_codon1, COI_codon2	GTR+I+G
4	COI_codon3	GTR
<i>Ενοποιημένο Σύνολο δεδομένων Πυρηνικών γονιδίων</i>		
1	ITS1, ITS2	HKY+G
<i>Ενοποιημένο Σύνολο δεδομένων Πυρηνικών και Μιτοχονδριακών γονιδίων</i>		
1	ITS1, COII_codon3, ITS2	K80+I
2	COII_codon1, 16S	HKY+G
3	COI_codon1	HKY+G
4	COI_codon2	SYM+I+G
5	COI_codon3	F81
6	COII_codon2	HKY+G

3.3 Φυλογενετικές αναλύσεις

Όπως προαναφέρθηκε και στην Παράγραφο 2.4.2., για τις φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τρία σετ δεδομένων: ένα για τους τρεις μιτοχονδριακούς τόπους (COI, COII, 16S), το οποίο περιλάμβανε 105 δείγματα, ένα που περιλάμβανε τα δύο πυρηνικά γονίδια (ITS1, ITS2) με 91 δείγματα, και ένα με ενοποιημένους μιτοχονδριακούς και πυρηνικούς τόπους των 81 ατόμων, από όλα τα είδη του γένους αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα των ειδών *Codringtonia* όπως προέκυψαν από την ανάλυση Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ) παρουσιάζονται στις **Εικόνες 3.1., 3.2.** και **3.3.** Η ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ΜΠ) κατέληξε σε δέντρα παρόμοιας τοπολογίας με αυτά της ΜΣ, με επιπλέον διαφορές στη στατιστική στήριξη των κλάδων, η οποία ανά περιπτώσεις ήταν αρκετά μικρότερη. Τα δέντρα της ΜΠ παρατίθενται στις Εικόνες Π1, Π2, και Π3 του Παραρτήματος.

Οι προαναφερόμενες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν και για κάθε γονίδιο ξεχωριστά, καταλήγοντας σε δέντρα στα οποία η μονοφυλετικότητα των κλάδων διατηρείται και στηρίζεται ισχυρά στατιστικά (στις περισσότερες περιπτώσεις), όπως φαίνεται στα δέντρα των ενοποιημένων σετ δεδομένων για τα μιτοχονδριακά και για τα πυρηνικά γονίδια αντίστοιχα (**Εικόνα 3.1.** και **3.2.**). Ωστόσο, οι σχέσεις μεταξύ των κλάδων παρουσιάζουν χαμηλή στατιστική στήριξη. Για το λόγο αυτό τα δέντρα από το κάθε ένα γονίδιο χωριστά δεν παρατίθενται.

3.3.1. Μιτοχονδριακό σετ δεδομένων

Από τις 1593 νουκλεοτιδικές θέσεις που εξετάστηκαν σε σύνολο 105 ατόμων του γένους *Codringtonia*, στο ενοποιημένο σετ δεδομένων των τριών μιτοχονδριακών γονιδίων (COI, COII, 16S), υπήρχαν 1090 συντηρημένες περιοχές και 496 πολυμορφικές (~28%), 447 εκ των οποίων ήταν πληροφοριακές. Όταν συμπεριλήφθηκαν και οι

δύο εξωομάδες στην ανάλυση, οι συντηρημένες θέσεις ήταν 1001, οι 585 πολυμορφικές (36.7%) και οι 510 από αυτές πληροφοριακές. Στο σύνολο των 105 αλληλουχιών που αναλύθηκαν, εντοπίστηκαν 46 διαφορετικοί απλότυποι (48 στο σύνολο με τις 2 εξωομάδες). Οι παραπάνω πληροφορίες προέκυψαν από το πρόγραμμα MEGA X.

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο της **Εικόνας 3.1.**, υπάρχουν έξι διακριτοί φυλογενετικοί κλάδοι. Η φυλογένεση αυτή, είναι μερικώς σύμφωνη με την τελευταία συστηματική αναθεώρηση του γένους (Subai, 2005) και τη δημοσίευση της Κοτσακιοζή (Kotsakiozi et al., 2012). Πέντε (*C. helenae*, *C. codringtonii*, *C. eucineta*, *C. intusplicata*, *C. parnassia*) από τα εφτά κατ' όνομα είδη του γένους *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.

Ειδικότερα, 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 (73% με την ανάλυση ΜΠ). Στη συνέχεια, εμφανίζεται ο αρκετά ισχυρά υποστηριζόμενος κλάδος που περιλαμβάνει το *C. intusplicata* και αμέσως μετά ο κλάδος που περιλαμβάνει το *C. eucineta* και *C. codringtonii* ως αδελφές ομάδες, με ωστόσο, ιδιαίτερα χαμηλή υποστήριξη και στις δύο αναλύσεις (ΜΣ και ΜΠ). Αντίθετα, η σχέση του κλάδου που περιλαμβάνει τον κλάδο με *C. eucineta* και *C. codringtonii* με τον μεγαλύτερο κλάδο που περιεγράφηκε παραπάνω (*C. intusplicata*, *C. helenae*, *C. elisabethae*, και *C. gittenbergeri*), υποστηρίζεται ισχυρά από τη ΜΣ ανάλυση αλλά ασθενώς από την ΜΠ. Τέλος, το είδος *C. parnassia* είναι το τελευταίο που διαχωρίζεται με ισχυρή υποστήριξη και στις 2 αναλύσεις, από τα υπόλοιπα είδη του γένους. Επίσης, είναι άξιο αναφοράς ότι, άτομα που συλλέχθηκαν από δύο περιοχές στις οποίες εξαπλώνεται το *C. gittenbergeri* 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*.

3.3.2. Πυρηνικό σετ δεδομένων

Από τις 1404 νουκλεοτιδικές θέσεις που εξετάστηκαν σε σύνολο 90 ατόμων του γένους *Codringtonia*, στο ενοποιημένο σετ δεδομένων των δύο πυρηνικών γονιδίων ITS1 και ITS2, υπήρχαν 1320 συντηρημένες περιοχές και 66 πολυμορφικές (~4.7%), 22 εκ των οποίων ήταν πληροφοριακές. Όταν συμπεριλήφθηκαν και οι δύο εξωομάδες στην ανάλυση, οι συντηρημένες θέσεις ήταν 1258, οι 142 πολυμορφικές (~10.1%) και οι 115 από αυτές πληροφοριακές. Στο σύνολο των 90 αλληλουχιών που αναλύθηκαν, εντοπίστηκαν 33 διαφορετικοί απλότυποι (35 στο σύνολο με τις 2 εξωομάδες). Οι παραπάνω πληροφορίες έχουν εξαχθεί από το πρόγραμμα MEGA X.

Στο φυλογενετικό δέντρο της **Εικόνας 3.2.**, αποτυπώνεται μια πιο βαθιά φυλογένεση των ειδών του γένους καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί δύο πυρηνικοί δείκτες. Η προκειμένη, εμφανίζει κάποιες πολυτομίες, ενώ τα είδη δεν διαχωρίζονται σε έξι διακριτούς κλάδους όπως συνέβη με τη χρήση των μιτοχονδριακών γονιδίων, αλλά σε τρεις

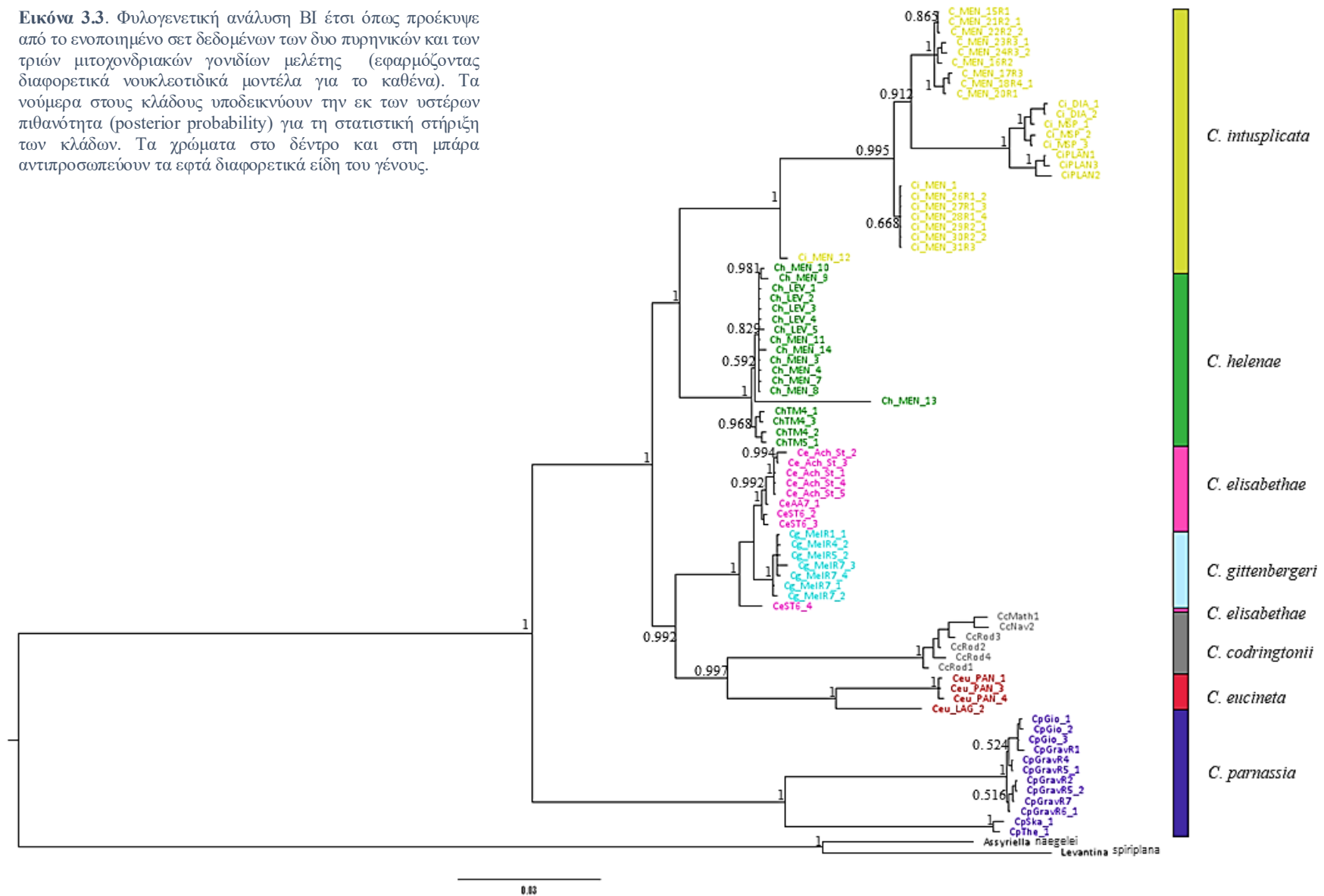
και είναι κατά βάση ασύμφωνη με την τελευταία συστηματική αναθεώρηση του γένους (Subai, 2005). Ειδικότερα, τα *C. intusplicata* και *C. helenae* σχηματίζουν μαζί μια ισχυρά στατιστικά στηριζόμενη μονοφυλετική ομάδα. Επίσης, διακρίνονται οι εξής αδελφοί κλάδοι με ιδιαίτερα υψηλές στηρίξεις και στις δύο φυλογενετικές αναλύσεις: *C. codringtonii* με *C. eucineta* και *C. gittenbergeri* και *C. elisabethae*. Μόνο το είδος *C. parnassia* διατηρεί τη μονοφυλετικότητα του και στους δύο γενετικούς τόπους.

3.3.3. Συνδυασμένη ανάλυση των πέντε γενετικών τόπων (πυρηνικών και μιτοχονδριακών)

Από τις 2993 νουκλεοτιδικές θέσεις που εξετάστηκαν σε σύνολο 81 ατόμων του γένους *Codringtonia*, στη συνδυασμένη ανάλυση των πέντε γονιδίων (δύο πυρηνικών και τριών μιτοχονδριακών), υπήρχαν 2408 συντηρημένες περιοχές και 548 πολυμορφικές (~18.3%), 487 εκ των οποίων ήταν πληροφοριακές. Όταν συμπεριλήφθηκαν και οι δύο εξωομάδες στην ανάλυση, οι συντηρημένες θέσεις ήταν 2260, οι 726 πολυμορφικές (~24.3%) και οι 626 από αυτές πληροφοριακές.

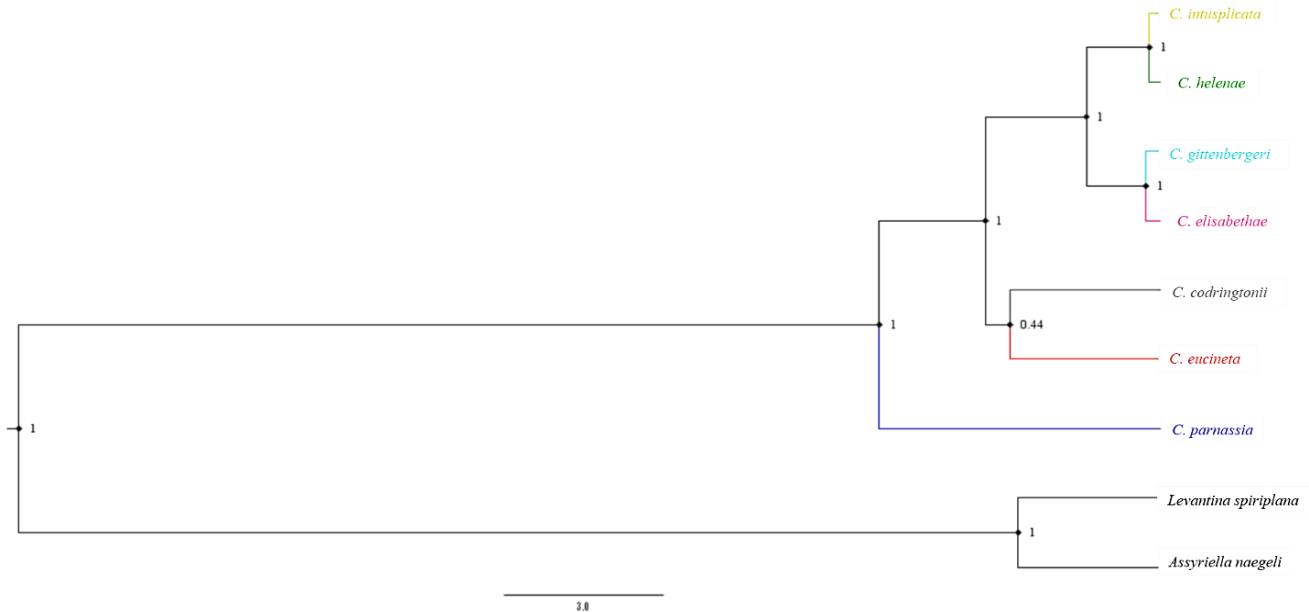
Η τοπολογία που προκύπτει από την συνδυασμένη ανάλυση όλων των τόπων δεν είναι απόλυτα σύμφωνη με τη μιτοχονδριακή τοπολογία, και παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.3**. Τα είδη χωρίζονται σε πέντε διακριτούς κλάδους. Επιπλέον, για άλλη μια φορά, το *C. elisabethae* εμφανίζεται παραφυλετικό σε σχέση με το *C. gittenbergeri*, Τα *C. intusplicata* και *C. helenae* είναι αδελφά ταξα, όπως επίσης και τα *C. codringtonii* με *C. eucineta*.

Εικόνα 3.3. Φυλογενετική ανάλυση BI έτσι όπως προέκυψε από το ενοποιημένο σετ δεδομένων των δυο πυρηνικών και των τριών μιτοχονδριακών γονιδίων μελέτης (εφαρμόζοντας διαφορετικά νουκλεοτιδικά μοντέλα για το καθένα). Τα νούμερα στους κλάδους υποδεικνύουν την εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability) για τη στατιστική στήριξη των κλάδων. Τα χρώματα στο δέντρο και στη μπάρα αντιπροσωπεύουν τα επτά διαφορετικά είδη του γένους.



3.4 Αποτελέσματα δέντρου ειδών με τη χρήση γενετικών δεικτών

Το δέντρο ειδών του γένους *Codringtonia* κατασκευάστηκε με τη χρήση του προγράμματος *BEAST. Τα είδη ορίστηκαν σύμφωνα με την συστηματική του Subai. Η τοπολογία που ανακτήθηκε παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.4**. Το γένος αποτελείται από επτά διακριτά είδη, με υψηλή υποστήριξη εκτός από την υποστήριξη του εσωτερικού κόμβου σε *C. eucineta* και *C. codringtonii*.



Εικόνα 3.4. Σχέση των ειδών του γένους *Codringtonia*, σύμφωνα με το πρόγραμμα *BEAST, με βάση τους πέντε γενετικούς τόπους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι αριθμοί στους κόμβους, που συμβολίζονται με ρόμβους, υποδεικνύουν την εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability-p.p.). Σημαντική στατιστική υποστήριξη παρουσιάζουν αυτοί με p.p. > 0.95.

3.5 Αποτελέσματα Γενετικής Ποικιλότητας και Γονιδιακής Ροής

Στους **Πίνακες 3.4.** έως και **3.11.** παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα που αφορούν τη γενετική ποικιλότητα και τη γενετική διαφοροποίηση των ειδών του γένους συνολικά αλλά και για κάθε πληθυσμό τους, χρησιμοποιώντας ξεχωριστά τα δυο σύνολα μιτοχονδριακών και πυρηνικών τόπων, αντίστοιχα. Παρακάτω δίδεται μια συνοπτική περιγραφή της ποικιλότητας ανά είδος. Στις περιπτώσεις όπου υπήρξε ένα άτομο ανά πληθυσμό, χρησιμοποιείται αχνή γκρι γραφή μιας και δεν πληρείται η έννοια του πληθυσμού.

C. intusplicata

Στο είδος *C. intusplicata*, διακρίθηκαν 15 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 27 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 9 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 25 ατόμων. Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα του μιτοχονδρίου είναι ίση με 0.906, και η μέση νουκλεοτιδική ποικιλότητα ίση με 0.0368, για τους μιτοχονδριακούς τόπους, ενώ για τον πυρηνικούς 0.743 και 0.00176 αντίστοιχα.. Η ενδοειδική γενετική απόσταση αγγίζει το 3.6% στο μιτοχόνδριο και το 0.18% στον πυρήνα

(Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, υπολογίστηκαν, ο αριθμός των απλοτύπων h , η απλοτυπική ποικιλότητα H_d και η νουκλεοτιδική ποικιλότητα P_i , για κάθε πληθυσμό και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και 3.5. Οι κατά ζεύγη F_{ST} δείκτες που κρίθηκαν στατιστικά σημαντικοί κατέδειξαν υψηλό ποσοστό διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών (Πίνακας 3.6.). Οι πληθυσμοί με τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση και στα δυο σετ δεδομένων ήταν μεταξύ των 4 & 6 (Μαίναλο 1633m & Διακοπτό προς Καλάβρυτα).

C. codringtonii

Στο είδος *C. codringtonii*, διακρίθηκαν 13 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 10 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 3 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 6 ατόμων. Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα του μιτοχονδρίου είναι ίση με 0.923, και η μέση νουκλεοτιδική ποικιλότητα ίση με 0.0175, για τους μιτοχονδριακούς τόπους, ενώ για τον πυρηνικούς 0.600 και 0.00183 αντίστοιχα. Η ενδοειδική γενετική απόσταση αγγίζει το 2% στο μιτοχόνδριο και το 0.16% στον πυρήνα (Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, υπολογίστηκαν, ο αριθμός των απλοτύπων h , η απλοτυπική ποικιλότητα H_d και η νουκλεοτιδική ποικιλότητα P_i , για κάθε πληθυσμό και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και 3.5. Οι κατά ζεύγη F_{ST} δείκτες δεν κρίθηκαν στατιστικά σημαντικοί (Πίνακας 3.7).

C. gittenbergeri

Στο είδος *C. gittenbergeri*, διακρίθηκαν 6 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 13 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 3 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 7 ατόμων. Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα του μιτοχονδρίου είναι ίση με 0. 0.769, και η μέση νουκλεοτιδική ποικιλότητα ίση με 0.00115, για τους μιτοχονδριακούς τόπους, ενώ για τον πυρηνικούς 0.286 και 0.00023 αντίστοιχα. Η ενδοειδική γενετική απόσταση αγγίζει το 0.2% στο μιτοχόνδριο και το 0.02% στον πυρήνα (Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, υπολογίστηκαν, ο αριθμός των απλοτύπων h , η απλοτυπική ποικιλότητα H_d και η νουκλεοτιδική ποικιλότητα P_i , για τον ένα μοναδικό πληθυσμό και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και 3.5. Ο δείκτης F_{ST} δεν υπολογίστηκε καθότι υπήρχαν άτομα μόνο από έναν πληθυσμό.

C. elisabethae

Στο είδος *C. elisabethae*, διακρίθηκαν 5 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 11 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 2 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 9 ατόμων. Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα του μιτοχονδρίου είναι ίση με 0.764, και η μέση νουκλεοτιδική ποικιλότητα ίση με 0.00984, για τους μιτοχονδριακούς τόπους, ενώ για τον πυρηνικούς 0.556 και 0.00042 ,αντίστοιχα Η ενδοειδική γενετική απόσταση αγγίζει μόλις το 1% στο μιτοχόνδριο και το 0.23% στον πυρήνα (Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, υπολογίστηκαν, ο αριθμός των απλοτύπων h , η απλοτυπική ποικιλότητα H_d και η νουκλεοτιδική ποικιλότητα P_i , για κάθε πληθυσμό και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και 3.5. Ο F_{ST} δείκτης

που κρίθηκε στατιστικά σημαντικός και κατέδειξε υψηλό ποσοστό διαφοροποίησης ήταν μεταξύ των πληθυσμών 1 και 2 (ΕΟ Άργους Τριπόλεως από Αχλαδόκαμπο προς Στενό και Στενό προς Τρίπολη 500m) στο μιτοχόνδριο (Πίνακας 3.8.).

C. parnassia

Στο είδος *C. parnassia*, διακρίθηκαν 10 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 14 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 7 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 15 ατόμων. Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα του μιτοχονδρίου είναι ίση με 0.945, και η μέση νουκλεοτιδική ποικιλότητα ίση με 0.03936, για τους μιτοχονδριακούς τόπους, ενώ για τον πυρηνικούς 0.781 και 0.00243, αντίστοιχα Η ενδοειδική γενετική απόσταση αγγίζει μόλις το 3.9% στο μιτοχόνδριο και το 0.26% στον πυρήνα (Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, υπολογίστηκαν, ο αριθμός των απλοτύπων h, η απλοτυπική ποικιλότητα Hd και η νουκλεοτιδική ποικιλότητα Pi, για κάθε πληθυσμό και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και 3.5. Ο στατιστικά σημαντικός F ST δείκτης με το υψηλότερο ποσοστό διαφοροποίησης εντοπίστηκε μεταξύ των πληθυσμών 2 και 4 (Γραβιά προς Άμφισσα 27,5 km & Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km) στο πυρηνικό σετ δεδομένων (Πίνακας 3.9.).

C. eucineteta

Στο είδος *C. eucineteta*, διακρίθηκαν 4 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 7 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 4 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 10 ατόμων. Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα του μιτοχονδρίου είναι ίση με 0.714, και η μέση νουκλεοτιδική ποικιλότητα ίση με 0.04766, για τους μιτοχονδριακούς τόπους, ενώ για τον πυρηνικούς 0.781 και 0.00243, αντίστοιχα Η ενδοειδική γενετική απόσταση αγγίζει μόλις το 1% στο μιτοχόνδριο και το 0.23% στον πυρήνα (Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, υπολογίστηκαν, ο αριθμός των απλοτύπων h, η απλοτυπική ποικιλότητα Hd και η νουκλεοτιδική ποικιλότητα Pi, για κάθε πληθυσμό και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και 3.5. Οι κατά ζεύγη F ST δείκτες δεν κρίθηκαν στατιστικά σημαντικοί (Πίνακας 3.10).

C. helenae

Στο είδος *C. helenae*, διακρίθηκαν 4 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 20 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 11 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 18 ατόμων. Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα του μιτοχονδρίου είναι ίση με 0.437, και η μέση νουκλεοτιδική ποικιλότητα ίση με 0.00677, για τους μιτοχονδριακούς τόπους, ενώ για τον πυρηνικούς 0.856 και 0.00199, αντίστοιχα Η ενδοειδική γενετική απόσταση αγγίζει μόλις το 0.7% στο μιτοχόνδριο και το 0.19% στον πυρήνα (Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, υπολογίστηκαν, ο αριθμός των απλοτύπων h, η απλοτυπική ποικιλότητα Hd και η νουκλεοτιδική ποικιλότητα Pi, για κάθε πληθυσμό και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και 3.5. . Ο F ST δείκτης

με το υψηλότερο και συνάμα στατιστικά σημαντικό ποσοστό διαφοροποίησης εντοπίστηκε μεταξύ των πληθυσμών 1 και 2 (Τρίπολη προς Λεβίδι 2km & Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km) στο μιτοχονδριακό σετ δεδομένων (**Πίνακας 3.11.**).

3.6 Αποτελέσματα Δημογραφικών Αναλύσεων-Δείκτες Ουδετερότητας-EBSPs

Η δημογραφική ιστορία των πληθυσμών των ειδών του γένους *Codringtonia*, εκτιμήθηκε με τους δείκτες ουδετερότητας Tajima's D, Fu's Fs και Rozas R² χρησιμοποιώντας ξεχωριστά τα δυο σύνολα μιτοχονδριακών και πυρηνικών τόπων (**Πίνακας 3.5.** και **3.4.** αντίστοιχα). Επιπλέον, για τη μελέτη της ιστορικής δημογραφίας των πληθυσμών των ειδών του γένους χρησιμοποιήθηκαν τα Extended Bayesian Skyline Plots (EBSPs) και στους πέντε γενετικούς τόπους, ενοποιώντας όλους τους πληθυσμούς ανά είδος (**Εικόνα 3.4.(α-ζ)**).

Οι τιμές των δεικτών ουδετερότητας δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Ωστόσο, υπήρχαν μερικές εξαιρέσεις, με κάποιους δείκτες σε ελάχιστους πληθυσμούς να είναι στατιστικά σημαντικοί. Συγκεκριμένα, ο δείκτης Fu's Fs εμφάνισε στατιστικά σημαντική αρνητική τιμή στο μοναδικό πληθυσμό του είδους *C. gittenbergeri* στο μιτοχονδριακό σετ δεδομένων (**Πίνακας 3.4**). Επιπλέον, στο μιτοχονδριακό σετ δεδομένων, το είδος *C. helenae* εμφάνισε στατιστικά σημαντική αρνητική τιμή για το δείκτη Tajima's D για τον πληθυσμό στην κορυφή του όρους Μαίναλου αλλά και στο σύνολό του (**Πίνακας 3.4**). Ακόμη, το συγκεκριμένο είδος, στο πυρηνικό σετ δεδομένων (**Πίνακας 3.5**), παρουσίασε στατιστικά σημαντικές θετικές τιμές για το δείκτη R² στους πληθυσμούς στην κορυφή του όρους Μαίναλου και στις Τρίπολης προς Λεβίδι, ενώ στο σύνολό του παρουσίασε στατιστικά σημαντικές αρνητικές τιμές στους δείκτες Fu's Fs και Tajima's D.

Για τα διαγράμματα των EBSPs (**Εικόνα 3.4.(α-ζ)**), ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ανα είδος, αναγράφεται παρακάτω εντός της παρένθεσης: *C.codringtonii* (6), *C. elisabethae* (9), *C. eucineta* (4), *C. gittenbergeri* (7), *C. helenae* (18), *C. intusplicata* (25), *C. parnassia* (12). Στο *C.codringtonii* το πληθυσμιακό μέγεθος μοιάζει να είναι σταθερό. Τα *C. eucineta*, *C. helenae*, *C. elisabethae* και *C. parnassia* εμφανίζουν ύστερα από μια ξαφνική πτωτική πορεία μια αυξητική πληθυσμιακή τάση στο πρόσφατο παρελθόν/παρόν. Στο *C. gittenbergeri* το πληθυσμιακό μέγεθος μοιάζει να είναι σταθερό με ήπια αυξητική πορεία στο πρόσφατο παρελθόν/παρόν, ενώ αντίστοιχα το *C. intusplicata* το πληθυσμιακό μέγεθος μοιάζει να είναι σταθερό με ήπια αυξητική πορεία στο πρόσφατο παρελθόν/παρόν.

Πίνακας 3.4. Εκτίμηση γενετικού πολυμορφισμού και δημογραφικής ιστορίας των πληθυσμών ανά είδος του γένους *Codringtonia*, στο ενοποιημένο σετ δεδομένων και των τριών **μιτοχονδριακών** γονιδίων, όπου h ο αριθμός των απλοτύπων, N_{ind} ο αριθμός των ατόμων κάθε πληθυσμού, H_d η απλοτυπική ποικιλότητα και P_i η νουκλεοτιδική ποικιλότητα, ενώ σε παρένθεση αναφέρεται η τυπική απόκλιση (SD). Οι αριθμοί με έντονα μαύρα γράμματα υποδηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές τιμές.

Είδος	Πληθυσμός	N_{ind}	Δείκτες Γενετικού Πολυμορφισμού			Δείκτες Ουδετερότητας		
			h	H_d (SD)	P_i (SD)	Fu's FS	Ramos-Onsins & Rozas R^2	Tajima's D
<i>C.intusplicata</i>	Κορυφή ορ. Μαινάλου	3	2	0.667 (0.314)	0.02990 (0.03689)	6.999 (NS)	0.4714 (NS)	*
	Μαίναλο 1053m	5	4	0.900 (0.161)	0.00399 (0.00087)	0.726 (NS)	0.2027 (NS)	0.70883 (NS)
	Μαίναλο 1455m	5	4	0.900 (0.161)	0.00327 (0.00327)	0.357 (NS)	0.2500 (NS)	-0.29817 (NS)
	Μαίναλο 1633m	6	1	0	0	Np	Np	Np
	Διακοπτό	2	2	1.000 (0.500)	0.00078 (0.00039)	n.a.	0.5000 (NS)	*
	Διακοπτό προς Καλάβρυτα	3	3	1.000 (0.272)	0.00412 (0.00171)	n.a.	0.3864 (NS)	*
	Πλανητέρο, Χελμός	3	3	1.000 (0.272)	0.00412 (0.00171)	n.a.	0.3680 (NS)	*
	Σύνολο	27	15	0.906 (0.045)	0.03689 (0.03689)	5.587 (NS)	0.1502 (NS)	0.59490 (NS)
<i>C. codringtonii</i>	Καλιθέα	3	1	0	0	Np	Np	Np
	Ροδιά	4	4	1.000 (0.177)	0.00773 (0.00174)	0.232 (NS)	0.1422 (NS)	-0.67840 (NS)
	Ναβαρίνο	2	2	1.000 (0.500)	0.00390 (0.00195)	1.792 (NS)	0.1616 (NS)	*
	Άγ. Πέτρος προς Μονή Μαλεβής	1	1	-	-	**	**	*
	Μονή Χρυσοκελαρίας	1	1	-	-	**	**	*
	Μαθιάς	1	1	-	-	**	**	*
	Άγιος Πέτρος	1	1	-	-	**	**	*

	Σύνολο	13	10	0.923(0.069)	0.01752 (0.00363)	0.374 (NS)	0.1616 (NS)	-0.70803(NS)
<i>C. gittenbergeri</i>	Άγ Ιωάννης προς Μελιγού	13	6	0.769(0.103)	0.00115(0.00020)	-2.205	0.1647 (NS)	0.18442 (NS)
<i>C. elisabethae</i>	Στενό προς Τρίτολη 500m	5	3	0.700 (0.218)	0.01073 (0.00311)	4.879 (NS)	0.2683 (NS)	1.51919 (NS)
	ΕΟ Άργους Τριπόλεως από Αχλαδόκαμπο, προς Στενό	5	1	0	0	Np	Np	Np
	Αχλαδόκαμπος προς Άργους 5km	1	-	-	-	**	**	*
	Σύνολο	11	5	0.764 (0.764)	0.00984 (0.00223)	5.213 (NS)	0.2142 (NS)	1.33770 (NS)
<i>C. parnassia</i>	Γκιώνα-Παλαιοβούνι	3	2	0.667 (0.314)	0.00050 (0.00023)	0.201 (NS)	0.4714 (NS)	*
	Γραβιά προς Άμφισσα 27,5 km	9	6	0.889 (0.091)	0.00401 (0.00083)	-0.053 (NS)	0.1666 (NS)	0.10544 (NS)
	Σκαμνός, 1,2 km προς Θερμοπύλες	1	-	-	-	*	**	*
	Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km	1	-	-	-	*	**	*
	Σύνολο	14	10	0.945 (0.045)	0.03936 (0.01808)	3.378(NS)	0.1310(NS)	-0.70299(NS)
<i>C. eucineta</i>	Καλάβρυτα προς Λαγκοβούνι 6 km	1	-	-	-	n.a.	**	*
	Μυστράς	2	1	1.000 (0.500)	0.00488 (0.00244)	1.946 (NS)	0.2089 (NS)	*
	Παναχαϊκό, 1800m υψ.	4	1	0	0	**	**	*
	Σύνολο	7	4	0.714 (0.181)	0.04766 (0.01111)	9.446 (NS)	0.2089 (NS)	0.44212 (NS)
<i>C. helenae</i>	Κορυφή όρους Μαινάλου	11	2	0.182 (0.144)	0.00932 (0.00736)	12.601 (NS)	0.2875 (NS)	-2.21738
	Τρίτολη προς Λεβίδι 2km	5	2	0.400 (0.237)	0.00031(0.00018)	-0.81650 (NS)	0.4000 (NS)	-0.81650 (NS)
	Τρίτολη προς Μαίναλο 1,5 km	4	3	0.833 (0.222)	0.00282 (0.00076)	1.285 (NS)	0.2486 (NS)	1.32331(NS)
	Σύνολο	20	4	0.437(0.130)	0.00677(0.00443)	8.477 (NS)	0.1918 (NS)	-2.33407

n.a., not available, NS: not significant, *Four or more sequences are need to compute Tajima's D statistics, ** At least two or more sequences are need to compute Ramos-Onsins & Rozas R² and Fu's FS, Np: No polymorphism

Πίνακας 3.5. Εκτίμηση γενετικού πολυμορφισμού και δημογραφικής ιστορίας των πληθυσμών ανά είδος του γένους *Codringtonia*, στο ενοποιημένο σετ δεδομένων και των τριών *πυρηγικών* γονιδίων, όπου h ο αριθμός των απλοτύπων, N_{ind} ο αριθμός των ατόμων κάθε πληθυσμού, H_d η απλοτυπική ποικιλότητα και P_i η νουκλεοτιδική ποικιλότητα, ενώ σε παρένθεση αναφέρεται η τυπική απόκλιση (SD). Οι αριθμοί με έντονα μαύρα γράμματα υποδηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές τιμές.

Είδος	Πληθυσμός	N_{ind}	Δείκτες Γενετικού Πολυμορφισμού			Δείκτες Ουδετερότητας		
			h	H_d (SD)	P_i (SD)	Fu's FS	Ramos-Onsins & Rozas R^2	Tajima's D
<i>C. intusplicata</i>	Κορυφή ορ. Μαινάλου	2	2	1.000 (0.500)	0.00317 (0.00158)	1.386 (NS)	0.5000 (NS)	*
	Μαίναλο 1053m	4	3	0.833 (0.222)	0.00093 (0.00029)	-0.658 (NS)	0.2732 (NS)	0.59158 (NS)
	Μαίναλο 1455m	5	3	0.700 (0.218)	0.00142 (0.00063)	0.276 (NS)	0.2915 (NS)	-1.09380 (NS)
	Μαίναλο 1633m	6	1	0	0	Np	Np	Np
	Διακοπτό	2	1	0	0	Np	Np	Np
	Διακοπτό προς Καλάβρυτα	3	2	0.667 (0.314)	0.00059 (0.00028)	0.201 (NS)	0.4714 (NS)	*
	Πλανητέρο, Χελμός	3	1	0	0	Np	Np	Np
Σύνολο	25	9	0.743 (0.080)	0.00176 (0.00042)	-2.876 (NS)	0.0687	-1.70471 (NS)	
<i>C. codringtonii</i>	Ροδιά	4	1	0	0	Np	Np	Np
	Ναβαρίνο	1	-	-	-	**	**	*
	Μαθιάς	1	-	-	-	**	**	*
	Σύνολο	6	3	0.600 (0.215)	0.00184 (0.00184)	0.893 (NS)	0.2274 (NS)	-0.82582 (NS)
<i>C. gittenbergeri</i>	Άγ Ιωάννης προς Μελιγού	7	2	0.286 (0.196)	0.00023 (0.00016)	-0.095 (NS)	0.3499 (NS)	-1.00623 (NS)
<i>C. elisabethae</i>	Στενό προς Τρίπολη 500m	3	2	0.667 (0.314)	0.00050 (0.00023)	0.201 (NS)	0.4714 (NS)	*
	ΕΟ Άργους Τριπόλεως από Αχλαδόκαμπο, προς Στενό	5	2	0.600 (0.175)	0.00046 (0.00013)	0.626 (NS)	0.3000 (NS)	1.22474 (NS)
	Αχλαδόκαμπος προς Άργος 5km	1	-	-	-	-0.94297	**	*

	Σύνολο	9	2	0.556 (0.090)	0.00042 (0.00007)	1.015 (NS)	0.2778 (NS)	1.40117 (NS)
<i>C. parnassia</i>	Γκιώνα Ευρυτανίας	1	-	-	-	**	**	*
	Γκιώνα-Παλαιοβούνι	3	2	0.667 (0.314)	0.00051 (0.00024)	0.201 (NS)	0.4714 (NS)	*
	Γραβιά προς Άμφισσα 27,5 km	7	2	0.286 (0.196)	0.00043 (0.00030)	0.856 (NS)	0.3499 (NS)	-1.23716 (NS)
	Σκαμνός, 1,2 km προς Θερμοπύλες	2	2	1.000 (0.500)	0.00308 (0.00154)	1.386 (NS)	0.5000 (NS)	*
	Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km	2	2	1.000 (0.500)	0.00303 (0.00152)	1.386 (NS)	0.5000 (NS)	*
	Σύνολο	15	7	0.781 (0.102)	0.00243 (0.00058)	-0.742 (NS)	0.1525 (NS)	0.08343 (NS)
<i>C. eucinetæ</i>	Καλάβρυτα => Λαγκοβούνι 6km	1	-	-	-	**	**	*
	Όρος Λάμπεια	1	-	-	-	**	**	*
	Πύργιχος Μάνης	2	1	0	0	Np	Np	Np
	Παναχαϊκό, 1800m υψ.	6	4	0.800 (0.172)	0.00099 (0.00033)	-1.252 (NS)	0.1704 (NS)	-1.29503 (NS)
	Σύνολο	10	4	0.571 (0.119)	0.00045 (0.00009)	0.856 (NS)	0.2857 (NS)	-0.94297 (NS)
<i>C. helenæ</i>	Κορυφή όρους Μαινάλου	9	7	0.917 (0.092)	0.00221 (0.00060)	-2.711 (NS)?	0.1107	-1.69754 (NS)
	Τρίπολη προς Λεβίδι 2km	5	4	0.900 (0.161)	0.00102 (0.00027)	-1.938 (NS)?	0.1633	-1.04849 (NS)
	Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km	4	3	0.833 (0.222)	0.00169 (0.00050)	0.251 (NS)	0.2234 (NS)	-0.06501 (NS)
	Σύνολο	18	11	0.856 (0.079)	0.00199 (0.00044)	-5.833	0.0698 (NS)	-1.90824

n.a., not available, NS: not significant, *Four or more sequences are need to compute Tajima's D statistics, ** At least two or more sequences are need to compute Ramos-Onsins & Rozas R² and Fu's FS, Np: No polymorphism

Πίνακας 3.6. Τιμές της γενετικής διαφοροποίησης F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών του *C. intusplicata*. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά. Πάνω από τη διαγώνιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενοποιημένου σετ δεδομένων των πυρηνικών γονιδίων και από κάτω, του μιτοχονδριακού αντίστοιχα.

<i>C. intusplicata</i>								
Πληθυσμοί	Κωδικός πληθυσμού	1	2	3	4	5	6	7
Κορυφή ορ. Μαινάλου	1	0	0.07848	0.24238	0.53846	0.18519	0.30031	0.25
Μαίναλο 1053m	2	0.64333	0	-0.0198	0.12385	0.07583	0.08248	-0.0119
Μαίναλο 1455m	3	0.63905	0.08759	0	0.04285	-0.13633	-0.27585	-0.10368
Μαίναλο 1633m	4	0.25	0.91176	0.9196	0	1	0.26632	1
Διακοπτό	5	0.72261	0.94037	0.94813	1	0	-0.11496	1
Διακοπτό προς Καλάβρυτα	6	0.7512	0.92911	0.93541	0.98162	0.54717	0	0
Πλανητέρο, Χελμός	7	0.74238	0.92251	0.92896	0.97699	0.85472	0.79442	0

Πίνακας 3.7. Τιμές της γενετικής διαφοροποίησης F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών του *C. codringtonii*. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά. Πάνω από τη διαγώνιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενοποιημένου σετ δεδομένων των πυρηνικών γονιδίων και από κάτω, του μιτοχονδριακού αντίστοιχα.

<i>C. codringtonii</i>								
Πληθυσμοί	Κωδικός πληθυσμού	1	2	3	4	5	6	7
Καλιθέα	1	0	-	-	-	-	-	-
Ροδιά	2	0.76136	0	-	-	-	1	-
Ναβαρίνο	3	0.94828	0.57168	0	-	1	1	-
Άγ. Πέτρος προς Μονή Μαλεβής	4	0	0.5942	0.84615	0	-	-	-
Μονή Χρυσοκελαρίας	5	1	0.82716	0.9469	1	0	-	-
Μαθιάς	6	1	0.45098	0.71429	1	1	0	-
Άγιος Πέτρος	7	1	0.57576	0.84615	1	1	1	0

Πίνακας 3.8. Τιμές της γενετικής διαφοροποίησης F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών του *C. elisabethae*. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά. Πάνω από τη διαγώνιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενοποιημένου σετ δεδομένων των πυρηνικών γονιδίων και από κάτω, του μιτοχονδριακού αντίστοιχα.

<i>C. elisabethae</i>				
Πληθυσμοί	Κωδικός πληθυσμού	1	2	3
ΕΟ Άργους Τριπόλεως από Αχλαδόκαμπο, προς Στενό	1	0	-0.17978	-0.5
Στενό προς Τρίπολη 500m	2	0.63889	0	0
Αχλαδόκαμπος προς Άργος 5km	3	1	0.16129	0

Πίνακας 3.9. Τιμές της γενετικής διαφοροποίησης F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών του *C. parnassia*. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά. Πάνω από τη διαγώνιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενοποιημένου σετ δεδομένων των πυρηνικών γονιδίων και από κάτω, του μιτοχονδριακού αντίστοιχα.

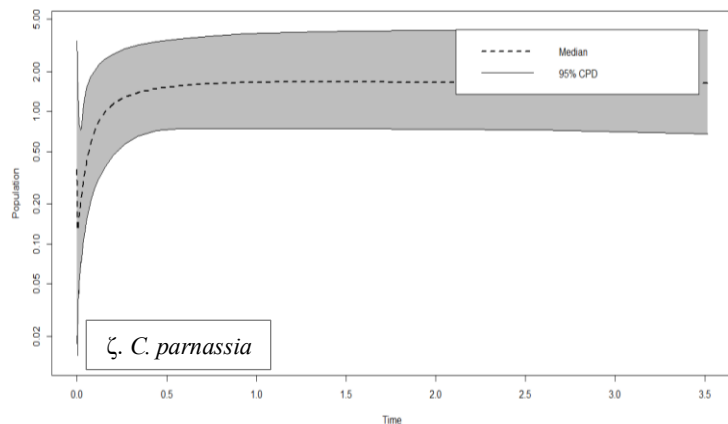
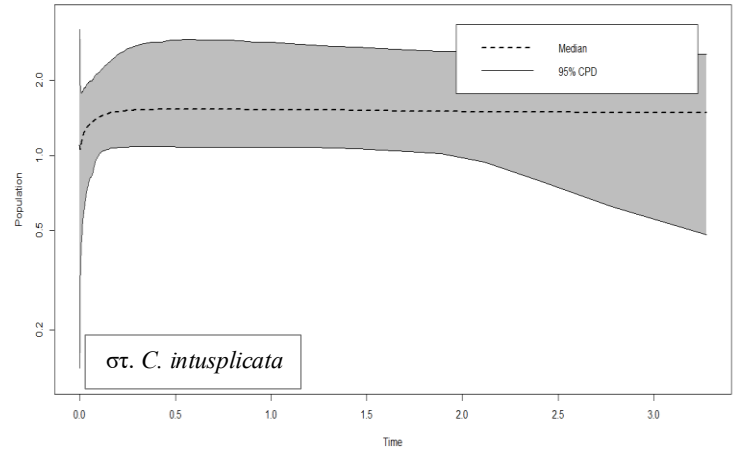
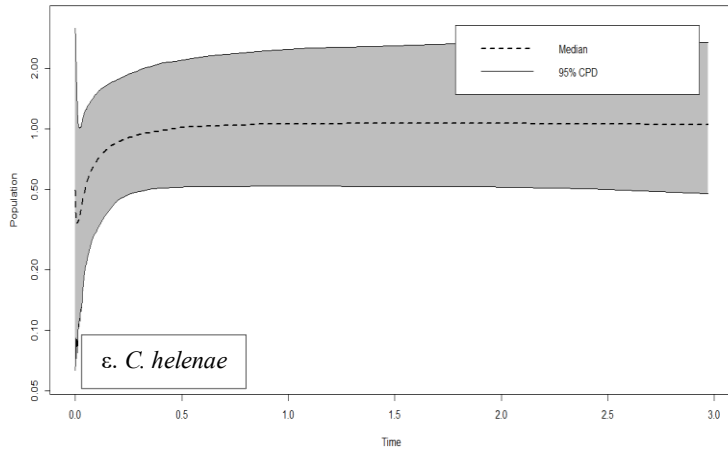
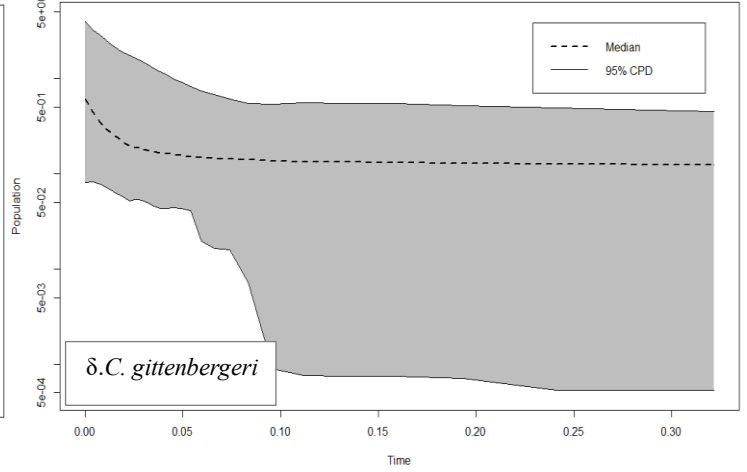
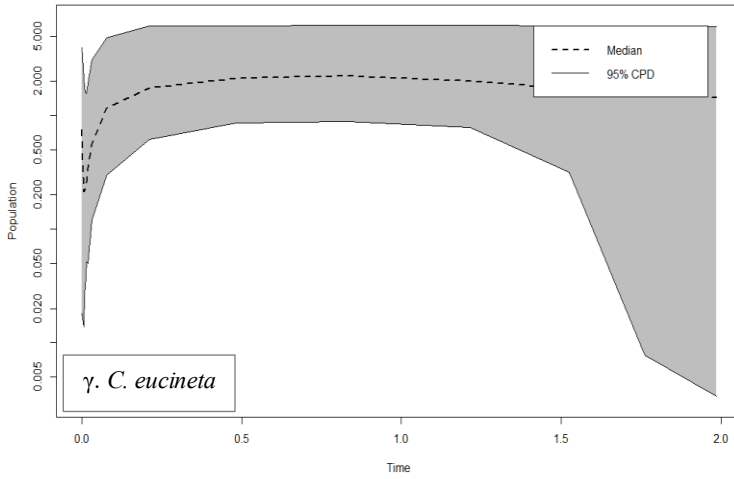
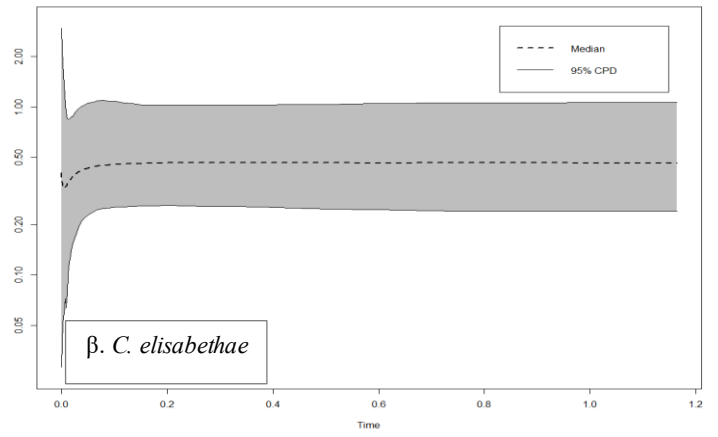
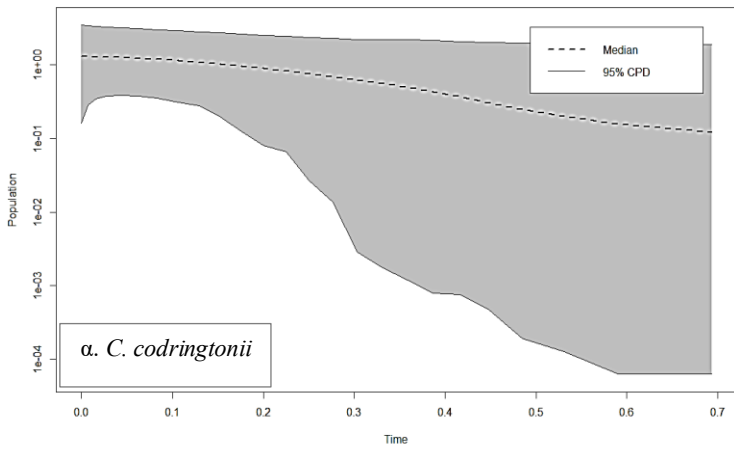
<i>C. parnassia</i>						
Πληθυσμοί	Κωδικός πληθυσμού	1	2	3	4	0
Γκιάνα-Παλαιοβούνι	1	0	0.63992	0.47797	0.71698	0.60000
Γραβιά προς Αμφισσα 27,5 km	2	0.3555	0	0.68872	0.80904	-1
Σκαμνός, 1,2 km προς Θερμοπύλες	3	0.99511	0.9671	0	-0.10345	-0.51515
Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km	4	0.99518	0.96757	1	0	0.17647
Γκιάνα Ευρυτανίας	5	-	-	-	-	0

Πίνακας 3.10. Τιμές της γενετικής διαφοροποίησης F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών του *C. eucineteta*. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά. Πάνω από τη διαγώνιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενοποιημένου σετ δεδομένων των πυρηνικών γονιδίων και από κάτω, του μιτοχονδριακού αντίστοιχα.

<i>C. eucineteta</i>						
Πληθυσμοί	Κωδικός πληθυσμού	1	2	3	4	5
Καλάβρυτα προς Λαγκοβούνι 6 km	1	0	-	-0.21695	0	1
Μυστράς	2	0.92391	0	-	-	-
Παναχαϊκό, 1800m υψ.	3	1	0.98298	0	-0.21695	0.15695
Όρος Λάμπεια	4	-	-	-	0	1
Πύρριχος Μάνης	5	-	-	-	-	0

Πίνακας 3.11. Τιμές της γενετικής διαφοροποίησης F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών του *C. helenae*. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά. Πάνω από τη διαγώνιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενοποιημένου σετ δεδομένων των πυρηνικών γονιδίων και από κάτω, του μιτοχονδριακού αντίστοιχα.

<i>C. helenae</i>				
Πληθυσμοί	Κωδικός πληθυσμού	1	2	3
Τρίπολη προς Λεβίδι 2km	1	0	-0.01968	0.10951
Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km	2	0.78102	0	0.15355
Κορυφή όρους Μαινάλου	3	-0.08911	0.31283	0

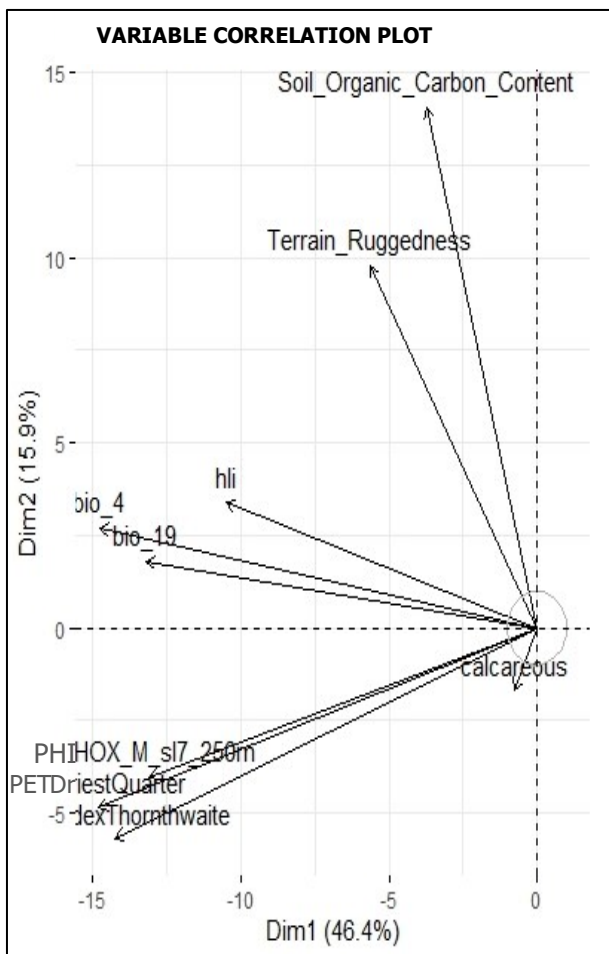


Εικόνα 3.4. Παρουσίαση των Extended Bayesian Skyline Plots για το πλήρες σετ δεδομένων (πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια) για κάθε είδος (από το α ως ζ) του γένους *Codringtonia*. Η διακεκομμένη μαύρη γραμμή δείχνει τη διάμεσο (Median), ενώ η ακρίζα περιοχή (Central Posterior Density-CPD) αντιπροσωπεύει ανάλογο του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει το χρόνο (σε εκατομμύρια χρόνια πριν από το παρόν) και ο άξονας y εκφράζει το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος (σε λογαριθμική κλίμακα). Οι ημερομηνίες βαθμονομήθηκαν σύμφωνα με το ρυθμό υποκατάστασης των μιτοχονδριακών γονιδίων (Κοτσακιάζη, 2013).

3.7 Αποτελέσματα Μελέτης Επικάλυψη Θώκων (Niche Overlap) των ειδών του γένους *Codringtonia*

Οι πρώτες δύο κύριες συνιστώσες (Dim1 και Dim2) εξηγούν το 62.3% της διασποράς των αρχικών δεδομένων που σχετίζονται με τη ποικιλότητα των θώκων (niche variation) (46.4 και 15.9 % αντίστοιχα) (Εικόνα 3.5). Η πρώτη κύρια συνιστώσα επηρεάστηκε κυρίως από τις εποχικές διακυμάνσεις του κλίματος (εποχικότητα θερμοκρασίας- bio_4, βροχοπτώσεις-bio_19, εξατμισοδιαπνοή- PETDriestQuarter, ξηρασία- aridityIndexThornthwaite, θερμικό φορτίο- hli) και το pH του εδάφους (PHIHOX_M_sl7_250m). Η δεύτερη κύρια συνιστώσα επηρεάστηκε κυρίως από τη σύσταση (οργανικό περιεχόμενο- Soil_Organic_Carbon_Content) και λιγότερο από το ανάγλυφο του εδάφους (calcareous). Η ποιότητα εκπροσώπησης των μεταβλητών από τις κύριες συνιστώσες ανιχνεύτηκε με τη χρήση του \cos^2 (τετράγωνο του συνημίτονου, τετραγωνικές συντεταγμένες). Ένα υψηλό \cos^2 υποδεικνύει μια καλή αναπαράσταση της μεταβλητής στην κύρια συνιστώσα. Συγκεκριμένα, οι δύο πρώτες μεταβλητές που συνεισέφεραν περισσότερο στην Dim1 και αντίστοιχα στην Dim2 παρουσιάζονται στην Εικόνα του παραρτήματος

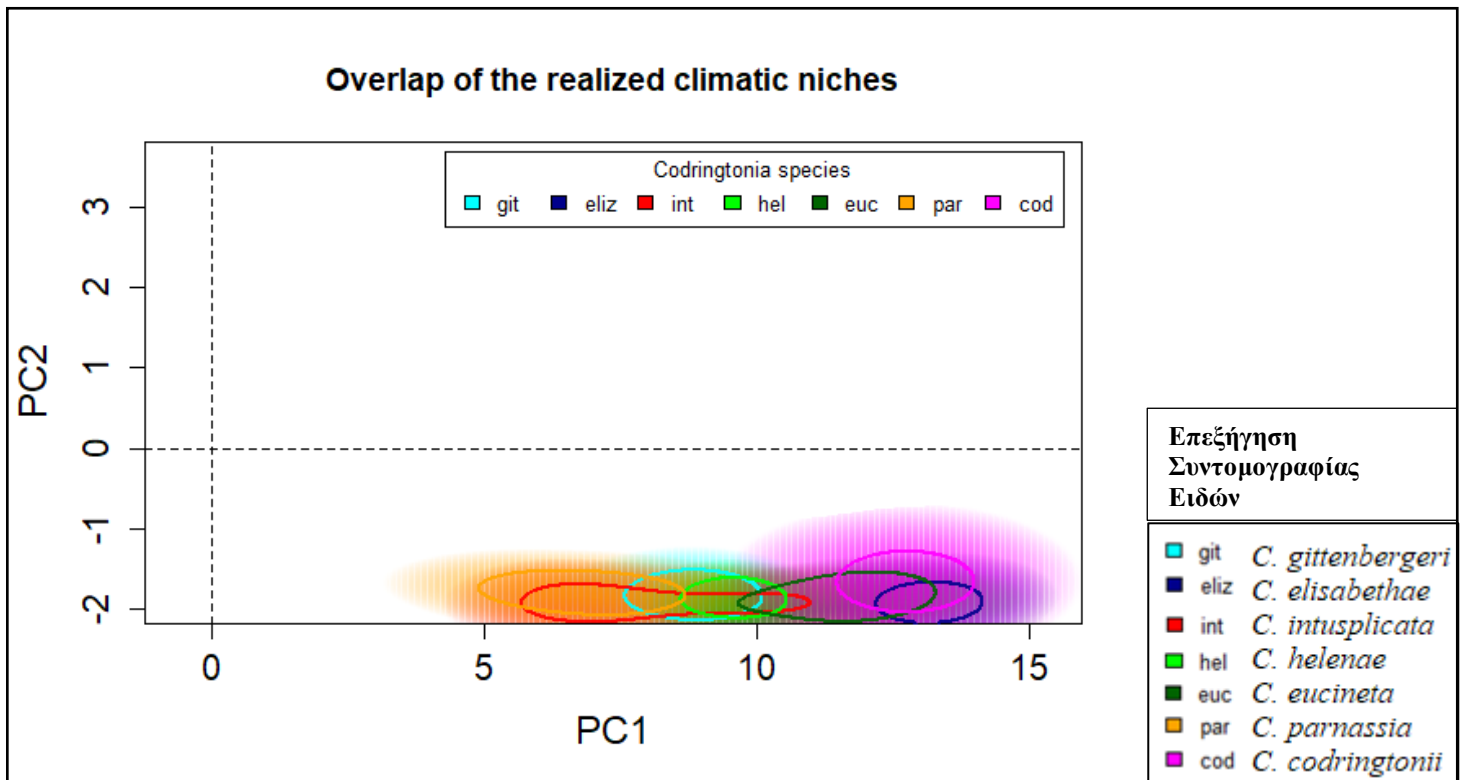
Εικόνα Π3.



Εικόνα 3.5. Γράφημα συσχέτισης μεταβλητών (variable correlation plot) το οποίο απεικονίζει τις σχέσεις αναμεσαξύ όλων των περιβαλλοντικών μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με την επιρροή που ασκούν στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (Dim1, Dim2).

Τα περισσότερα ζεύγη ειδών εμφάνισαν μικρή έως μέτρια αλληλοεπικάλυψη θώκου. Η μεγαλύτερη τιμή του δείκτη D του Schoener, εντοπίστηκε ανάμεσα στα είδη *C. intusplicata* και *C. gittenbergeri* (0.72) κι η μικρότερη

ανάμεσα στα *C. elisabethae* και *C. parnassia* (0.09). Η μέση τιμή του δείκτη D ήταν 0.40. Επιπλέον, οι οικολογικοί θώκοι των ειδών φαίνεται να συγκλίνουν. Ακόμη, το μόνο ζεύγος ειδών που εμφάνισε στατιστικά σημαντική ομοιότητα ως προς την ταύτιση των θώκων τους στις γεωγραφικές παραμέτρους, ήταν το *C. intusplicata* στο *C. gittenbergeri*. Τέλος, οι δοκιμές του Student test έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση για τα περισσότερα ζεύγη ειδών στον άξονα της PC2, ενώ σε αντίθεση με τον άξονα PC1 (Οι PC1 & PC2 δεν είναι διαφορετικές από τα Dim1 & Dim2). Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.12. Επίσης, στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζεται η Ανάλυση των Κυρίων Συνιστωσών των περιβαλλοντικών δεδομένων σε συνάρτηση με όλο το εύρος της κατανομής και των εφτά ειδών του γένους, οπτικοποιώντας την μεταξύ τους αλληλοεπικάλυψη με βάση το δείκτη D του Schoener.



Εικόνα 3.6. Αλληλοεπικάλυψη θώκων μεταξύ των ειδών του γένους *Codringtonia* κατά μήκος των δύο πρώτων κυρίων συνιστωσών PCA (PC1 και PC2) των περιβαλλοντικών μεταβλητών στις περιοχές κατανομής τους έτσι όπως προέκυψε σύμφωνα με το δείκτη D του Schoener. Κάθε είδος εκπροσωπείται με διαφορετικό χρώμα. Κάθε κύκλος εμπεριέχει το 90% της επικάλυψης του θώκου, ενώ το υπόλοιπο 10% των σημείων επικάλυψης του κάθε είδους χρωματίζεται αχνά (εκτός του σκληρού πυρήνα) με το αντίστοιχο χρώμα εκπροσώπησης.

Πίνακας 3.12. Σύγκριση οικολογικών θώκων των χερσαίων σαλιγκαριών του γένους *Codringtonia*.

Taxon		NO	Niche equivalency	Niche similarity		t-test**	
a	b			a b	b a	PC1	PC2
<i>C. intusplicata</i>	<i>C. helenae</i>	0.34	συγκλίνουν	n.s.	n.s.		s.
	<i>C. gittenbergeri</i>	0.72		similar	n.s.		
	<i>C. elisabethae</i>	0.27		n.s.	n.s.		s.
	<i>C. codringtonii</i>	0.40		n.s.	n.s.		s.
	<i>C. parnassia</i>	0.65		n.s.	n.s.	s.	s.
	<i>C. eucineta</i>	0.57		n.s.	n.s.	s.	s.
<i>C. helenae</i>	<i>C. gittenbergeri</i>	0.29		n.s.	n.s.		
	<i>C. elisabethae</i>	0.53		n.s.	n.s.		
	<i>C. codringtonii</i>	0.23		n.s.	n.s.		
	<i>C. parnassia</i>	0.15		n.s.	n.s.	s.	s.
	<i>C. eucineta</i>	0.46		n.s.	n.s.	s.	
<i>C. gittenbergeri</i>	<i>C. elisabethae</i>	0.12		n.s.	n.s.		s.
	<i>C. codringtonii</i>	0.28		n.s.	n.s.		s.
	<i>C. parnassia</i>	0.61		n.s.	n.s.	s.	
	<i>C. eucineta</i>	0.42		n.s.	n.s.		s.
<i>C. elisabethae</i>	<i>C. codringtonii</i>	0.48		n.s.	n.s.		
	<i>C. parnassia</i>	0.09		n.s.	n.s.	s.	s.
	<i>C. eucineta</i>	0.53		n.s.	n.s.	s.	
<i>C. codringtonii</i>	<i>C. parnassia</i>	0.21		n.s.	n.s.		s.
	<i>C. eucineta</i>	0.69		n.s.	n.s.		
<i>C. parnassia</i>	<i>C. eucineta</i>	0.32	n.s.	n.s.		s.	

NO (Niche Overlap): τιμές αλληλοεπικάλυψης θώκων με βάση το δείκτη D του Schoener, ο οποίος κυμαίνεται από 0 (χωρίς επικάλυψη) έως 1 (πλήρης επικάλυψη)

Niche equivalency: σύγκλιση θώκου

Niche similarity: ομοιότητα θώκου (του a προς τον b, κι αντίστροφα του b προς τον a)

ns: μη στατιστικά σημαντικό p-value (ns: insignificant p-value)

Παρόμοιοι (similar): οι θώκοι τους είναι περισσότερο παρόμοιοι από ότι θα αναμενόταν λόγω τύχης

Διαφορετικοί (different): οι θώκοι διαφέρουν και έχουν αποκλίνει.

**Οι οικολογικές θώκοι διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$) ή αποκλίνουν σύμφωνα με το Student t-test (δοκιμή περιβαλλοντικής απόκλισης σύμφωνα με τους McCormack et al., 2010).

PC=Κύρια Συνιστώσα

Κεφάλαιο 4ο-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συζήτηση οργανώνεται σε τέσσερις άξονες σε αντιστοίχιση με τους στόχους που τέθηκαν στην αρχή της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής.

4.1 Διερεύνησης της γενετικής ποικιλότητας και δομής των πληθυσμών των ειδών μέσω εκτίμησης γενετικών αποστάσεων και γενετικής διαφοροποίησης

Η γενετική ποικιλότητα, αποτελεί το μέρος της ποικιλομορφίας των οργανισμών που κληρονομείται στην επόμενη γενιά και έχει δυο συνιστώσες: τη γενετική ποικιλότητα στο εσωτερικό ενός πληθυσμού και τη γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς, η οποία μπορεί να επεκταθεί και σε επίπεδο ειδών. Ως εκ τούτου, εκτός από αυτό που περιγράφει η γενετική ποικιλότητα εμπεριέχει και τα μοτίβα κατανομής αυτής της ποικιλομορφίας που διαμορφώνουν εν τέλει τη γενετική δομή των πληθυσμών.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών των επτά ειδών του γένους *Codringtonia* τόσο σε ένδο και δια πληθυσμιακό επίπεδο, όσο και σε διαειδικό. Τα επίπεδα της γενετικής διαφοροποίησης στο ενοποιημένο σετ δεδομένων των τριών μιτοχονδριακών γονιδίων του γένους *Codringtonia*, κυρίως σε διαειδικό αλλά και ενδοειδικό επίπεδο είναι ιδιαίτερα υψηλά (**Πίνακας 3.1**). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αυτά στο διδακτορικό της Κοτσακίτζη (2013). Αυτή η αυξημένη μιτοχονδριακή διαφοροποίηση απαντάται συνολικά σε διάφορα γένη γαστερόποδων (Parmakelis, 2003; Parmakelis & Mylonas, 2004; Johnson et al., 2010). Συγκρίνοντας μάλιστα άλλα γένη χερσαίων βραχόβιων σαλιγκαριών, το *Codringtonia* κυμαίνεται περίπου στα ίδια επίπεδα με το *Iberus* (Elejalde, 2008). Σε ενδοειδικό επίπεδο, εμφανίζει μικρότερη γενετική διαφοροποίηση σε σχέση με τα είδη του γένους *Orcula* (Harl et al., 2014). Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα της πυρηνικής διαφοροποίησης στο ενοποιημένο σετ των δεδομένων εμφανίζονται αρκετά χαμηλά όπως αναμενόταν, μιας και γενικά τα πυρηνικά γονίδια εμφανίζουν μικρότερο βαθμό γενετικής διαφοροποίησης (**Πίνακας 3.2**) και χρησιμοποιούνται για βαθιές φυλογενέσεις (Uit deWeerd et al., 2004). Αντίστοιχες τιμές πυρηνικών γενετικών αποστάσεων εμφανίζονται στο γένος χερσαίων σαλιγκαριών *Vertigo* (Jeffrey et al., 2009), ενώ ελαφρώς μεγαλύτερες στο γένος *Camaena* (Zhou et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, εστιάζοντας την προσοχή στο γένος μελέτης, το ζεύγος ειδών με τη μεγαλύτερη μιτοχονδριακή διαειδική γενετική διαφοροποίηση ήταν το *C. parnassia* με το *C. eucineta*, Αυτό επεξηγείται και γεωγραφικά, μιας και τα συγκεκριμένα είδη έχουν πολύ διαφορετικά πρότυπα κατανομής (**Εικόνα 1.1**): η *C. parnassia* απαντάται αποκλειστικά στη Στερεά Ελλάδα, ενώ η *C. eucineta* κυρίως στην Πελοπόννησο. Σε ότι αφορά τη μικρότερη μιτοχονδριακή αλλά και πυρηνική διαειδική γενετική διαφοροποίηση, εντοπίστηκε ανάμεσα στα *C. elisabethae* και *C. gittenbergeri*, τα οποία εκτείνονται σε αρκετά κοντινές περιοχές στην Πελοπόννησο, χωρίς ωστόσο να έχει εντοπιστεί για την ώρα κάποια περιοχή όπου τα είδη να είναι συμπάτρια.

Παρακάτω συζητούνται τα αποτελέσματα ανά είδος.

Για το είδος *C.intusplicata*, στο σύνολο των 27 αλληλουχιών εντοπίστηκαν 15 μοναδικοί μιτοχονδριακοί απλότυποι (**Πίνακας 3.4**), με τον πιο κοινό να εμφανίζεται ανάμεσα στον πληθυσμούς στην κορυφή του Μαινάλου (σε δύο από τα τρία άτομα) και σε όλα τα άτομα (έξι) του πληθυσμού του Μαινάλου στα 1633 μέτρα υψόμετρο.

Συνολικά, οι επτά πληθυσμοί του είδους εμφάνισαν αρκετά αυξημένη μιτοχονδριακή απλοτυπική ποικιλότητα. Αναλυτικότερα, ο πληθυσμός του Μαϊνάλου στα 1455 μέτρα υψόμετρο, εμφάνισε διαφορετικό απλότυπο ανά βράχο, υποδηλώνοντας πιθανότατα μια πιο αυξημένη εσωτερική πληθυσμιακή διάρθρωση (με μέγιστη γενετική απόσταση 0.57% ενδοπληθυσμιακά). Σε ότι αφορά το ενοποιημένο σετ των πυρηνικών γονιδίων βρέθηκαν 9 απλότυποι σε σύνολο 25 ατόμων (από τους ίδιους 7 πληθυσμούς που μελετήθηκαν στο μιτοχόνδριο) (Πίνακας 3.5), με τον πιο κοινό απλότυπο να εντοπίζεται στα άτομα των τριών πληθυσμών στα διαφορετικά υψόμετρα του όρους Μαϊνάλου, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης γεωγραφικής τους εγγύτητας. Ο δείκτης F_{ST} στις περιπτώσεις όπου βρέθηκε στατιστικά σημαντικός εμφάνισε υψηλό ποσοστό γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών, αφού οι τιμές τους στις περισσότερες περιπτώσεις προσέγγισαν τη μονάδα (Πίνακας 3.6.) (Wright, 1978). Συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί στο Μαϊνάλο στα 1633m και στο Διακοπτό προς Καλάβρυτα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση και στα δυο σετ γενετικών δεδομένων, κάτι που συνδέεται ενδεχομένως και με τη γεωγραφική τους απόσταση.

Στο είδος *C. codringtonii*, στο ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων διακρίθηκαν 13 μοναδικοί απλότυποι (Πίνακας 3.4) από το σύνολο των 10 αλληλουχιών από 7 τοποθεσίες, με τον πιο κοινό απλότυπο να εντοπίζεται ανάμεσα στα τρία άτομα του ίδιου πληθυσμού της Καλιθέας και σε ένα άτομο από τον Άγιο Πέτρο. Αντίστοιχα, έγινε εντοπισμός 3 απλοτύπων στο σετ των πυρηνικών γονιδίων σε σύνολο 6 ατόμων από τρεις διαφορετικές τοποθεσίες (ένας απλότυπος ανά τοποθεσία ή πληθυσμό). Άξιο αναφοράς αποτελεί η πιο έντονη “εσωτερική” δομή που αναδεικνύεται από τα μιτοχονδριακά δεδομένα στον πληθυσμό της Ροδιάς, όπου τα τέσσερα άτομα προέρχονται από διαφορετικό βράχο, και το κάθε ένα εμφανίζει κι από έναν διαφορετικό απλότυπο (με 0.8% ενδοπληθυσμιακή γενετική απόσταση). Σε ότι αφορά την έμμεση εκτίμηση της γονιδιακής ροής των πληθυσμών μέσα από την αξιολόγηση του δείκτη F_{ST} κατά ζεύγη, δεν κρίθηκαν στατιστικά σημαντικοί άρα και μη αξιολογήσιμοι (Πίνακας 3.7). Ένας βασικός λόγος για την έλλειψη στατιστικής ισχύς του συγκεκριμένου δείκτη είναι ο ανεπαρκής αριθμός δειγμάτων ανά πληθυσμό, μιας και σε πολλές περιπτώσεις υπήρχε ένα άτομο ανά τοποθεσία δειγματοληψίας. Συνολικά, γνωρίζουμε ότι η κατανομή του *C. codringtonii* είναι αρκετά περιορισμένη, οπότε θα περιμέναμε μικρότερη γενετική ποικιλότητα, κάτι που όμως δε φαίνεται να ισχύει. Επομένως, ίσως χρειαστεί να πραγματοποιηθεί εκ νέου ενδεδειγμένη δειγματοληψία. Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι δύο άτομα που ανήκουν στο συγκεκριμένο είδος, συλλέχθηκαν από την περιοχή εξάπλωσης του *C. gittenbergeri*. Επομένως, χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω αν το *C. codringtonii* έχει ευρύτερη κατανομή από αυτή που θεωρήθηκε αρχικά.

Στο είδος *C. gittenbergeri*, βρέθηκαν 6 μοναδικοί μιτοχονδριακοί απλότυποι από το σύνολο των 13 αλληλουχιών σε έναν μόνο πληθυσμό, με τον πιο κοινό απλότυπο να εντοπίζεται σε 6 άτομα. Αντίστοιχα, στον ίδιο πληθυσμό ανιχνεύτηκαν 2 πυρηνικοί απλότυποι. Το γεγονός ότι μελετήθηκε μόνο ένας πληθυσμός από το είδος αντικατοπτρίζεται και στη μειωμένη ενδοειδική γενετική απόσταση που εμφανίζει συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα

είδη του γένους (το 0.2% στο μιτοχόνδριο και το 0.02% στον πυρήνα, Πίνακας 3.1. και 3.2.). Επίσης, η απουσία άλλων πληθυσμών δεν επέτρεψε τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για τη δια-πληθυσμιακή γενετική διαφοροποίηση.

Στο είδος *C. elisabethae* (Πίνακας 3.4), εντοπίστηκαν 5 μοναδικοί μιτοχονδριακοί απλότυποι από το σύνολο των 11 αλληλουχιών, από τρεις τοποθεσίες, με τον πληθυσμό μετά τον Αχλαδόκαμπο να εμφανίζει μηδενική απλοτυπική και νουκλεοτιδική ποικιλότητα, παρόλο που τα δείγματα του συγκεκριμένου συλλέχτηκαν από διαφορετικούς βράχους. Στο ενοποιημένο σετ των πυρηνικών τόπων, βρέθηκαν 2 μοναδικοί απλότυποι σε σύνολο 9 αλληλουχιών, οι οποίοι μοιράζονται στις τρεις τοποθεσίες από τις οποίες συλλέχθηκαν τα δείγματα (Πίνακας 3.5). Μέτρια και στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση βρέθηκε μεταξύ των πληθυσμών 1 και 2 στο μιτοχόνδριο (ΕΟ Άργους Τριπόλεως από Αχλαδόκαμπο προς Στενό και Στενό προς Τρίπολη 500m), κάτι που ίσως απορρέει και από την απομακρυσμένη κατανομή τους.

Στο είδος *C. parnassia*, βρέθηκαν 10 μοναδικοί απλότυποι από το σύνολο των 14 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων (από 4 τοποθεσίες) και 7 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 15 ατόμων (από 5 τοποθεσίες). Συνολικά, η απλοτυπική ποικιλότητα εμφανίζεται αρκετά αυξημένη για τους μιτοχονδριακούς και τους πυρηνικούς τόπους. Μάλιστα, το συγκεκριμένο είδος εμφανίζει τη μεγαλύτερη απλοτυπική ποικιλότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα του γένους. Ίσως αυτό να οφείλεται στη σύνθετη «εσωτερική» δομή που εμφανίζεται στον πληθυσμό Γραβιά προς Άμφισσα, μιας και σχεδόν σε κάθε βράχο από τους 7 που συλλέχθηκαν δείγματα απαντάται διαφορετικός απλότυπος (με ~0.6% ενδοπληθυσμιακή γενετική απόσταση). Ως εκ τούτου, η ποικιλότητα αυτή διαφαίνεται και ενδοειδικά στη γενετική απόσταση η οποία είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη σε πυρήνα και μιτοχόνδριο, (3.9% στο μιτοχόνδριο και το 0.26% στον πυρήνα) (Πίνακας 3.1. και 3.2.). Τέλος, η γενετική διαφοροποίηση είναι στατιστικά σημαντική και ιδιαίτερα μεγάλη (Γραβιά προς Άμφισσα 27,5 km & Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km) στο πυρηνικό σετ δεδομένων (Πίνακας 3.9.) με τη γεωγραφική απόσταση να φαίνεται ότι ενδεχομένως υποβοηθά για αυτό το αποτέλεσμα.

Στο είδος *C. eucineta*, έγινε διάκριση 4 μοναδικών απλότυπων από το σύνολο των 7 αλληλουχιών (από 3 τοποθεσίες) για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων και 4 από το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 10 ατόμων (από 4 τοποθεσίες) (Πίνακας 3.4. και 3.5.). Συνολικά, εμφανίζει σχετικά μεγάλη απλοτυπική ποικιλότητα παρά το μειωμένο αριθμό ατόμων ανά τοποθεσία, αφού υπήρχαν περιπτώσεις όπου υπήρχε μόνο ένα άτομο από κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Ίσως, αυτή η ποικιλότητα εξακολουθεί να είναι ανιχνεύσιμη μιας και το είδος εμφανίζει μια εξαιρετικά ευρεία κατανομή που επεκτείνεται τόσο στη Στερεά Ελλάδα όσο και στην Πελοπόννησο. Επίσης ο μειωμένος αριθμός ατόμων ανά τοποθεσία, έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διακριτική ικανότητα του δείκτη F ST μιας και παρόλο που εμφανίστηκε ιδιαίτερα μεγάλη γενετική διαφοροποίηση στο μιτοχόνδριο ανάμεσα στους πληθυσμούς Μυστρά και Παναχαϊκού, δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική (Πίνακας 3.10).

Στο είδος *C. helena*, από τους αντίστοιχους τρεις πληθυσμούς μελέτης, ανιχνεύτηκαν 4 μοναδικόι απλότυποι από το σύνολο των 20 αλληλουχιών για το ενοποιημένο σετ των μιτοχονδριακών γονιδίων. Συγκεκριμένα, 15 άτομα από τους δύο πληθυσμούς σε Λεβίδι και Μαίναλο, μοιράζονται έναν κοινό απλότυπο. Σε ότι αφορά το σετ των πυρηνικών γονιδίων αντίστοιχα, σε σύνολο 18 ατόμων ανιχνεύτηκαν 11 απλότυποι, με έναν κοινό απλότυπο να ανιχνεύεται σε 7 άτομα και από τους τρεις πληθυσμούς. Άξιο παρατήρησης αποτελεί το γεγονός ότι συνολικά το είδος εμφανίζει μεγαλύτερη απλοτυπική ποικιλότητα στους πυρηνικούς τόπους από ότι στους μιτοχονδριακούς. Αυτό το εύρημα προκαλεί προβληματισμό μιας και αντίστοιχο γενετικό μοτίβο δεν παρουσιάζεται στα άλλα συγγενικά είδη. Ωστόσο, βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι στα μαλάκια ο ρυθμός μετάλλαξης του nuDNA πολλές φορές προσεγγίζει τον ρυθμό μετάλλαξης του mtDNA, οδηγώντας τα δύο γενετικά «διαμερίσματα» σε παρόμοιο επίπεδο πολυμορφισμού (Allio et al. 2017). Μεγάλη γενετική διαφοροποίηση η οποία υποστηρίζεται και στατιστικά, βρέθηκε στο μιτοχονδριακό σετ δεδομένων στους πληθυσμούς Τρίπολη προς Λεβίδι 2km & Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km) (Πίνακας 3.11.).

Συνοψίζοντας, οι πληθυσμοί των ειδών του γένους *Codringtonia* εμφανίζουν αρκετά αυξημένη απλοτυπική ποικιλότητα και γενετική διαφοροποίηση, κυρίως στους μιτοχονδριακούς τόπους, η οποία ενισχύεται κι από τις γεωγραφικές αποστάσεις αναμεταξύ των πληθυσμών των ειδών. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται και στη μειωμένη ικανότητα διασποράς των χερσαίων σαλιγκαριών, μιας και σχετικές έρευνες έχουν δείξει ότι η ικανότητα ενεργητικής μετακίνησής τους δεν ξεπερνά τα μερικά μέτρα ετησίως (.πχ. *Arianta arbustorum*, Baur 1986; *Albinaria corrugata*, Schilthuisen & Lombaerts 1994). Επομένως, πιθανότατα αναφερόμαστε σε είδη με ευρύτερες κατανομές εξάπλωσης στο παρελθόν και πληθυσμούς οι οποίοι κατακερματίστηκαν και διαφοροποιήθηκαν. Επίσης, στα χερσαία σαλιγκάρια η παθητική διασπορά μέσω του αέρα, χιονοστοιβάδων, θηλαστικών και πτηνών συμβαίνει ιδιαίτερα σπάνια και στις περισσότερες περιπτώσεις μοιάζει και μη ικανή να διατηρήσει τη γονιδιακή ροή αναμεταξύ των γενετικά απομονωμένων πληθυσμών γι αυτό κι εντοπίζουμε σχετικά μεγάλη διαπληθυσμιακή γενετική διαφοροποίηση (Bengtsson & Baur 1993; Baur et al. 1997; Akçakaya and Baur 1996). Επιπλέον, η εμφάνιση πιο έντονης εσωτερικής δομής σε κάποιους πληθυσμούς με διαφορετικό απλότυπο ανά βράχο, στα είδη *C.intusplicata*, *C. codringtonii* και *C. parnassia* υποδηλώνει πιθανότατα και την ύπαρξη δήμων, δηλαδή μικρότερων υποπληθυσμών, στους οποίους η πιθανότητα σύζευξης είναι μεγαλύτερη εντός του υποπληθυσμού (βράχου) παρά μεταξύ των άλλων/παρακείμενων υποπληθυσμών/βράχων. Κάτι που απαντάται σίγουρα σε άλλα χερσαία σαλιγκάρια, τα οποία έχουν «έντονα» δομημένους υποπληθυσμούς, οι οποίοι εμφανίζουν πολύ μικρή διασπορά στους γειτονικούς δήμους (Murray and Clarke, 1984; Schilthuisen & Lombaerts, 1994; Pfenninger et al, 1996; Giokas & Mylonas, 2004).

Τέλος, πρέπει να ληφθεί υπόψη πως σε πληθυσμούς με λιγότερα των πέντε ατόμων, πολλές τιμές δεν καθίστανται στατιστικά σημαντικές, γεγονός που υποδεικνύει πιθανώς την ανάγκη εξαγωγής μοριακών δεδομένων για μεγαλύτερο αριθμό ατόμων από κάθε πληθυσμό. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί πως συμπληρωματικά με την αύξηση των ατόμων, χρήζει κι ο έλεγχος της ισχύος του μοντέλου απομόνωση λόγω απόστασης (isolation-

by-distance) για τη διερεύνηση της στατιστικά σημαντικής ή μη, συσχέτισης μεταξύ των γεωγραφικών και γενετικών αποστάσεων. Δηλαδή, αν οι πληθυσμοί οι οποίοι είναι γεωγραφικά απομακρυσμένοι είναι απαραίτητα και γενετικά διαφοροποιημένοι μεταξύ τους. Ακόμη, η χρήση μικροδορυφορικών δεικτών πιθανότατα να έδειχνε μια πιο αντιπροσωπευτική εικόνα της δομής των πληθυσμών των ειδών λόγω του αυξημένου πολυμορφισμού τους (Sinclair, 2010).

4.2 Μελέτη δημογραφίας πληθυσμών ειδών

Δύο βασικοί στόχοι της γενετικής των πληθυσμών είναι η ανασύσταση της δημογραφικής ιστορίας των πληθυσμών και των ειδών κι ο εντοπισμός των τμημάτων του γονιδιώματος που βρίσκονται ή ήταν υπό φυσική επιλογή. Ωστόσο, η δράση της φυσικής επιλογής και τα δημογραφικά γεγονότα μπορούν να αφήσουν πολύ παρόμοιες «υπογραφές» στο γονιδίωμα κάτι που δυσχεραίνει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και χρήζει σωστών προσεγγίσεων και προσεκτικής ερμηνείας των αποτελεσμάτων τους.

Στην παρούσα μελέτη, η δημογραφική ιστορία των πληθυσμών των ειδών του γένους *Codringtonia*, αρχικά επιχειρήθηκε να εκτιμηθεί με τους δείκτες ουδετερότητας Tajima's D, Fu's F_s και Rozas R^2 χρησιμοποιώντας ξεχωριστά τα δυο σύνολα μιτοχονδριακών και πυρηνικών τόπων (Πίνακας 3.5. και 3.4. αντίστοιχα). Οι τιμές των δεικτών ουδετερότητας δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, υποδεικνύοντας πως οι αλληλουχίες δεν υπόκεινται σε φυσική επιλογή και πως οι πληθυσμοί έχουν πιθανώς σταθερό μέγεθος. Ανιχνεύτηκαν ωστόσο, μερικές εξαιρέσεις, με κάποιους δείκτες σε ελάχιστους πληθυσμούς να είναι στατιστικά σημαντικοί. Το είδος *C. gittenbergeri* στο μιτοχονδριακό σετ δεδομένων με την αρνητική τιμή στο δείκτη Fu's F_s αλλά και τη μειωμένη νουκλεοτιδική ποικιλότητα, υποδεικνύει ότι υπάρχει περίσσεια πρόσφατων μεταλλάξεων και κατ' επέκταση πλεονάζοντας αριθμός σπάνιων αλληλομόρφων, που οφείλεται πιθανόν σε πρόσφατη εξάπλωση του πληθυσμού. Αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψη τις στατιστικά σημαντικές τιμές στους δείκτες ουδετερότητας του *C. helenae*, για τον πληθυσμό στην κορυφή του όρους Μαίναλου, μπορούν να συναχθούν κάποια συμπεράσματα. Στο μιτοχόνδριο υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη θετικής επιλογής (Tajima's D αρνητικό) (αυξάνει τη συχνότητα των θετικών μεταλλαγών) και στον πυρήνα ένδειξη για απόκλιση του από ένα σταθερό μέγεθος (στατιστικά σημαντικό R^2). Επιπλέον, από τα αποτελέσματα στο ενοποιημένο σετ πυρηνικών τόπων, φαίνεται στο *C. helenae* να υπάρχει στατιστικά σημαντική αρνητική τιμή στο δείκτη Fu's F_s και αρνητική στον Tajima's D. Όλα αυτά, συνδυαστικά με τη μειωμένη νουκλεοτιδική ποικιλότητα, αλλά την αυξημένη απλοτυπική ποικιλότητα, αποτελούν σοβαρές ενδείξεις ότι ο πληθυσμός εμφανίζει πρόσφατη πληθυσμιακή εξάπλωση. Επιπλέον, το μοτίβο της υψηλής απλοτυπικής και της χαμηλής νουκλεοτιδικής ποικιλότητας συμβαίνει όταν οι πληθυσμοί αποκτούν μικρό μέγεθος και απομονώνονται. Ίσως στη συγκεκριμένη περίπτωση να υποδηλώνει την ύπαρξη του φαινομένου του ιδρυτή (founder effect) -ο οποίος πιθανότατα οδήγησε στη δημιουργία πολλαπλών υποπληθυσμών, απομονωμένων για επαρκές χρονικό διάστημα, ώστε να τους επιτραπεί η συσσώρευση υποκαταστάσεων/αντικαταστάσεων μέσω της γενετικής παρέκκλισης (Holland & Cowie., 2007). Επίσης, ένα άλλο ενδεχόμενο είναι ότι η χαμηλή νουκλεοτιδική ποικιλότητα, με πολλούς απλότυπους αλλά αρκετά όμοιους μεταξύ

τους, μπορεί να οφείλεται στο φαινόμενο στενωπού. Ο όρος παραπέμπει σε απότομη και σημαντική μείωση του μεγέθους ενός πληθυσμού. Όταν ένας πληθυσμός συρρικνώνεται πάρα πολύ, υφίσταται ένα είδος γενετικής συμφόρησης που μπορεί να μειώσει σημαντικά τη γενετική ποικιλότητα (αρχική απώλεια αλληλομόρφων και αυξημένη επίδραση της γενετικής παρέκκλισης στη συνέχεια) (Pianka 2006). Αυτή η υπόθεση μπορεί να συνδεθεί και με προηγούμενα ευρήματα που αφορούν στην αδυναμία διατήρησης του υδατικού ισοζυγίου που εμφανίζει το *C. helenae* (Giokas et al., 2007; Kotsakiozi et al., 2015), ένα πρότυπο όμως που δεν αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των ειδών *Codringtonia* (Kotsakiozi et al., 2015). Συγκεκριμένα, το υδατικό περιεχόμενο των ιστών του είδους μειώνεται κατά τη θερινή διάπαυση με αποτέλεσμα να υφίσταται υδατικό στρες (Kotsakiozi et al., 2015). Αυτή η έλλειψη πλαστικότητας μπορεί να είναι προϊόν γενετικών λόγων, αφού μια ενδεχόμενη πληθυσμιακή στενωπός μπορεί να οδήγησε σε απώλεια γενετικής ποικιλότητας -σχετική με την καλύτερη διαχείριση του υδατικού περιεχομένου. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την επιβίωση ατόμων χωρίς το κατάλληλο γενετικό προφίλ για να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά προβλήματα σχετικά με διατήρηση του νερού στους ιστούς τους κατά τη θερινή διάπαυση.

Λαμβάνοντας υπόψη συνολικά και τα αποτελέσματα των EBSPs (Εικόνα 3.4), κανένας πληθυσμός των ενδημικών ειδών του γένους *Codringtonia* δεν εμφάνισε ενδείξεις προγονικών στενωπών ή επεκτάσεων/εξαπλώσεων (expansions). Ωστόσο, αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό πληθυσμιακό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ανά είδος. Εξάλλου, αυτό διαφαίνεται (τα λίγα άτομα μελέτης) και από τα διαγράμματα, λόγω του μεγάλου εύρους που εμφανίζουν στο διάστημα εμπιστοσύνης τους. Μελετώντας πιο επισταμένα τα EBSPs, οι πιο έντονες πληθυσμιακές μεταπτώσεις κι οι ακόλουθες αυξητικές τάσεις -υπό περιπτώσεις, στους πληθυσμούς των *C. eucineta*, *C. intusplicata*, *C. helenae*, *C. elisabethae* και *C. parnassia*, έδειξαν πιθανές τρέχουσες στενωπούς, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με πρόσφατο κατακερματισμό ή μετατόπιση των ενδιαιτημάτων τους, λόγω της κλιματικής αλλαγής ή/και των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Αυτό το συμπέρασμα έρχεται και σε συμφωνία με το χαρακτηρισμό τους ως τρωτά είδη από την IUCN, αλλά και με τη Χατζηχαραλάμπους, η οποία στη διδακτορικής διατριβή (1996) περιγράφει ότι οι φυσικοί πληθυσμοί των ειδών του γένους εμφανίζουν αισθητή μείωση και λόγω της πίεσης που τους ασκείται μέσω της κατανάλωσής τους ως τροφή από τον άνθρωπο. Σε ότι αφορά το *C. codringtonii*, παρόλο που συγκαταλέγεται στα κινδυνεύοντα είδη, μοιάζει να εμφανίζει σταθερό μέγεθος, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο ότι ίσως τελικά παρουσιάζει μεγαλύτερο εύρος κατανομής από ότι έχει βρεθεί. Την υποψία αυτή, μας την ενισχύουν και προαναφερθέντα αποτελέσματα/συμπεράσματα (η αυξημένη απλοτυπική ποικιλότητα και το ότι δύο άτομα που ανήκουν στο συγκεκριμένο είδος, συλλέχθηκαν από την περιοχή εξάπλωσης του *C. gittenbergeri*). Τέλος, το *C. gittenbergeri*, το οποίο εκπροσωπείται μόνον από έναν διαθέσιμο πληθυσμό στο σχεδιάγραμμα (ενώ στα υπόλοιπα είδη πραγματοποιήθηκε συνένωση (pooling) όλων των διαθέσιμων πληθυσμών) φαίνεται να έχει σταθερό μέγεθος με την τρέχουσα πληθυσμιακή του τάση να μοιάζει αύξουσα. Συνδυάζοντας το σχεδιάγραμμα αυτό με τους δείκτες ουδετερότητας και με την κατασκευή ενός δικτύου απλοτύπων βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα,

παρατηρείται ότι τα περισσότερα άτομα μοιράζονται έναν κοινό προγονικό απλότυπο και αρκετούς νέους απλότυπους (star like pattern), λιγότερα συχνά υπαντώμενους στον πληθυσμό. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν πρόσφατη πληθυσμιακή εξάπλωση/έκρηξη.

4.3 Διερεύνηση ενδεχομένου υβριδισμού μεταξύ 2 ζευγών ειδών του γένους (*C. elisabethae* - *C. gittenbergeri* & *C. helenae*-*C. intusplicata*)

Η περαιτέρω διερεύνηση του ενδεχομένου υβριδισμού μεταξύ των ειδών (*C. gittenbergeri* και *C. elisabethae*) στην παρούσα μελέτη, προέκυψε σαν λογική συνέχεια των αποτελεσμάτων της φυλογένεσης του γένους *Codringtonia*, από τη διδακτορική διατριβή της Κοτσακιάζης (2013). Συγκεκριμένα, τα δύο προαναφερθέντα είδη σχημάτισαν έναν μονοφυλετικό κλάδο. Άξιο αναφοράς είναι επίσης το γεγονός ότι τα δύο αυτά είδη κατανέμονται σε γειτονικές περιοχές (**Εικόνα 1.1**). Σύμφωνα επίσης, με την Κοτσακιάζη (2013) διαπιστώνονται πολλές ομοιότητες στο κέλυφος τους, τέτοιες που οι πληθυσμοί τους δεν μπορούν να διακριθούν καλά με βάση τη συνολική μορφολογία του κελύφους τους. Ένας πιθανός λόγος για αυτή την παραφυλετικότητα μπορεί να είναι ο ατελής διαχωρισμός των γενεαλογικών γραμμών (Κοτσακιάζη, 2013). Επίσης, 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), αλλά να απορρέει από το ενδεχόμενο υβριδισμού.

Για την ενδελεχότερη μελέτη αυτής της τοπολογίας, προστέθηκαν στην παρούσα διατριβή δύο πυρηνικοί γενετικοί τόποι και παραπάνω άτομα στη συνολική φυλογένεση του γένους. Αυτή η προσέγγιση είχε ως απώτερο σκοπό την ανίχνευση πιθανής ανταλλαγής πυρηνικών γονιδίων αναμεταξύ των «όποπτων» για υβριδισμό ειδών. Ταυτόχρονα επιτεύχθηκε μια πιο «βαθιά» φυλογένεση μέσω της χρήσης πιο αργά εξελισσόμενων μοριακών δεικτών, κάτι που αποδείχτηκε αρκετά ενδιαφέρον λόγω των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, στα σχετικά πρόσφατα διαχωρισθέντα είδη του γένους που κατανέμονται στην Πελοπόννησο (περίοδο Πλειόκαινο-Πλειστόκαινο) (Κοτσακιάζη, 2013).

Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, ένα με ενοποιημένο το σύνολο των τριών μιτοχονδριακών γενετικών τόπων (**Εικόνα 3.1**), ένα των δύο πυρηνικών τόπων (**Εικόνα 3.2**), και ένα των πέντε γενετικών τόπων μαζί (**Εικόνα 3.3**). Τα αποτελέσματα στο μιτοχόνδριο έρχονται σε συμφωνία ως προς τη μονοφυλετικότητα των *C. gittenbergeri* και *C. elisabethae*. Ωστόσο, λόγω της προσθήκης παραπάνω ατόμων του είδους *C. intusplicata* αποκαλύφθηκε μια διαφορετική τοπολογία στο μιτοχονδριακό δέντρο, ως προς τη σχέση των ειδών *C. intusplicata* και *C. helenae*, από αυτή που περιεγράφηκε από την Κοτσακιάζη (2013). Αναλυτικότερα, μοιάζουν πιο συγγενικά, διότι το *C. intusplicata* εμφανίζεται σε συνέχεια του *C. helenae*, ως ένας αρκετά ισχυρά υποστηριζόμενος κλάδος. Εξετάζοντας επίσης την πληροφορία που αντλήθηκε από τα πυρηνικά γονίδια, προέκυψε ένα δέντρο με αρκετές πολυτομίες, το οποίο διαχωρίστηκε σε τρεις διακριτούς κλάδους. Το ενδιαφέρον σε αυτό το δέντρο προκύπτει από το γεγονός ότι όχι μόνο το ζεύγος των ειδών *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae* αλλά και το ζεύγος *C. intusplicata* - *C. helenae*, εμφανίζουν ένα γενετικά αναμειγμένο πρότυπο μιας και μοιράζονται κοινούς απλότυπους στο εσωτερικό των κλάδων τους. Αυτό αποτελεί ένδειξη υβριδισμού ή εισροής, ιδιαίτερα για το ζεύγος

C. gittenbergeri - *C. elisabethae*. μιας και η συνδυασμένη ανάλυση και των πέντε γενετικών τόπων (Εικόνα 3.3), τα εμφανίζει για άλλη μια φορά παραφυλετικά. Επιπλέον, τα *C. intusplicata* και *C. helenae* εμφανίστηκαν ως αδελφά ταξα. Επιπροσθέτως, λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι οι ενδοειδικές γενετικές αποστάσεις στο μιτοχονδριακό ενοποιημένο σετ δεδομένων του γένους, κυμαίνονται από 0.2% έως 5.2% , και 1.3% ανάμεσα σε *C. elisabethae* -*C. gittenbergeri*, (και στο πυρηνικό 0.02% έως 0.26% και 0.17% αντίστοιχα) αναδεικνύεται για άλλη μια φορά το ερώτημα αν αναφερόμαστε σε δύο εντελώς διακριτά είδη. Για αυτό το λόγο κατασκευάστηκε ένα δέντρο ειδών (Εικόνα 3.4). Οι σχέσεις των ειδών ήταν πολύ κοντινές με αυτές που ανακτήθηκαν βάσει του ενοποιημένου σετ δεδομένων των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων κατά την BI ανάλυση (Εικόνα 3.3). Τελικά το δέντρο ειδών συμφωνεί με τη ταξινόμηση του Subai και ανέδειξε 7 διακριτούς κλάδους.

Εστιάζοντας την προσοχή μας στις προκύψαντες φυλογενετικές σχέσεις των *C. elisabethae* -*C. gittenbergeri* παρατηρούμε ότι εμφανίζονται πολύπλοκες. Τα παρατηρούμενα φυλογενετικά πρότυπα σε πυρήνα και μιτοχόνδριο υποδηλώνουν μια αρκετά πρόσφατη διαφοροποίηση των ειδών. Πιθανότατα, η διείσδυση/εκροή γονιδιώματος να συνέβη κατά την εξέλιξη αυτών των ειδών. Αυτό αποτυπώνεται στην ύπαρξη ενός κοινού κεντρικού απλότυπου στα πυρηνικά γονίδια, τον οποίο μοιράζονται και τα δύο είδη (ενώ ύστερα από αυτόν εμφανίζονται με διαφορά μιας μετάλλαξης δύο απλότυποι που αντιστοιχεί ο καθένας στο κάθε είδος). Επίσης, τα δύο συγκεκριμένα είδη κατανέμονται ΒΑ της Πελοποννήσου και μάλιστα σε κοντινές περιοχές. Επομένως, γεωγραφικά υπάρχει το ενδεχόμενο ύπαρξης ζώνης επαφής στο πρόσφατο παρελθόν, είτε στο παρόν. Επιπλέον, παρόλο που και τα δυο είδη μπορεί να εντοπίζονται σε περιοχή με ιδιαίτερα ασταθές παλαιογεωγραφικό παρελθόν (η Πελοπόννησος χωρίστηκε και επανενώθηκε με τη Στερεά Ελλάδα επαναλαμβανόμενα), κατά το Πλειόκαινο -όπου είναι η περίοδος σύμφωνα με τη χρονολόγηση της Κοτσακιάζη (2013) όπου εμφανίστηκε ο κοινός πρόγονος των ειδών- μεγάλο μέρος της Πελοποννήσου σκεπάζεται από θάλασσα και παραμένουν σαν ξηρά μόνο οι περιοχές της Αργολίδας, του Πάρωνα-Κυθήρων, του Ταυγέτου και τμήματα της κεντρικής και κεντροδυτικής Πελοποννήσου. Αυτές είναι μερικώς και οι περιοχές της σημερινής κατανομής των *C. gittenbergeri* και *C. elisabethae*. Συνεπώς, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι από την έναρξη της πρώιμης διαφοροποίηση τους, εμφανίζουν συνεχόμενη γεωγραφική εγγύτητα, σε μικρή γεωγραφική έκταση, ενισχύοντας έτσι την πιθανότητα δευτερογενούς γονιδιακής ροής μεταξύ των απογονικών πληθυσμών/ειδών. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε: 1. εισχώρηση γονιδιώματος (introgressive hybridization), που προκαλείται από διασταυρώσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών (υβριδισμός), που ακολουθούνται από ανάδρομες διασταυρώσεις (backcrossing) υβριδίων με πατρικούς πληθυσμούς, 2, σε ατελή διαλογή γενεαλογικών γραμμών (incomplete lineage sorting), λόγω πρόσφατων γεγονότων ειδογένεσης τους, 3. στην διατήρηση προγονικών πολυμορφισμών. Έναν επιπρόσθετο προβληματισμό εγείρει το άτομο CeST6_4 το οποίο, παρόλο που συλλέχθηκε από τον ίδιο πληθυσμό του Στενού (προς Τρίπολη) και αναγνωρίστηκε μορφολογικά ως *C. elisabethae*, σχηματίζει έναν διακριτό εσωτερικό κλάδο και στα τρία φυλογενετικά δέντρα (Εικόνες 3.1, 3.2, 3.3). Επίσης, ο πληθυσμός όπου συμπεριλαμβανόταν εμφάνισε σημαντική γενετική διαπληθυσμακή διαφοροποίηση (μεταξύ των πληθυσμών 1 και 2 στο μιτοχόνδριο -ΕΟ Άργους Τριπόλεως από

Αχλαδόκαμπο προς Στενό και Στενό προς Τρίπολη 500m). Το ενδεχόμενο πειραματικού σφάλματος ή προβληματικής αλληλούχισης μοιάζει λιγότερο πιθανό διότι στο μιτοχονδριακό δένδρο σχηματίζει κλάδο μαζί με άλλο ένα άτομο του πληθυσμού. Ως εκ τούτου, αυτή η διάκριση δημιουργεί την υποψία για το ενδεχόμενο ύπαρξης ενός διαφορετικού/υβριδικού είδους (εκτός των *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae*). Ωστόσο, μπορεί η διαφοροποίηση των δύο ειδών να συνέβη ιδιαίτερα πρόσφατα.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, είναι σαφές ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση των αιτιών των παρατηρούμενων φυλογενετικών προτύπων. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν εξαντλητικές έρευνες στο πεδίο για την διερεύνηση συμπάτριας κατανομής και ενδεχομένης ζώνης επαφής των ειδών. Επιπλέον, χρειάζεται συλλογή περισσότερων δειγμάτων σε περίπτωση εύρεσης τέτοιων περιοχών, κι η χρήση πιο ευαίσθητων μοριακών δεικτών όπως είναι οι μικροδορυφόροι ή τα SNPs. Τέλος, η πραγματοποίηση αναλύσεων οριοθέτησης ειδών (species delimitation) θα συνέβαλαν περαιτέρω στη διαλεύκανση της ταξινόμησης του γένους αλλά και στο κατά πόσο τα *C. gittenbergeri* - *C. elisabethae* συνιστούν δύο διακριτά είδη.

4.4 Μοντελοποίηση της αλληλοεπικάλυψης των θώκων των ειδών του γένους και ερμηνεία της παρατηρούμενης δομής

Ο τρόπος με τον οποίο οι περιβαλλοντικοί θώκοι αλλάζουν μέσα στο χρόνο και το χώρο είναι θεμελιώδους σημασίας για την κατανόηση πολλών θεμάτων στην οικολογία και την εξέλιξη. Η χρήση μοντέλων για τη μελέτη αλληλοεπικάλυψης θώκων συγγενικών ειδών είναι ικανή να παρέχει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την ταξινομική διάκριση και τη διαφοροποίηση των θώκων τους (Greve et al., 2017). Σε μελέτες, όπως των Greve et al., (2017) η διερεύνηση της αλληλοεπικάλυψης των θώκων τριών στενά συγγενικών παραπάτριων ειδών χερσαίων σαλιγκαριών του γένους *Theba* υπέδειξε ότι τα μελετώμενα είδη καταλαμβάνουν καλά διαφοροποιημένους θώκους με ελάχιστη έως καθόλου αλληλοεπικάλυψη, κατά μήκος των ακτών του Νοτίου Μαρόκου και της Δυτικής Σαχάρας. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η κατανομή αυτή των ερημικών ειδών, η οποία συνδέεται άρρηκτα με τα επίπεδα βροχοπτώσεων, είναι προϊόν μη προσαρμοστικής ακτινωτής διαφοροποίησης (γενετικής παρέκκλισης).

Σε αυτή τη μελέτη επιχειρήθηκε για πρώτη φορά μια τέτοια προσέγγιση για τη διερεύνηση της αλληλοεπικάλυψης των ειδών του γένους *Codringtonia*. Συγκεκριμένα, για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης D, ο οποίος προβάλλει μια συνολική αντιστοιχία μεταξύ δύο θώκων σε ολόκληρο το κλιματικό χώρο και συμβάλλει στη διάκριση των χαρακτηριστικών του θώκου του ενός είδους από του άλλου (Broennimann et al., 2012). Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτού του δείκτη (**Πίνακας 3.12**) έδειξαν μέτρια αλληλοεπικάλυψη (0.4) με τη μέγιστη να εντοπίζεται ανάμεσα σε *C. intusplicata* - *C. gittenbergeri* (0.72) και την ελάχιστη ανάμεσα σε *C. elisabethae* - *C. parnassia* (0.09). Λαμβάνοντας υπόψη και το χάρτη εμφάνισης και κατανομής των ειδών (**Εικόνα 1.1**), ο δείκτης αλληλοεπικάλυψης δε μοιάζει τόσο αντιπροσωπευτικός μιας και εμφανίζει μεγαλύτερες αλληλοεπικάλυψεις μεταξύ ειδών που γεωγραφικά είναι πιο απομακρυσμένα. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του *C. parnassia* το οποίο εξαπλώνεται μόνο στη Στερεά Ελλάδα και φαίνεται να εμφανίζει αλληλοεπικάλυψη και

με είδη που απαντώνται μόνο στην Πελοπόννησο. Ωστόσο, μιας και γίνεται αναφορά σε οικολογική επικάλυψη, υπάρχει πιθανότητα ένδειξης αλλοπάτριας ειδογένεσης, με ελάχιστη οικολογική διαφοροποίηση. Επίσης, αυτό το αποτέλεσμα ίσως ανακύπτει από τη φύση του D μιας και είναι συμμετρικό. Επομένως, το ποσό της αλληλοεπικάλυψης προκύπτει το ίδιο και για τις δύο οντότητες/κατανομές ειδών που συγκρίνονται, παρόλο που είναι απίθανο οι θώκοι να εμφανίζουν το ίδιο μέγεθος (Broennimann et al., 2012). Επιπλέον, το D δεν παρέχει ποσοτική ένδειξη σχετικά με τη θέση και το εύρος των θώκων (niche breadth), αλλά παρέχει οπτική ένδειξη (Broennimann et al., 2012). Ακόμη, τα υποψήφια για ενδεχόμενο υβριδισμό είδη (*C. gittenbergeri*, *C. elisabethae*) παρά την κοντινή γεωγραφική κατανομή τους εμφάνισαν αρκετά μικρή τιμή αλληλοεπικάλυψης (0.12), κάτι που μπορεί να υπονοεί και την ύπαρξη προγονικού υβριδισμού, ή το ενδεχόμενο οικολογικής απελευθέρωσης (ecological release) -όπου οι πληθυσμοί τείνουν να χαρακτηρίζονται από σημαντικά ευρύτερο ή διαφορετικό οικολογικό θώκο. Τέλος, ένα άλλο σενάριο μπορεί να είναι ότι διαφοροποιήθηκαν τόσο εξαιτίας αλλοπάτριας ειδογένεσης, όσο και εξαιτίας διαφορετικών οικολογικών συνθηκών.

Επίσης, εξετάστηκε εάν οι θώκοι των ειδών του γένους μελέτης συγκλίνουν και εάν μοιάζουν. Η σύγκλιση θώκου υποδεικνύει εάν οι θώκοι δύο οντοτήτων σε δύο γεωγραφικές περιοχές είναι ισοδύναμες (π.χ. αν οι γεωγραφικές περιοχές που καταλαμβάνει ένα είδος είναι κλιματικά διακριτές-αβιοτικές παραμέτρους) ενώ η ομοιότητα προβάλλει τη μία οντότητα στον θώκο της άλλης κι ελέγχει εάν μια οντότητα καταλαμβάνει ενδιαιτήματα/περιβάλλοντα και στα δύο εύρη κατανομής που είναι περισσότερο παρόμοια μεταξύ τους από ότι θα αναμενόταν λόγω τύχης (πχ οι γεωγραφικές περιοχές που καταλαμβάνονται από ένα είδος είναι πιο παρόμοιες στο κλίμα κι όχι τυχαία-γεωγραφικές παραμέτρους) (Warren, 2008). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι θώκοι συγκλίνουν μεταξύ τους, ενώ δεν ταυτίζονται (με εξαίρεση τα *C. intusplicata* -*C. gittenbergeri*, Πίνακας 3.12). Ως εκ τούτου, εμφανίζουν αντίστοιχους κλιματικά θώκους αλλά όχι γεωγραφικά όμοιους.

Η διαφοροποίηση των οικολογικών θώκων εξηγήθηκε κυρίως από τις εποχικές διακυμάνσεις του κλίματος (εξαμυσοδιαπνοή και την εποχικότητα θερμοκρασίας – PC1) (Εικόνα 3.6, 3.7) -καθότι εμφανίστηκαν πιο σημαντικές για την κατανομή των ειδών. Μάλιστα, αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι η ποικιλότητα στο μέγεθος του κελύφους των ειδών συνδέεται και με τις προσαρμογές τους στο κλίμα στην περιοχή κατανομής τους (Kotsakiozi et al., 2016). Επιπλέον, από τα αποτελέσματα υποδηλώνεται ότι το οργανικό περιεχόμενο του εδάφους (PC2) επηρεάζει την κατανομή των ειδών. Αυτό ενδεχομένως μπορεί να συσχετιστεί με τη διαθεσιμότητα τροφής για τα είδη, μιας και η οργανική ουσία του εδάφους αποτελεί πηγή τροφής και επηρεάζει την ανάπτυξη των χερσαίων σαλιγκαριών (Elmslie, 1998). Επιπλέον, ο οργανικός άνθρακας του εδάφους υποστηρίζει τη δομή του εδάφους και έχει την ικανότητα να συγκρατεί παραπάνω νερό. Επομένως, το οργανικό περιεχόμενο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έμμεση προσομοίωση της κατάστασης της υγρασίας του εδάφους, η οποία επηρεάζει επίσης το pH του εδάφους (Song & Cao, 2017; Tytar & Baidashnikov, 2020) και δημιουργεί καλές εδαφολογικές συνθήκες για τα σαλιγκάρια (Χατζηιωάννου & Στάικου, 2015).

Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης των οικολογικών θώκων του γένους *Codringtonia* υποδεικνύουν ότι οι μεταβλητές που σχετίζονται με τη διαθεσιμότητα σε νερό στο περιβάλλον, παίζουν ουσιαστικό ρόλο στα πρότυπα κατανομής του. Αυτό, επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι τα χερσαία γαστερόποδα διαθέτουν ποικιλία μορφολογικών, συμπεριφορικών και φυσιολογικών προσαρμογών, για να αντιμετωπίζουν προβλήματα όπως είναι η διατήρηση του νερού και της θερμικής ισορροπίας τους (Riddle, 1983). Μάλιστα, όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνονται αντίξοες, τα σαλιγκάρια εισέρχονται σε μια κατάσταση αερόβιας νάρκης, τη διάπαυση (Cook, 2001), και για να επιβιώσουν είναι απαραίτητη η διατήρηση του υδατικού τους περιεχομένου. Συγκεκριμένα, προηγούμενες μελέτες (Kotsakiozi et al., 2015; Kotsakiozi et al., 2016) έχουν υποδείξει ότι για το γένος *Codringtonia* η διαχείμαση δεν αποτελεί τόσο στρεσογόνα περίοδος 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). Το *C. helenae* εμφανίζει το μεγαλύτερο υδατικό στρες κατά τους θερινούς μήνες, ενώ τα υπόλοιπα είδη διατηρούν υψηλά τα επίπεδα του νερού στους ιστούς τους. Επίσης, στις ίδιες μελέτες (Kotsakiozi et al., 2015; Kotsakiozi et al., 2016), έγινε μέτρηση στα πρότυπα έκφρασης της πρωτεΐνης Hsp70, που χρησιμοποιείται ως δείκτης στρες της αφυδάτωσης. SP, αναδεικνύοντας το πρότυπο ότι τα πιο θερμοευαίσθητα είδη διατηρούν συνεχώς υψηλότερα ενδογενή επίπεδα Hsp70 (Mizrahi et al., 2010). Από τα παραπάνω αντιλαμβανόμαστε ότι οι μεταβλητές της μελέτης των οικολογικών θώκων συνδέονται με τη φυσιολογία των ειδών. Ωστόσο, μας και αναφερόμαστε σε ένα ενδημικό βραχόβιο γένος, οι πληθυσμοί του *Codringtonia* έρχονται αντιμέτωποι με διαφορετικές μικροκλιματικές συνθήκες οι οποίες δεν είναι δυνατόν να αντιπροσωπεύονται πλήρως από τα βιοκλιματικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις της παρούσας μελέτης (μιας και δεν υπάρχουν τέτοια δεδομένα). Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί ότι οι γεωγραφικές συντεταγμένες που έχουν χρησιμοποιηθεί στη μελέτη πιθανότατα να μην είναι αντιπροσωπευτικές του εύρους της υπάρχουσας κατανομής τους. Επομένως, όλα τα προαναφερθέντα σίγουρα επηρεάζουν μερικώς την ανάλυση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abu-Bakar, S.-B., Razali, N. M., Naggs, F., Wade, C., Mohd-Nor, S.-A., & Aileen-Tan, S.-H. (2014). *The mitochondrial 16 s rRNA reveals high anthropogenic influence on land snail diversity in a preliminary island survey. Molecular Biology Reports*, 41(3), 1799-1805.
- Aguirre-Ramirez, E.J., Velasco-Cuervo, S.M., Gallo-Franco, J.J., Gonzáles, R., Carrejo, N.S. and Toro-Perea, N. (2017), Genetic diversity and population structure of *Anastrepha obliqua* in southwestern Colombia. *Entomol Exp Appl*, 164: 291-304.
- Anderson E. (1949). *Introgressive hybridization*. New York: Wiley & Sons
- Arnold M.L. (2006). *Evolution through genetic exchange*. New York, NY: Oxford University Press.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Avise, J. C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution* . Springer US
- Avise, J. C. (2000) *Phylogeography_ The History and Formation of Species*. Harvard University Press
- Ax, P., (1985). Stem species and the stem lineage concept. *Cladistics* 1, 279-287.
- Badali M., Zilman A., (2020). Effects of niche overlap on coexistence, fixation and invasion in a population of two interacting species. *R. Soc. open sci.* 7192181,
- Baird, A. B., Braun, J. K., Engstrom, M. D., Holbert, A. C., Huerta, M. G., Lim, B. K., Mares, M. A., Patton, J. C., & Bickham, J. W. (2017). Nuclear and mtDNA phylogenetic analyses clarify the evolutionary history of two species of native Hawaiian bats and the taxonomy of Lasiurini (Mammalia: Chiroptera). *PloS one*, 12(10), e0186085.
- Baltazar-Soares, M, Paiva, F, Chen, Y, Zhan, A, Briski, E. (2017). Diversity and distribution of genetic variation in gammarids: Comparing patterns between invasive and non-invasive species. *Ecol Evol.*,7: 7687– 7698
- Barnhart, M. C., (1983). Gas Permeability of the Epiphragm of a Terrestrial Snail, *Otala lactea*. *Physiological Zoology*, July, 56(3), pp. 436-444.
- Baur B. (1986). Patterns of dispersion, density and dispersal in alpine populations of the land snail *Arianta arbustorum* (L.) (Helicidae). *Holarct Ecol* 9:117–125
- Baur B., Ledergerber S, Kothbauer H (1997) Passive dispersal on mountain slopes: shell shape-related differences in downhill rolling in the land snails *Arianta arbustorum* and *Arianta chamaeleon* (Helicidae). *Veliger* 40:84–8
- Beheregaray L.B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol.* 17:3754-74.
- Bemmels P, J (2018). “ENVIREM: An expanded set of bioclimatic and topographic variables increases flexibility and improves performance of ecological niche modeling.” *Ecography*, 41, 291-307,
- Bengtsson, J., Baur, B. (1993) Do pioneers have r-selected traits? Life-history patterns among colonizing terrestrial gastropods. *Oecologia (Berl.)* 94:17–22
- Birky, C. W. (2001) ‘The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models’, *Annual Review of Genetics* , 35:1, 125-148.
- Bouchet, P.(1992). Extinction and preservation of species in the tropical world: What future for Molluscs? *American Conchocologist* , 20: 20-24.
- Bouchet, P., Rocroi, J.-P., Frýda, J., Hausdorf, B., Ponder, W., Valdés, A., Warén, A. (2005). Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia*, Vol. 47 (No 1 - 2), 1 - 397.
- Bouchet, Philippe, Rocroi, Jean-Pierre, Hausdorf, Bernhard, Kaim, Andrzej, Kano, Yasunori, Nützel, Alexander, Parkhaev, Pavel, Schrödl, Michael, and Strong, Ellen E. (2017). Revised Classification, Nomenclator and Typification of Gastropod and Monoplacophoran Families. *Malacologia*, 61(1-2): 1-526..
- Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., et al. (2019) BEAST 2.4.7: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.
- Bouzat, J. L. (2010). Conservation genetics of population bottlenecks: the role of chance, selection, and history. *Conservation Genetics*, 11(2), 463–478.

- Breure, A. S. H., & Romero, P. E. (2012). Support and surprises: molecular phylogeny of the land snail superfamily Orthalicoidea using a three-locus gene analysis with a divergence time analysis and ancestral area reconstruction (Gastropoda: Stylommatophora). *Archiv Für Molluskenkunde: International Journal of Malacology*, 141(1), 1–20.
- Briggs, J.C. (2000). Centrifugal speciation and centres of origin. *Journal of Biogeography*, 27: 1183-1188.
- Broennimann, O., Di Cola, V., Petitpierre, B., Breiner, F., Scherrer, D., Manuela, D., & Pottier, J. (2018). Package ‘ecospat’.
- Broennimann, O., Fitzpatrick, M.C., Pearman, P.B., Petitpierre, B., Pellissier, L., Yoccoz, N.G., Thuiller, W., Fortin, M.-J., Randin, C., Zimmermann, N.E., Graham, C.H. and Guisan, A. (2012), Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Global Ecology and Biogeography*, 21: 481-497.
- Bruce R., Ziheng Y., Species Delimitation. (2020). *Phylogenetics in the Genomic Era*, No commercial publisher | Authors open access book, pp.5.5:1–5.5:18,. hal-02536468
- Camargo, A., (2013) Species delimitation: a decade after the renaissance. *The Species Problem - Ongoing Issues* (ed. by P.Y. Rijke), pp. 225-247. INTECH.
- Chapman, A. D., (2009). *Numbers of Living Species in Australia and the World*, 2nd edition. Australian Biological Resources Study, Canberra. (online).
- Chase, R. (2001). Sensory organs and the Nervous System. In Baker G. M. (Ed.), *The Biology of Terrestrial Molluscs*. New York, U.S.A.: CABI Publishing.
- Chueca, L.J., Madeira, M.J. and Gómez-Moliner, B.J. (2015), Biogeography of the land snail genus *Allognathus* (Helicidae): middle Miocene colonization of the Balearic Islands. *J. Biogeogr.*, 42: 1845-1857.
- Chueca, L. J., Gómez-Moliner, B. J., Madeira, M. J., & Pfenninger, M. (2018). Molecular phylogeny of *Candidula* (Geomitridae) land snails inferred from mitochondrial and nuclear markers reveals the polyphyly of the genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 118, 357–368.
- 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.
- D.R. Uit deWeerd, W.H. Piel, E. (2004). Gittenberger Widespread polyphyly among Alopinae snail genera: when phylogeny mirrors biogeography more closely than morphology *Mol. Phylogenet. Evol.*, 33 . 533-548.
- Davison, A. (2002). Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Population Ecology*, 44(3), 129–136.
- Dermitzakis, D. M. (1990). Paleogeography, geodynamic processes and event stratigraphy during the late Cenozoic of the Aegean area. International Symposium on: *Biogeographical Aspects of Insularity* (pp. 263-288.). Roma: Academia Nazionale dei Lincei, 85.
- Dopazo, H., Leonard, A. (2006). *Molecular Evolution and Phylogenetics*, (2nd ed.), Cambridge University Centro de Investigacion Principe Felipe, 146 pp.
- Edwards, S.V., (2009). Is a New and General Theory of Molecular Systematics Emerging? *Evolution* 63, 1-19.
- 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.
- Elejalde, M.A., Madeira, M.J., Arrébola, J.R., Muñoz, B. and Gómez-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.
- Elmslie LJ. (1998), Humic acid: a growth factor for *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata). *J. Moll Stud.*, 64,400-401
- Emerson, B. C., Hewitt G. M. (2005). Phylogeography. *Curr. Biol.* 15, R367–R37110.
- Ewens, W.J. (1979), *Mathematical Population Genetics*, Springer-Verlag, Berlin.
- Felsenstein, J., (1985). Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J. (2003). *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates.
- Fisher-Reid, M.C., Wiens, J.J. (2011). What are the consequences of combining nuclear and mitochondrial data for

- phylogenetic analysis? Lessons from *Plethodons* salamanders and 13 other vertebrate clades. *BMC Evol Biol* 11, 300.
- Freeland, J.R., Petersen, S.D., Kirk, H. (2011). *Molecular Ecology*. (2nd ed.), Wiley-Blackwell.
- Fu, Y. (1997) 'Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection', *Genetics*, (147), pp. 915–925.
- Galtier, N. et al. (2009) 'Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal', *Molecular Ecology*, 18(22), pp. 4541–4550.
- Gillespie, J. H. (2004). *Population Genetics: A Concise Guide*, 2nd ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press
- Giokas, S., Mylonas, M. (2004). Dispersal patterns and population structure of the land snail *Albinaria coerulea* (Pulmonata: Clausiliidae). *J Moll Stud* 70: 107–116.
- Giokas, S., Karkoulis, P., Pafilis, P. and 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.
- Gissi, C., Iannelli, F. and Pesole, G. (2008) 'Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species', *Heredity*, 101(4), pp. 301–320.
- Goodall-Copestake, W. P. et al. (2010) 'Swarms of diversity at the gene *cox1* in Antarctic krill', *Heredity*, 104(5), pp. 513–518.
- Goodall-Copestake, W. P., Tarling, G. A. and Murphy, E. J. (2012) 'On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: A case study using the gene *cox1* in animals', *Heredity*. Nature Publishing Group, 109(1), pp. 50–56.
- Gregory, T.R. (2008). Understanding Evolutionary Trees. *Evo Edu Outreach* 1, 121–137.
- Greve, C, Haase, M, Hutterer, R, Rödder, D, Ihlow, F, Misof, B. (2017). Snails in the desert: Species diversification of *Theba* (Gastropoda: Helicidae) along the Atlantic coast of NW Africa. *Ecol Evol.*; 7: 5524– 5538.
- Griffiths, A., Gelbart, W. and Miller, J. (1999) *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman.
- Hadjicharalambous, E. (1996). *Contribution to the study of the ecology and biology of the genus Codringtonia Kobelt, 1898 (Gastropoda, Pulmonata)*. Biology Department, University of Athens.
- Hadly, E.A., Spaeth P.A., Li C. (2009). Niche conservatism above the species level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov;106 Suppl 2:19707–19714.
- Hagelberg, E. et al. (1994) 'DNA from ancient mammoth bones', *Nature*, 370(6488), pp. 333–334.
- Harl, J., Páll-Gergely, B., Kirchner, S. et al. (2014). Phylogeography of the land snail genus *Orcula* (Orculidae, Stylommatophora) with emphasis on the Eastern Alpine taxa: speciation, hybridization and morphological variation. *BMC Evol Biol* 14, 223.
- Harrison R.G., Larson E. L., (2014). Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries, *Journal of Heredity*, Volume 105, Issue S1, Pages 795–809.
- Hartl, D. L. and Clark, A. C. (1997) *Principles of Population Genetics* (4th edn), Sinauer Associates, Inc., Sunderland
- Hartl, D. L. (2000) *A Primer of Population Genetics* (3rd edn). Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Hedrick, P. W. *Genetics of Populations*, (2005). 3rd ed. Sudbury, MA: Sinauer & Associates
- Heiser, C.B. (1973). Introgression re-examined. *Bot Rev.* 39:347–366.
- Heled, J., Drummond, A.J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evol Biol* 8, 289
- Hengl T, Mendes de Jesus J, Heuvelink GBM, Ruiperez Gonzalez M, Kilibarda M, et al. (2017) SoilGrids250m: Global gridded soil information based on machine learning. *PLOS ONE* 12(2): e0169748.
- Hennig, W. (1966) *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 291–301.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., (2005). Very high-resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965–1978.
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411–453.

- Hirano, T., Saito, T., Tsunamoto, Y., Koseki, J., Ye, B., Do, V.T., Miura, O., Suyama, Y., Chiba, S. (2019). Enigmatic incongruence between mtDNA and nDNA revealed by multi-locus phylogenomic analyses in freshwater snails. *Sci Rep.*;9(1):6223.
- Holland BS, Cowie RH. (2007). A geographic mosaic of passive dispersal: population structure in the endemic Hawaiian amber snail *Succinea caduca* (Mighels, 1845). *Mol Ecol.*;16: 2422–2435
- Horsáková, V., Nekola, J. C., & Horsák, M. (2019). When is a “cryptic” species not a cryptic species: A consideration from the Holarctic micro-landsnail genus *Euconulus* (Gastropoda: Stylommatophora). *Molecular Phylogenetics and Evolution*.132:307-320.
- Hu, L. et al. (2018) ‘Molecular phylogeography and population history of *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) based on mitochondrial DNA’, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Elsevier, 503(February), pp. 23–30.
- Hudson, R. R., Slatkin, M. and Maddison, W. P. (1992) ‘Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data’, *Genetics*, 132(2), pp. 583–589.
- Huelsenbeck, J.-P., Ronquist, F., (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- 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.
- Hwang, U. W., & Kim, W. (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean journal of parasitology*, 37(4), 215–228.
- IUCN. (2011). IUCN Red List of Threatened Species (ver. 2011.1). Available at: <http://www.iucnredlist.org>. (Accessed: 30 June 2017).
- Jeffrey C. Nekola, Brian F. Coles, Ulfar Bergthorsson (2009). Evolutionary pattern and process within the *Vertigo gouldii* (Mollusca: Pulmonata, Pupillidae) group of minute North American land snails, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 53, Issue 3 , Pages 1010-1024.
- 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.
- Jones, G.R., (2016). Algorithmic improvements to species delimitation and phylogeny estimation under the multispecies coalescent. *J. Math Biol.*, Jan;74(1-2):447-467.
- Jörger, K. M. et al., (2010). On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia.. *BMC Evolutionary Biology*, 25 October, Issue 10, p. 323.
- Karger, D. N., Conrad, O., Böhner, J., Kawohl, T., Kreft, H., Soria-Auza, R. W., & Kessler, M. (2017). Climatologies at high resolution for the earth’s land surface areas. *Scientific data*, 4, 170122.
- Kim, M. J. et al. (2009) ‘Mitochondrial DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae)’, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12(3), pp. 133–139.
- Knowles L.L. (2004). The burgeoning field of statistical phylogeography. *J Evol Biol.* 17: 1-10.
- Kornilios, P., Stamataki, E., Giokas, S. (2015). Multiple reversals of chirality in the land snail genus *Albinaria* (Gastropoda, Clausiliidae). *Zoologica Scripta*, 44, 603– 611.
- 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*, Issue 62, pp. 681-692.
- Kotsakiozi P, Parmakelis A, Aggeli IK, Gaitanaki C, Giokas S, Valakos ED (2015). Water balance and expression of heat-shock proteins 70 in *Codringtonia* species, a study within a phylogenetic framework. *Journal of Molluscan Studies* 81: 24-36.
- Kozak, K., & Wiens, J. (2006). Does Niche Conservatism Promote Speciation? A Case Study in North American Salamanders. *Evolution*, 60(12), 2604-2621.
- Kuhner, M.K., & Felsenstein, J., (1994) A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 459-468.

- Lanfear, R. et al. (2016) 'PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses', *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), pp.772–773.
- Legakis, A. and Maragkou, P. (2009). *The Red Data Book of the threatened species of Greece [in Greek]*. Hellenic Zoological Society, Athens.
- Lydeard, C., Cowie, R.H., Ponder, W.F., Bogan, A.E., Bouchet, P., Clark, S.A., Cummings, K.S., Frest, T.J., Gargominy, O., Herbert, D.G., Herschler, R., Perez, K.E., Roth, B., Seddon, M., Strong, E.E. and Thompson, F.G. (2004). The Global Decline of Nonmarine Mollusks. *Bioscience* 54(4): 321–330
- Mayr, E., Bock, W.J. (2002). Classifications and other ordering systems. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, pp.169-194.
- McCormack, J.E., Zellmer, A.J. and Knowles, L.L. (2010), Does niche divergence accompany allopatric divergence in *Aphelocoma* jays as predicted under ecological speciation? Insights from tests with niche models. *Evolution*, 64: 1231-1244
- McCune, B., and D. Keon (2002) Equations for potential annual direct incident radiation and heat load index. *Journal of Vegetation Science*. 13:603-606.
- McLennan, D.A. (2010) How to Read a Phylogenetic Tree. *Evo Edu Outreach* 3, 506–519.
- Metzger, M.J., Bunce, R.G.H., Jongman, R.H.G., Sayre, R., Trabucco, A. & Zomer, R. (2013). A high-resolution bioclimate map of the world: a unifying framework for global biodiversity research and monitoring (M. Sykes, Ed.). *Global Ecology and Biogeography*, 22, 630–638.
- 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.
- Morii, Y., Yokoyama, J., Kawata, M., Davison, A., & Chiba, S. (2015). Evidence of introgressive hybridization between the morphologically divergent land snails *Aino helix* and *Ezohelix*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 115(1), 77–95.
- Murray J, Clarke B (1984). Movement and gene flow in *Partula taeniata*. *Malacologia* 25: 343–348.
- Mylonas, M. (1982). *The Zoogeography and Ecology of the Terrestrial Molluscs of Cyclades*. PhD Thesis, University of Athens, Athens, Greece (In Greek, English abstract)
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York: Colombia University Press. 512 p.
- Nei, M., Kumar, S., (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Neiber, M.T. & Hausdorf, B. (2017). Molecular phylogeny and biogeography of the land snail genus *Monacha* (Gastropoda, Hygromiidae). *Zoologica Scripta*, 46, 308– 321.
- Olsen G.J., Woese CR. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*. Jan;7(1):113-23.
- Park, S.H., Zhang, Y., Piao, H., Yu, D.H., Jeong, H.J., Yoo, G.Y., Jo, T.H., Hwang, J.J. (2009). Sequences of the cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene are suitable for species identification of Korean Calliphoridae flies of forensic importance (Diptera: *Calliphoridae*). *J Forensic Sci*.54(5):1131-1134.
- 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.
- 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. (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.
- Pfenninger M, Bahl A, Streit B (1996). Isolation by distance in a population of a small land snail *Trochoidea geyeri*: evidence from direct and indirect methods. *Proc R Soc Lond B* 263: 1211–1217
- Piaggio, A. J., Spicer, G.S. (2001). Molecular Phylogeny of the Chipmunks Inferred from Mitochondrial Cytochrome b and Cytochrome Oxidase II Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*20: 335-350.
- Polechová J., Storch D., (2019) Ecological Niche in *Encyclopedia of Ecology* (Second Edition).
- Rambaut A., Drummond A. J, Xie W., Baele G., and Suchard M. A., (2018) MCMC Trace Analysis Tool. Version v1.7.1, 2003-2018.

- Rambaut, A. (2012) 'FigTree v1. 4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology', Edinburgh: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol* 19: 2092–2100.
- Rannala, B., Yang, Z., (2003). Bayes Estimation of Species Divergence Times and Ancestral Population Sizes Using DNA Sequences From Multiple Loci. *Genetics* 164, 1645-1656.
- Remi Allio, Stefano Donega, Nicolas Galtier, Benoit Nabholz, (2017). Large Variation in the Ratio of Mitochondrial to Nuclear Mutation Rate across Animals: Implications for Genetic Diversity and the Use of Mitochondrial DNA as a Molecular Marker, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 34, Issue 11, November, Pages 2762–2772.
- Riddle WA. (1983). Physiological ecology of land snails and slugs. In: Russell- Hunter WD, ed. *The Mollusca* 6. London: Academic Press. 431-461.
- Rosenberg G., (2014). A new critical estimate of named species-level diversity of the Recent Mollusca American Malacological Bulletin 32 (2), 308-322
- Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 34, 3299–3302.
- Schilthuizen M, Lombaerts M (1994) Population structure and levels of gene flow in the mediterranean land snail *Albinaria corrugata* (Pulmonata: Clausiliidae). *Evolution Int J org Evolution* 48:577–586
- Schilthuizen M, Lombaerts M (1994). Population structure and levels of gene flow in the Mediterranean land snail *Albinaria corrugata* (Pulmonata: Clausiliidae). *Evolution* 48: 577–586.
- Schluter, D. (2000). *The Ecology of Adaptive Radiations*. Oxford University Press, Oxford.
- Schoener T. W. (1970). Resource partitioning in ecological communities, *Science*, vol. 185 (pg. 27-39).
- 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 PCR primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:1– 51.
- Sinclair, C. (2010). Surfing Snails: Population Genetics of the Land Snail *Ventridens ligera* (Stylommatophora: Zonitidae) in the Potomac Gorge, *American Malacological Bulletin* 28(2), 105-112,
- SoilGrids250m: Global gridded soil information based on machine learning. *PLoS One* 12, e0169748.
- Song, C., Cao, M. (2017) Relationships between Plant Species Richness and Terrain in Middle Sub-Tropical Eastern China. *Forests*, 8 (9), article 344, 13 pp.
- Stecher G., Tamura K., and Kumar S., (2020) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*
- Stephens, M.; Smith, N.J.; Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 978–989.
- Stork NE (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annual Review of Entomology*; 63:31–45.
- Subai, P. (2005). Revision der Gattung *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae: Helicinae). *Archiv für Molluskenkunde* 134: 67-121.
- Swofford, D.-L., Olsen, G.-J., Waddell, P.J., Hillis, D.-M., (1996). Phylogenetic Inference. In *Molecular systematics*, 2nd edition, chap. 5, pp. 407-514. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts
- Tajima, F. (1989) 'Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism', 595(3), pp. 585–595.
- Thornthwaite, C.W. (1948). An approach toward a rational classification of climate. *Geographical Review*, 38, 55–94.
- Tonini, J., Moore, A., Stern, D., Shcheglovitova, M., & Ortí, G. (2015). Concatenation and Species Tree Methods Exhibit Statistically Indistinguishable Accuracy under a Range of Simulated Conditions. *PLoS currents*, 7, ecurrents.tol.34260cc27551a527b124ec5f6334b6be.
- Tytar, V., Baidashnikov, O. (2020) Associations Between Habitat Quality And Body Size In The Carpathian Land Snail *Vestia turgida*: Species Distribution Model Selection And Assessment Of Performance, bioRxiv

- Vaidya, G., Lohman, D.J. and Meier, R. (2011), SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27: 171-180.
- Vardinoyannis K., Parmakelis A., Triantis K., Giokas S., (2018) Land molluscs in Greece: The rich, unique, diverse and unprotected animal models, In book: *Biogeography and Biodiversity of the Aegean*. In honour of Prof. Moysis Mylonas., Publisher: Broken Hill Publishers Ltd.
- Wade, C., & P., Mordan. (2000). Evolution within the gastropod mollusks; using the ribosomal RNA gene-cluster as an indicator of phylogenetic relationships. *Journal of Molluscan Studies* 66: 565-570.
- Wakeley, J. (2008). *Coalescent Theory: An Introduction*. Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, Colorado.
- Wang, X.-C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J.-H., Cai, D. and Li, J.-Q. (2015), ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Mol Ecol Resour*, 15: 573-586.
- Warren DL, Glor RE, Turelli M. (2008). Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*. Nov;62(11):2868-83
- Warren, D.L.; Glor, R.E.; Turelli, M. (2008). Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*, 62, 2868–2883.
- Wiens JJ. (2011). The niche, biogeography and species interactions *Phil. Trans. R. Soc. B* 366: 2336–2350
- Wiens, J., & Graham, C. (2005). Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 519-539.
- Wiley, E., O., Lieberman B., S. (2011). Characters and Homology. In *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics*. (2nd ed., pp 107-151). Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Winnepenninckx B, Backeljau T, R DW. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9: 407.
- Wright, S., (1951). *The genetical structure of populations*. *Ann Eugen* 15: 323–354.
- Xia X. DAMBE5, (2013):. A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol Biol Evol*. 30(7):1720-8.
- Ye Xu, Ji-wei Mai, Bing-jie Yu, Hong-xia Hu, Liang Yuan, Roman Jashenko, Rong Ji. (2019). Study on the Genetic Differentiation of Geographic Populations of *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) in Sino-Kazakh Border Areas Based on Mitochondrial COI and COII Genes, *Journal of Economic Entomology*, Volume 112, Issue 4, Pages 1912–1919.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol*. 3:563-584.
- Zhou, W., Yang, H., Ding, H. et al. (2017). Population genetic structure of the land snail *Camaena cicatricosa* (Stylommatophora, *Camaenidae*) in China inferred from mitochondrial genes and ITS2 sequences. *Sci Rep* 7, 15590

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Pianka, E. Εξελικτική Οικολογία (μετ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2006. (Αρχική έκδοση στα αγγλικά: Pearson Education).
- Wilson E. & Bossert W. (2000). *Εισαγωγή στην πληθυσμιακή βιολογία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. UTOPIA (Αρχική έκδοση στα αγγλικά: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Δερμιτζάκης & Ντρίνια, (2010). *Γεωλογικά συμβάντα, φαινόμενα και παλαιοντολογικά ευρήματα στην ευρύτερη περιοχή του αγίου Νικολάου*. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωλογίας και Γεωπεριβάλλοντος, Πανεπιστημιόπολη 157 84, Ζωγράφου, Αθήνα
- Ιατρού, Γρ., (1986): *Συμβολή στη μελέτη της ενδημικής χλωρίδας της Πελοποννήσου*.- Διδακτορικό, 310 σ. Πάτρα.
- Κοτσακιάζη, Π. Α., (2013). *Συγκριτική μελέτη φυσιολογικών προσαρμογών στα χερσαία σαλιγκάρια του γένους *Codringtonia Kobelt 1898**. Αθήνα: Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Φοίτος, Δ. & Καμάρη, Γ. (2009): *Μαθήματα Γεωβοτανικής*. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα.
- Χατζηγιωάννου Μ. - Στάκου Α. (2015). Βιολογία και Εκτροφή Γαστεροπόδων – Σαλιγκαροτροφία. 192 σελ. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5869> 6

Ιστοσελίδες

http://www.wwf.gr/forests/pdfs/atlas/ATLAs_WWF_BOOK_12.2012_WEB%20%5BMAPs_05_STEREA%5D.pdf

<https://sci-hub.tw/https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11033-014-3029-5>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π1. Συνολική παρουσίαση δειγμάτων του γένους *Codringtonia* και των εξωομάδων που αναλύθηκαν/χρησιμοποιήθηκαν (είδη και πληθυσμοί μελέτης, γεωγραφικά στοιχεία των περιοχών δειγματοληψίας, μέγεθος δείγματος πληθυσμών (N), αριθμοί αλληλουχιών στη βάση δεδομένων GenBank από όπου και ανταλήθηκαν) στην παρούσα μελέτη για πέντε γονιδιακούς τόπους.

Είδος	Κωδικός χάρτη	Περιοχή δειγματοληψίας (N)	Περιφέρεια	Συντεταγμένες		Κωδικός δείγματος	Αριθμός GenBank ή επιτυχημένη ή μη, ενίσχυση αλληλουχίας				
				Γεωγρ. πλάτος	Γεωγρ. μήκος		ITS1	ITS2	16S	COI	COII
<i>C. codringtonii</i>	1	Καλιθέα (5)	Α	37.086059	22.641106	Cg_KalR1_1	*	οκ	οκ	οκ	οκ
						Cg_KalR1_2	*	οκ	οκ	*	*
						Cg_KalR2_1	*	οκ	οκ	*	*
						Cg_KalR2_2	*	οκ	οκ	οκ	οκ
						Cc_KalR2_2	*	*	JQ240123	JQ239955	JQ240039
	2	Ροδιά (4)	Α	37.2126	21.73833	CcRod1	οκ	οκ	JQ240093	JQ239924	JQ240008
						CcRod2	οκ	οκ	JQ240094	JQ239925	JQ240009
						CcRod3	οκ	οκ	JQ240095	JQ239926	JQ240010
						CcRod4	οκ	οκ	JQ240096	JQ239927	JQ240011
	3	Ναυαρίνο (2)	Α	36.95236	21.66138	CcNav1	*	οκ	JQ240091	JQ239922	JQ240007
						CcNav2	οκ	οκ	JQ240092	JQ239923	JQ240007.1
	4	Άγιος Πέτρος (1)	Α	37.29333	22.59135	Cg_Mall	*	οκ	οκ	οκ	οκ
	5	Μονή Χρυσοκελαρίας (1)	Α	36.79154	21.88558	CcHr1	*	*	JQ240089	JQ239920	JQ240005
6	Μαθιάς (1)	Α	36.92928	21.88341	CcMath1	οκ	οκ	JQ240090	JQ239921	JQ240006	
7	Άγιος Πέτρος προς Μονή Μαλεβής (1)	Α	37.29333	22.59135	Cc_Mal_1	*	*	JQ240122	JQ239954	JQ240038	
<i>C. gittenbergeri</i>	8	Άγιος Ιωάννης προς Μελιγού 1,5km πριν (13)	Α	37.352893	22.654839	Cg_MelR1_1	οκ	οκ	JQ240110	JQ239941	JQ240025
						Cg_MelR2_1	οκ	*	JQ240111	JQ239942	JQ240026

						Cg_MelR3_1	οκ	οκ	JQ24011 2	JQ239943	JQ240027
						Cg_MelR4_1	οκ	οκ	JQ24011 3	JQ239944	JQ240028
						Cg_MelR4_2	οκ	οκ	JQ24011 4	JQ239945	JQ240029
						Cg_MelR5_1	οκ	οκ	JQ24011 5	JQ239946	JQ240030
						Cg_MelR5_2	οκ	οκ	JQ24011 6	JQ239947	JQ240031
						Cg_MelR6_1	οκ	οκ	JQ24011 7	JQ239948	JQ240032
						Cg_MelR6_2	οκ	οκ	JQ24011 8	JQ239949	JQ240033
						Cg_MelR7_1	οκ	οκ	JQ24011 9	JQ239950	JQ240034
						Cg_MelR7_2	οκ	οκ	JQ24012 0	JQ239951	JQ240035
						Cg_MelR7_3	οκ	οκ	JQ24012 1	JQ239952	JQ240036
						Cg_MelR7_4	οκ	οκ	οκ	JQ239953	JQ240037
<i>C. elisabethae</i>	9	Στενό προς Τρίπολη 500m (6)	A	37.500121	22.462234	CeST6_1	οκ	*	JQ24009 8	JQ239929	JQ240013
						CeST6_2	οκ	οκ	JQ24009 9	JQ239930	JQ240014
						CeST6_3	οκ	οκ	JQ24010 0	JQ239931	JQ240015
						CeST6_4	οκ	οκ	JQ24010 1	JQ239932	JQ240016
						CeST6_5	*	*	JQ24010 2	JQ239933	JQ240017
						CeST6_6	οκ	*	οκ	*	*
	10	ΕΟ Άργους Τριπόλεως μετά τον Αχλαδόκαμπο, 12,7km προς Στενό (5)	A	37.52167	22.62417	Ce_Ach-St_1	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						Ce_Ach-St_2	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						Ce_Ach-St_3	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						Ce_Ach-St_4	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						Ce_Ach-St_5	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ

	11	Αχλαδόκαμπος προς Άργος 5km (1)	A	37.51775	22.663422	CeAA7_1	οκ	οκ	JQ24009 7	JQ239928	JQ240012
<i>C. parnassia</i>	12	Γκιώνα-Παλαιοβούνι (Μακρυλάκομα) (3)	B	38.629173	22.219849	CpGio_1	οκ	οκ	JQ24015 7	JQ239989	JQ240073
						CpGio_2	οκ	οκ	JQ24015 8	JQ239990	JQ240074
						CpGio_3	οκ	οκ	JQ24015 9	JQ239991	JQ240075
	13	Γκιώνα Ευρυτανίας (2)	B	38.58	22.28	CparPal_1	*	οκ	οκ	fail per	οκ
						CparPal_2	οκ	οκ	οκ	*	*
	14	Γραβιά προς Αμφισσα 27,5 km (9)	B	38.6492	22.4154	CpGravR1	οκ	οκ	JQ24016 0	JQ239992	JQ240076
						CpGravR2	οκ	οκ	JQ24016 1	JQ239993	JQ240077
						CpGravR3	*	οκ	JQ24016 2	JQ239994	JQ240078
						CpGravR4	οκ	οκ	JQ24016 3	JQ239995	JQ240079
						CpGravR5_1	οκ	οκ	JQ24016 4	JQ239996	JQ240080
						CpGravR5_2	οκ	οκ	JQ24016 5	JQ239997	JQ240081
						CpGravR6_1	οκ	οκ	JQ24016 6	JQ239998	JQ240082
						CpGravR6_2	οκ	*	JQ24016 7	JQ239999	JQ240083
	15	Σκαμνός, 1,2 km ανατολικά από Μπράλος προς Θερμοπύλες (2)	B	38.752941	22.453308	CpSka_1	οκ	οκ	JQ24016 9	JQ240001	JQ240085
CpSka_2						οκ	οκ	οκ	*	fail per	
16	Θερμοπύλες προς Ανάβρα 5 km (2)	B	38.78489	22.58248	CpThe_1	οκ	οκ	JQ24017 0	JQ240002	JQ240086	
					CpThe_2	οκ	οκ	οκ	*	οκ	
<i>C. eucineteta</i>	17	Καλάβρυτα προς Λαγκοβούνι 6 km (2)	A	38.01726	22.07513	Ceu_LAG_2	οκ	οκ	JQ24010 3	JQ239934	JQ240018
						CE_LAG_1	οκ	οκ	*	οκ	*

	18	Μυστράς (2)	A	37.069405	22.382069	CeuMist1	mist 3	mist 3 het	JQ24010 4	JQ239939	JQ240019
						CeuMist2	mist 5	mist 5 het	JQ24010 5	JQ239940	JQ240020
	19	Παναχαϊκό, 1800m υψόμετρο (7)	A	38.213333	21.874722	Ceu_PAN_1	οκ	οκ	JQ24010 6	JQ239935	JQ240021
						Ceu_PAN_2	οκ	*	JQ24010 7	JQ239936	JQ240022
						Ceu_PAN_3	*	οκ	JQ24010 8	JQ239937	JQ240023
						Ceu_PAN_4	οκ	οκ	JQ24010 9	JQ239938	JQ240024
						CPAN1	οκ	οκ	οκ	*	*
						CPAN2	οκ	οκ	*	*	*
						CPAN3	οκ	οκ	*	*	*
	20	Ορος Λάμπεια (1)	A	37.8586111 1	21.807222 22	CLAMB1	οκ	οκ	*	*	*
21	Πύργιος Μάνης (2)	A	36.655487	22.434983	CPIR1	οκ	οκ	*	οκ	οκ	
					CPIR2	οκ	οκ	*	οκ	οκ	
<i>C. intusplicata</i>	22	Κορυφή όρους Μαινάλου (3)	A	37.6565	22.2623	Ci_MEN_1	οκ	οκ	JQ24012 4	JQ239956	JQ240040
						Ci_MEN_2	*	οκ	JQ24012 5	JQ239957	JQ240041
						Ci_MEN_12	οκ	οκ	JQ24013 4	JQ239966	JQ240050
	23	Μαίναλο 1053m (5)	A	37.6643	22.1936	C_MEN_15R1	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						C_MEN_16R2	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						C_MEN_17R3	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						C_MEN_18R4_1	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						C_MEN_19R4_2	οκ	*	οκ	οκ	οκ
	24	Μαίναλο 1455m (5)	A	37.6643	22.1936	C_MEN_20R1	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						C_MEN_21R2_1	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ

					C_MEN_22R2_2	OK	OK	OK	OK	OK	
					C_MEN_23R3_1	OK	OK	OK	OK	OK	
					C_MEN_24R3_2	OK	OK	OK	OK	OK	
25	Μαίναλο 1633m (7)	A	37.6565	22.2623	Ci_MEN_25R1_1	OK	*	OK	*	OK	
					Ci_MEN_26R1_2	OK	OK	OK	*	OK	
					Ci_MEN_27R1_3	OK	OK	OK	OK	OK	
					Ci_MEN_28R1_4	OK	OK	OK	OK	OK	
					Ci_MEN_29R2_1	OK	OK	OK	OK	OK	
					Ci_MEN_30R2_2	OK	OK	OK	OK	OK	
					Ci_MEN_31R3	OK	OK	OK	OK	OK	
26	Διακοπτό (2)	A	c	22.19436	Ci_DIA_1	OK	OK	JQ24014_6	JQ239978	JQ240062	
					Ci_DIA_2	OK	OK	JQ24014_7	JQ239979	JQ240063	
27	Διακοπτό προς Καλάβρυτα (3)	A	38.09946	22.17053	Ci_MSP_1	OK	OK	JQ24014_8	JQ239980	JQ240064	
					Ci_MSP_2	OK	OK	JQ24014_9	JQ239981	JQ240065	
					Ci_MSP_3	OK	OK	JQ24015_0	JQ239982	JQ240066	
28	Πλανητέρο, Χελμός (3)	A	37.933764	22.164917	CiPLAN1	OK	OK	JQ24015_1	JQ239983	JQ240067	
					CiPLAN2	OK	OK	JQ24015_2	JQ239984	JQ240068	
					CiPLAN3	OK	OK	JQ24015_3	JQ239985	JQ240069	
<i>C. helenae</i>	29	Κορυφή όρους Μαινάλου (11)	A	37.6565	22.2623	Ch_MEN_3	OK	OK	JQ24012_6	JQ239958	JQ240042
					Ch_MEN_4	OK	OK	JQ24012_7	JQ239959	JQ240043	
					Ch_MEN_5	*	OK	JQ24012_8	JQ239960	JQ240044	

						Ch_MEN_6	*	οκ	JQ24012 9	JQ239961	JQ240045
						Ch_MEN_7	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ
						Ch_MEN_8	οκ	οκ	JQ24013 0	JQ239962	JQ240046
						Ch_MEN_9	οκ	οκ	JQ24013 1	JQ239963	JQ240047
						Ch_MEN_10	οκ	οκ	JQ24013 2	JQ239964	JQ240048
						Ch_MEN_11	οκ	οκ	JQ24013 3	JQ239965	JQ240049
						Ch_MEN_13	οκ	οκ	JQ24013 5	JQ239967	JQ240051
						Ch_MEN_14	οκ	οκ	JQ24013 6	JQ239968	JQ240052
30	Τρίπολη προς Λεβίδι 2km (5)	A	37.664654	22.302933		Ch_LEV_1	οκ	οκ	JQ24013 7	JQ239969	JQ240053
						Ch_LEV_2	οκ	οκ	JQ24013 8	JQ239970	JQ240054
						Ch_LEV_3	οκ	οκ	JQ24013 9	JQ239971	JQ240055
						Ch_LEV_4	οκ	οκ	JQ24014 0	JQ239972	JQ240056
						Ch_LEV_5	οκ	οκ	JQ24014 1	JQ239973	JQ240057
31	Τρίπολη προς Μαίναλο 1,5 km (4)	A	37.520001	22.356834		ChTM4_1	οκ	οκ	JQ24014 2	JQ239974	JQ240058
						ChTM4_2	οκ	οκ	JQ24014 3	JQ239975	JQ240059
						ChTM4_3	οκ	οκ	JQ24014 4	JQ239976	JQ240060
						ChTM5_1	οκ	οκ	JQ24014 5	JQ239977	JQ240061
<i>Levantina spiriplana</i>	Προφήτης Ηλίας 450m υψόμετρο (1)	Γ	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο	FC5418 Levantin	οκ	οκ	JQ24017 1	JQ240003	JQ240087	

<i>Assyriella naegelei</i>		Φρούριο Κοζάνη, 400m υψόμετρο (1)	Δ	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο	Assyriella	οκ	οκ	JQ24017 2	JQ240004	JQ240088
----------------------------	--	--------------------------------------	---	-----------------	-----------------	------------	----	----	--------------	----------	----------

* η αλληλουχία δεν αποκτήθηκε, Α: Πελοπόννησος, Β: Στερεά Ελλάδα, Γ: νήσος Χάλκη, Δ: Τουρκία

ΠΡΟΤΟΚΟΛΛΟ 1: ΕΞΑΓΩΓΗ CTAB

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ CTAB 2x

[20ml → 28 δείγματα]

Υλικά

- 1) 0.4g CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)
- 2) 0.4g Polyvinylpyrrolidon
- 3) 0.242g Tris [όχι Tris-HCl]
- 4) 1.636g Sodium Chloride (NaCl)
- 5) 0.148g EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

Βήματα:

- 1) Προσθέτουμε 15ml dH₂O (απιονισμένο νερό) σε ποτήρι ζέσεως.
- 2) Βάζουμε ένα μαγνήτη και τοποθετώ το ποτήρι στη συσκευή ανάδευσης
 - Επιλέγω μέτρια ταχύτητα ανάδευσης
 - Επιλέγω ανάδευση υπό θερμότητα

[Δεν αυξάνω πολύ τη θερμοκρασία για να μην έχω σημαντική εξάτμιση νερού. Θέλω απλά να επιταχύνω την αντίδραση προσφέροντας ένα ποσό θερμότητας, καθώς είναι ενδόθερμη.]
- 3) Προσθέτουμε τα υλικά με τη σειρά που αναγράφονται παραπάνω.
 - Είναι σημαντική η ακριβής μέτρηση της ποσότητας κάθε αντιδρώντος, ώστε να πετύχουμε τελικά το επιθυμητό pH (7.92-8.02)
 - Τα υλικά πρέπει να προστίθενται σταδιακά σε μικρές ποσότητες, όχι ολόκληρη η ποσότητα απευθείας.
- 4) Αφού διαλυθούν τα υλικά, απομακρύνουμε το ποτήρι από τη συσκευή ανάδευσης και αφήνουμε το διάλυμα σε ηρεμία, ώστε να εξαφανιστεί ο αφρός.
- 5) Αφού εξαφανιστεί ο αφρός συμπληρώνουμε με dH₂O, για τελικό όγκο 20ml.
- 6) Με τη συσκευή μέτρησης pH υπολογίζουμε το pH του διαλύματος.
 - Βέλτιστο pH=8
 - Δεκτές τιμές pH σε εύρος από 7.92, έως 8.02
 - Αν η τιμή είναι χαμηλότερη ή υψηλότερη από το παραπάνω εύρος, τη μεταβάλλουμε προσθέτοντας είτε βάση (NaOH, 10N), είτε οξύ (HCl) αντίστοιχα.
- 7) Μετά από 20 min κάνουμε δεύτερη μέτρηση pH ώστε να σιγουρευτούμε πως δεν μεταβλήθηκε.
 - Αν η τιμή μεταβλήθηκε και βγήκε εκτός του επιθυμητού εύρους, πραγματοποιούμε ξανά το παραπάνω βήμα (προσθήκη βάσης ή οξέος).
- 8) Τέλος, τοποθετούμε το διάλυμα σε γυάλινη φιάλη και το διατηρούμε σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Αναγράφονται η ημερομηνία σύνθεσης και το pH.
 - Το διάλυμα διατηρείται για 1 μήνα, αλλά είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται «φρέσκο».

ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΜΕ CTAB

[τροποποιημένο από Winnepenninckx et al., 1993]

Βήματα:

1) Προσθέτουμε **350** λ Extraction Buffer (CTAB) σε κάθε δείγμα.

2) Ομογενοποιούμε τον ιστό μέσα στο eppendorf.

3) Προσθέτουμε **350** λ Extraction Buffer (CTAB) σε κάθε δείγμα.

- Στοχεύουμε σε τελικό όγκο Extraction Buffer 700λ (350+350). Ο τελικός αυτός όγκος μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ποσότητα του ιστού. Για μικρότερη ποσότητα ιστού μειώνουμε τον όγκο του Extraction Buffer και αναλογικά προσαρμόζουμε τις ποσότητες των υπόλοιπων αντιδραστηρίων.

4) Τοποθετούμε τα δείγματα για **10 λεπτά** στους **55-60 ° C**.

5) Προσθέτουμε **10 λ Proteinase-K** (20mg/ml) σε κάθε δείγμα και αναδεύουμε καλά [ανάδευση «σάντουιτς»].

- Ανάδευση «σάντουιτς»:

Τα δείγματα βρίσκονται σε στατώ. Τοποθετούμε ένα δεύτερο στατώ πάνω στα δείγματα, καταλήγοντας σε δομή σαν σάντουιτς. Κρατάμε σταθερά και τα δύο στατώ με τα δείγματα να βρίσκονται κεντρικά. Ανακινούμε στρέφοντας 180° μπρος-πίσω για 1-2 min.

6) Τοποθετούμε τα δείγματα στο thermoshaker.

- **Θερμοκρασία:** 60 ° C
- **Στροφές:** 600 rpm
- **Χρόνος:** 3-4 ώρες ή overnight

Αφού ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο, μπορούμε να φυλάξουμε τα δείγματα στους **-20° C** ώστε να συνεχίσουμε την διαδικασία κάποια άλλη στιγμή

- Προετοιμάζουμε **2 νέες σειρές eppendorfs** για επόμενα στάδια. Κάθε σειρά eppendorfs πρέπει να προετοιμαστεί αριθμώντας τα eppendorfs, ώστε να είναι διακριτά το ένα από το άλλο.

7) Προσθέτουμε **700** λ χλωροφόρμιο (στάδιο αφαίρεσης πρωτεϊνών) και αναδεύουμε καλά [ανάδευση «σάντουιτς»].

- Ο όγκος του χλωροφορμίου πρέπει να είναι ίσος με τον όγκο του Extraction Buffer (CTAB).

Ακολουθεί αναλυτικά το πρωτόκολλο εξαγωγής DNA. Τα βήματα που αναφέρονται, πραγματοποιούνται μετά το στάδιο overnight εξάτμισης της αιθανόλης. Βέλτιστη ποσότητα δείγματος για την συγκεκριμένη διαδικασία θεωρείται προσεγγιστικά μια ποσότητα που φτάνει μέχρι την ένδειξη 0.1 του eppendorf. Σε περίπτωση που δεν έχουμε τη δυνατότητα να παραλάβουμε τέτοια ποσότητα ιστού, είτε συνεχίζουμε κανονικά το πρωτόκολλο, είτε προσαρμόζουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων.

8) Φυγοκεντρούμε τα δείγματα.

- **Στροφές:** 13000 rpm
- **Χρόνος:** 15 min

Διαδικασία προετοιμασίας tips με φαρδιά άκρα για παραλαβή του υπερκείμενου της φυγοκέντρωσης: Παίρνουμε μεγάλα tips (μπλε) και στοχεύουμε σε αριθμό διπλάσιο των δειγμάτων. Αποστειρώνουμε ένα ψαλίδι με χρήση φωτιάς και αιθανόλης. Κόβουμε την άκρη του κάθε tip υπολογίζοντας 2-3 mm.

9) Στο τέλος της φυγοκέντρωσης έχουν δημιουργηθεί 3 φάσεις [κάτω: χλωροφόρμιο, μέση: πρωτεΐνες, πάνω: υδατική+DNA]. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης συλλέγεται χρησιμοποιώντας τα tips με φαρδιά άκρα και τοποθετείται σε νέα eppendorfs (μια εκ των 2 σειρών που προετοιμάστηκαν προηγουμένως).

- ΠΡΟΣΟΧΗ να μην παραλάβουμε τη μεσαία φάση, αλλά ούτε και να την διαταράξουμε.
- Το υπερκείμενο αντιστοιχεί σε όγκο **700 λ**.

10) Προσθέτουμε 700λ χλωροφόρμιο και αναδεύουμε καλά [ανάδευση «σάντουιτς»].

11) Φυγοκεντρούμε τα δείγματα.

- **Στροφές:** 13000 rpm
- **Χρόνος:** 15 min

12) Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης συλλέγεται χρησιμοποιώντας τα tips με φαρδιά άκρα και τοποθετείται σε νέα eppendorfs (τη δεύτερη σειρά από αυτές που προετοιμάστηκαν προηγουμένως).

13) Προσθέτουμε **1000 λ** ισοπροπανόλης και αναδεύουμε καλά [ανάδευση «σάντουιτς»].

14) Τοποθετούμε τα δείγματα στους **-20 ° C** για **0.5-2 ώρες**.

Σε αυτό το στάδιο, μπορούμε να φυλάξουμε τα δείγματα στους **-20° C overnight**, ώστε να συνεχίσουμε την διαδικασία την επόμενη μέρα

15) Φυγοκεντρούμε τα δείγματα.

- **Στροφές:** 13000 rpm
- **Χρόνος:** 20 min

16) Πετάμε το υπερκείμενο.

- Για την απόρριψη του υπερκείμενου δεν χρειάζεται να χρησιμοποιήσουμε πιπέτα. Απλά αναποδογυρίζω το eppendorf.
- ΠΡΟΣΟΧΗ. Δεν χτυπάω το eppendorf για να φύγει μέχρι και η τελευταία σταγόνα. Απλά το αναποδογυρίζω.

17) Προσθέτουμε 500λ αιθανόλης 70%.

18) Φυγοκεντρούμε τα δείγματα.

- **Στροφές:** 13000 rpm
- **Χρόνος:** 15 min

19) Πετάμε το υπερκείμενο (όπως στο βήμα 16).

ΠΡΟΤΟΚΟΛΛΟ 2: ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΜΕ NH₄Ac

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ NH₄Ac

Υλικά

- 1) 20mL dH₂O
- 2) 12.33g 8M NH₄Ac (MB=77g/mol)

Βήματα:

- 1) Προσθέτουμε **20ml dH₂O** (απιονισμένο νερό) σε ποτήρι ζέσεως.
- 2) Βάζουμε ένα μαγνήτη και τοποθετώ το ποτήρι στη συσκευή ανάδευσης
 - Επιλέγω μέτρια ταχύτητα ανάδευσης
 - ΔΕΝ θερμαίνω. [υπό θέρμανση απελευθερώνεται τοξική αέρια ουσία]
- 3) Προσθέτουμε το NH₄Ac.
- 4) Αφού διαλυτοποιηθεί, με τη συσκευή μέτρησης pH υπολογίζουμε το pH του διαλύματος.
 - Βέλτιστο pH=7.5
 - Αν η τιμή είναι υψηλότερη από την βέλτιστη, τη μειώνουμε προσθέτοντας Glucial Acetic acid.
- 5) Τέλος, τοποθετούμε το διάλυμα σε γυάλινη φιάλη και το διατηρούμε σε ψυγείο (T=2.8ο C)
 - Αναγράφονται η ημερομηνία σύνθεσης και το pH.
 - Το διάλυμα διατηρείται για 1 μήνα, αλλά είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται «φρέσκο».

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΜΕ NH₄Ac

Βήματα :

- 1) Για αντίδραση όγκου 25λ, βάζουμε 11λ NH₄Ac και 33λ 100% αιθανόλη (ή 37.5λ 95% αιθανόλη).
Για αντίδραση όγκου 50λ, βάζουμε 22λ NH₄Ac και 66λ 100% αιθανόλη (ή 75λ 95% αιθανόλη).
- 2) Αναδεύουμε σε vortex.

3) Αφήνουμε τα δείγματα σε ηρεμία και θερμοκρασία δωματίου για 15 min.

4)

Description (locus): COI						
PCR MEGA-MIX				Composition of Cycles		
	STOCK	Concentration	One reaction (25 µL)	Stage	°C	Time
Taq buffer A + MgCl ₂ + 1.5	10X	1X	2.5	Pro-incubation	95	3'
MgCl ₂	25mM	3,5 mM	2	Denaturation	94	15"
dNTP's	10mM	0,2 mM	0.5	Annealing	45	1'
Primer A- L1490-Alb	10µM	0,4 µM	1	Extension	72	1,5'
Primer B- H2198-Alb	10µM	0,4 µM	1	Another Step	72	10'
Taq polymerase	5u/λ	0.02	0.1	Number of cycles	39	
Detergent W	1%		0	Standby temp.	16	
BSA	10 mg/ml	1 µg/µl	0	Programme	COD_COI 45	
ddH ₂ O			16,9	BIORAD		

Φυγοκεντρούμε τα δείγματα.

- Στροφές: 11000 rpm
- Χρόνος: 45 min

5) Αναποδογυρίζουμε τα erpendorfs σε χαρτί και χτυπούμε ήπια για να απομακρύνουμε την αιθανόλη.

6) Προσθέτουμε 50λ αιθανόλης 70%.

7) Φυγοκεντρούμε τα δείγματα.

- Στροφές: 11000 rpm
- Χρόνος: 10 min

8) Αναποδογυρίζουμε τα erpendorfs σε χαρτί και χτυπούμε ήπια για να απομακρύνουμε την αιθανόλη.

9) Προσθέτουμε 30 λ ddH₂O.

10) Αφήνουμε τα δείγματα για τουλάχιστον 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.

11) Μπορούμε να αποθηκεύσουμε τα δείγματα στους -20 ° C.

3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ PCR ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΤΟΠΟΥΣ COI, COII, ITS1 & ITS2

Description (locus): COII						
PCR MEGA-MIX				Composition of Cycles		
	STOCK	Concentration	One reaction (25µL)	Stage	°C	Time
Taq buffer	10X	1X	2.5	Pro-incubation	95	3'
MgCl ₂	50mM	3,5 mM	1	Denaturation	94	15"
dNTP's	10mM	0,2 mM	0.5	Annealing	45	45"
Primer A-Snail_COII_R	10µM	0,4 µM	1	Extension	72	1'
Primer B-Snail_COII F	10µM	0,4 µM	1	Another Step	72	10'
Taq polymerase	5u/λ	0.02	0.1	Number of cycles	20	
Detergent W	1%		0	Standby temp.	16	
BSA	10 mg/ml	1 µg/µl	0	Programme	coii	
ddH ₂ O			16.9	BIORAD		

Description (locus): 16S rDNA						
PCR MEGA-MIX x 2				Composition of Cycles		
	STOCK	Concentration	One reaction (50µL)	Stage	°C	Time
Taq buffer	10X	1X	2.5	Pro-incubation	95	3'
MgCl ₂	25 mM	3.5 mM	2	Denaturation	94	15"
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5	Annealing	42	1'
Primer A 16SAR LR N12887	10 µM	0.4 µM	1	Extension	72	1,5'
Primer B 16SBR LR J13398	10 µM	0.4 µM	1	Another Step	72	10'
Taq polymerase	5 u/λ	0.02 u/λ	0.1	Number of cycles	39	
Detergent W	1%		0	Standby temp.	16	
BSA	10	1 µg/µl	0	Programme	Coi_50_16scon	
ddH ₂ O			17.9	BIORAD		

Description (locus): ITS1						
PCR MEGA-MIX				Composition of Cycles		
	STOCK	Concentration	One reaction (25 µL)	Stage	°C	Time
Taq buffer	5X	1X	5	Pro-incubation	95	5'
MgCl ₂	25mM	3.5mM	3.5	Denaturation	95	1'
dNTP's	10mM	0,2 mM	0.5	Annealing	55	1'
Primer A: ITS1 sn F	10µM	0,2 µM	0.5	Extension	72	2'
Primer B: ITS1 sn R	10µM	0,2 µM	0.5	Another Step	72	5'
Taq polymerase	5u/λ	0.03	0.15	Number of cycles	35	

Detergent W	1%		0	Standby temp.	16
BSA	10 mg/ml	1 µg/µl	0	Programme	Codringtonia_ITS1
ddH₂O			16.9	Invitrogen	

Description (locus): ITS2						
PCR MEGA-MIX			Composition of Cycles			
	STOCK	Concentration	One reaction (25 µL)	Stage	°C	Time
Taq buffer	5X	1X	5	Pro-incubation	94	5'
MgCl₂	25mM	3.5mM	3.5	Denaturation	94	1'
dNTP's	10mM	0,5 mM	1.25	Annealing	53	1'
Primer A: LSU1	10µM	0,3 µM	0.75	Extension	72	2'
Primer B: LSU3	10µM	0,3 µM	0.75	Another Step	72	5'
Taq polymerase	5u/λ	0.1	0.15	Number of cycles	35	
Detergent W	1%			Standby temp.	4	
BSA	10 mg/ml	1 µg/µl	0	Programme	Codringtonia_ITS2	
ddH₂O			12.6	Invitrogen		

Συμπληρωματικά Αποτελέσματα

Πίνακας Π2. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών για το γονίδιο **COI** εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

εντός		<i>C.gittenbergeri</i>	<i>C.elisabethae</i>	<i>C.intusplicata</i>	<i>C.helenae</i>	<i>C.codringtonii</i>	<i>C.eucineta</i>	<i>C.parnassia</i>	Εξωομάδα
0.0012	<i>C.gittenbergeri</i>		0.009	0.086	0.061	0.110	0.080	0.129	0.156
0.0102	<i>C.elisabethae</i>	0.014		0.085	0.054	0.101	0.075	0.123	0.149
0.0330	<i>C.intusplicata</i>	0.103	0.107		0.095	0.101	0.070	0.116	0.132
0.0014	<i>C.helenae</i>	0.062	0.060	0.112		0.097	0.074	0.131	0.160
0.0236	<i>C.codringtoni</i>	0.122	0.118	0.130	0.109		0.080	0.119	0.144
0.0692	<i>C.eucineta</i>	0.115	0.115	0.121	0.109	0.127		0.110	0.124
0.0392	<i>C.parnassia</i>	0.149	0.148	0.152	0.151	0.151	0.165		0.130
0.1239	Εξωομάδα	0.219	0.216	0.210	0.222	0.218	0.220	0.212	

Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις

Πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση.

Με **κόκκινο** χρώμα επισημαίνεται η **μέγιστη** τιμή, ενώ με **γαλάζιο** η **μικρότερη** σε ένδο- και δια- ειδικό επίπεδο, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι εξωομάδες.

Πίνακας Π3. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών για το γονίδιο **COII** εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

εντός		<i>C.intusplicata</i>	<i>C.gittenbergeri</i>	<i>C.elisabethae</i>	<i>C.helenae</i>	<i>C.codringtoni</i>	<i>C.eucineta</i>	<i>C.parnassia</i>	Εξωομάδα
0.0340	<i>C.intusplicata</i>		0.095	0.094	0.109	0.113	0.081	0.171	0.225
0.0031	<i>C.gittenbergeri</i>	0.113		0.005	0.047	0.100	0.075	0.190	0.219
0.0110	<i>C.elisabethae</i>	0.116	0.013		0.047	0.097	0.076	0.190	0.224
0.0028	<i>C.helenae</i>	0.127	0.049	0.054		0.107	0.092	0.180	0.226
0.0161	<i>C.codringtoni</i>	0.138	0.109	0.110	0.117		0.072	0.170	0.237
0.0616	<i>C.eucineta</i>	0.129	0.107	0.112	0.124	0.110		0.141	0.171
0.0535	<i>C.parnassia</i>	0.215	0.218	0.222	0.208	0.205	0.199		0.237
0.1416	Εξωομάδα	0.313	0.292	0.300	0.298	0.315	0.272	0.334	

Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις

Πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση.

Με **κόκκινο** χρώμα επισημαίνεται η **μέγιστη** τιμή, ενώ με **γαλάζιο** η **μικρότερη** σε ένδο- και δια- ειδικό επίπεδο, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι εξωομάδες.

Πίνακας Π4. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών για το γονίδιο **16S** rDNA εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

εντός		<i>C.parnassia</i>	<i>C.codringtonii</i>	<i>C.elisabethae</i>	<i>C.intusplacata</i>	<i>C.eucineta</i>	<i>C.gittenbergeri</i>	<i>C.helenae</i>	<i>Εξωομάδα</i>
0.0441	<i>C.parnassia</i>		0.112	0.103	0.077	0.096	0.112	0.108	0.190
0.0156	<i>C.codringtonii</i>	0.142		0.076	0.066	0.079	0.084	0.101	0.233
0.0106	<i>C.elisabethae</i>	0.130	0.089		0.039	0.050	0.008	0.026	0.212
0.0339	<i>C.intusplacata</i>	0.116	0.091	0.061		0.042	0.043	0.049	0.214
0.0341	<i>C.eucineta</i>	0.135	0.104	0.072	0.076		0.064	0.060	0.188
0.0018	<i>C.gittenbergeri</i>	0.135	0.093	0.014	0.061	0.082		0.029	0.242
0.0065	<i>C.helenae</i>	0.133	0.112	0.035	0.070	0.081	0.033		0.215
0.0741	<i>Εξωομάδα</i>	0.249	0.278	0.255	0.268	0.242	0.280	0.280	

Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις

Πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση.

Με **κόκκινο** χρώμα επισημαίνεται η **μέγιστη** τιμή, ενώ με **γαλάζιο** η **μικρότερη** σε ένδο- και δια- ειδικό επίπεδο, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι εξωομάδες.

Πίνακας Π5. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών για το γονίδιο **ITS1** εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

εντός		<i>Εξωομάδα</i>	<i>C.helenae</i>	<i>C.parnassia</i>	<i>C.intusplacata</i>	<i>C.gittenbergeri</i>	<i>C.eucineta</i>	<i>C.elisabethae</i>	<i>C.codringtoni</i>
0.0086	<i>Εξωομάδα</i>		0.0600	0.0658	0.0595	0.0639	0.0633	0.0630	0.0613
0.0009	<i>C.helenae</i>	0.0648		0.0061	0.0001	0.0076	0.0085	0.0074	0.0077
0.0031	<i>C.parnassia</i>	0.0716	0.0081		0.0055	0.0130	0.0137	0.0128	0.0129
0.0013	<i>C.intusplacata</i>	0.0644	0.0011	0.0077		0.0075	0.0082	0.0072	0.0074
0.0009	<i>C.gittenbergeri</i>	0.0687	0.0085	0.0150	0.0085		0.0012	0.0002	0.0004
0.0016	<i>C.eucineta</i>	0.0684	0.0097	0.0161	0.0097	0.0025		0.0010	0.0020
0.0000	<i>C.elisabethae</i>	0.0673	0.0078	0.0143	0.0079	0.0007	0.0018		0.0001
0.0026	<i>C.codringtoni</i>	0.0669	0.0094	0.0158	0.0094	0.0022	0.0041	0.0015	

Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις

Πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση.

Με **κόκκινο** χρώμα επισημαίνεται η **μέγιστη** τιμή, ενώ με **γαλάζιο** η **μικρότερη** σε ένδο- και δια- ειδικό επίπεδο, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι εξωομάδες.

Πίνακας Π6. Γενετικές αποστάσεις εντός και μεταξύ των ειδών για το γονίδιο **ITS2** εφαρμόζοντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

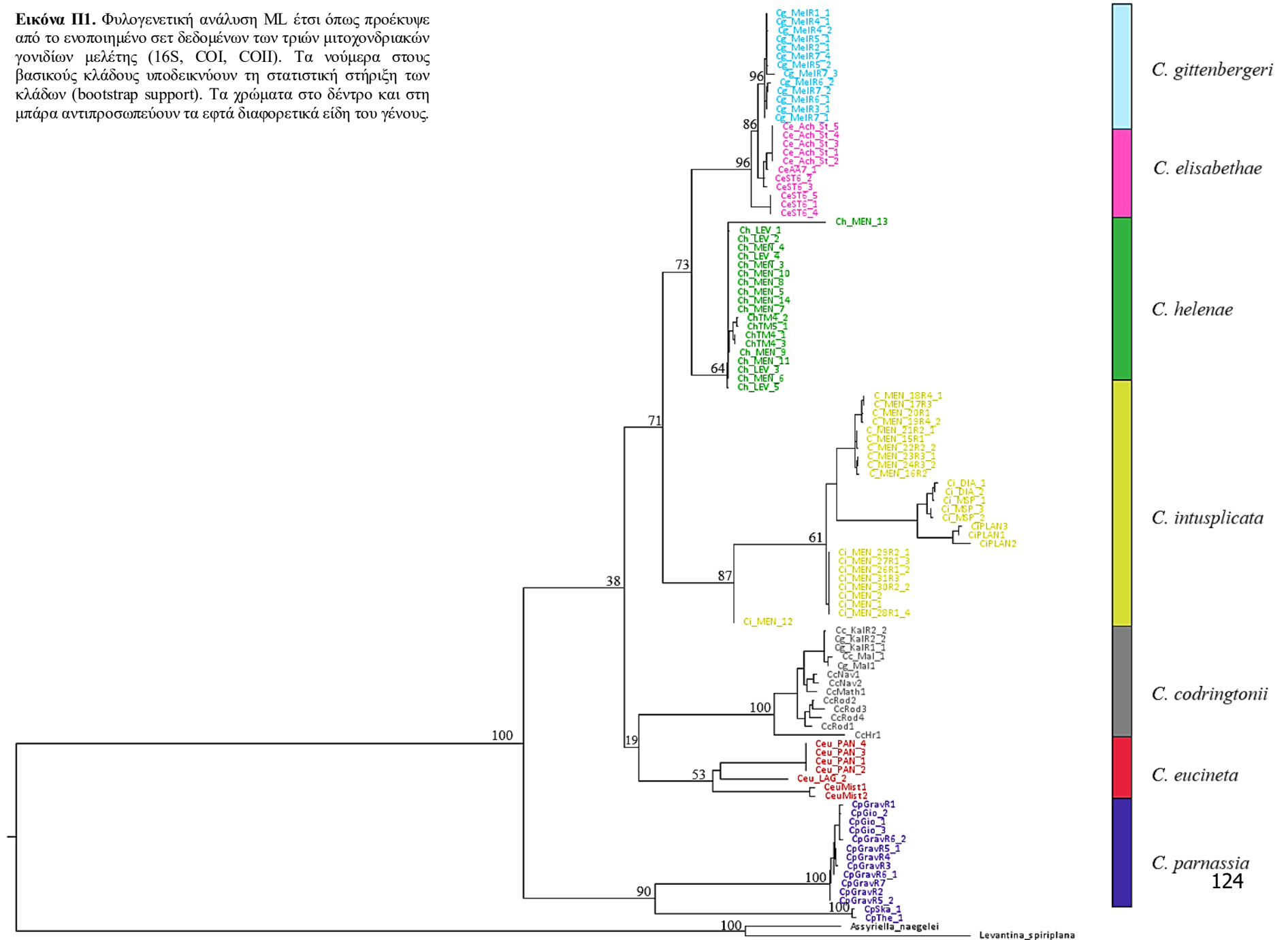
Εντός		<i>Εξωομάδα</i>	<i>C.eucineta</i>	<i>C.intusplicata</i>	<i>C.codringtoni</i>	<i>C.elisabethae</i>	<i>C.gittenbergeri</i>	<i>C.helenae</i>	<i>C.parnassia</i>
0.0025	<i>Εξωομάδα</i>		0.0619	0.0721	0.0684	0.0601	0.0623	0.0690	0.0598
0.0097	<i>C.eucineta</i>	0.0680		0.0130	0.0039	0.0049	0.0061	0.0124	0.0134
0.0022	<i>C.intusplicata</i>	0.0745	0.0190		0.0137	0.0118	0.0131	0.0001	0.0213
0.0005	<i>C.codringtoni</i>	0.0699	0.0090	0.0150		0.0036	0.0047	0.0131	0.0143
0.0007	<i>C.elisabethae</i>	0.0617	0.0101	0.0133	0.0042		0.0002	0.0114	0.0120
0.0000	<i>C.gittenbergeri</i>	0.0635	0.0109	0.0142	0.0050	0.0006		0.0127	0.0131
0.0024	<i>C.helenae</i>	0.0714	0.0184	0.0024	0.0145	0.0129	0.0139		0.0204
0.0020	<i>C.parnassia</i>	0.0621	0.0193	0.0234	0.0156	0.0134	0.0141	0.0226	

Κάτω από τη διαγώνιο είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις

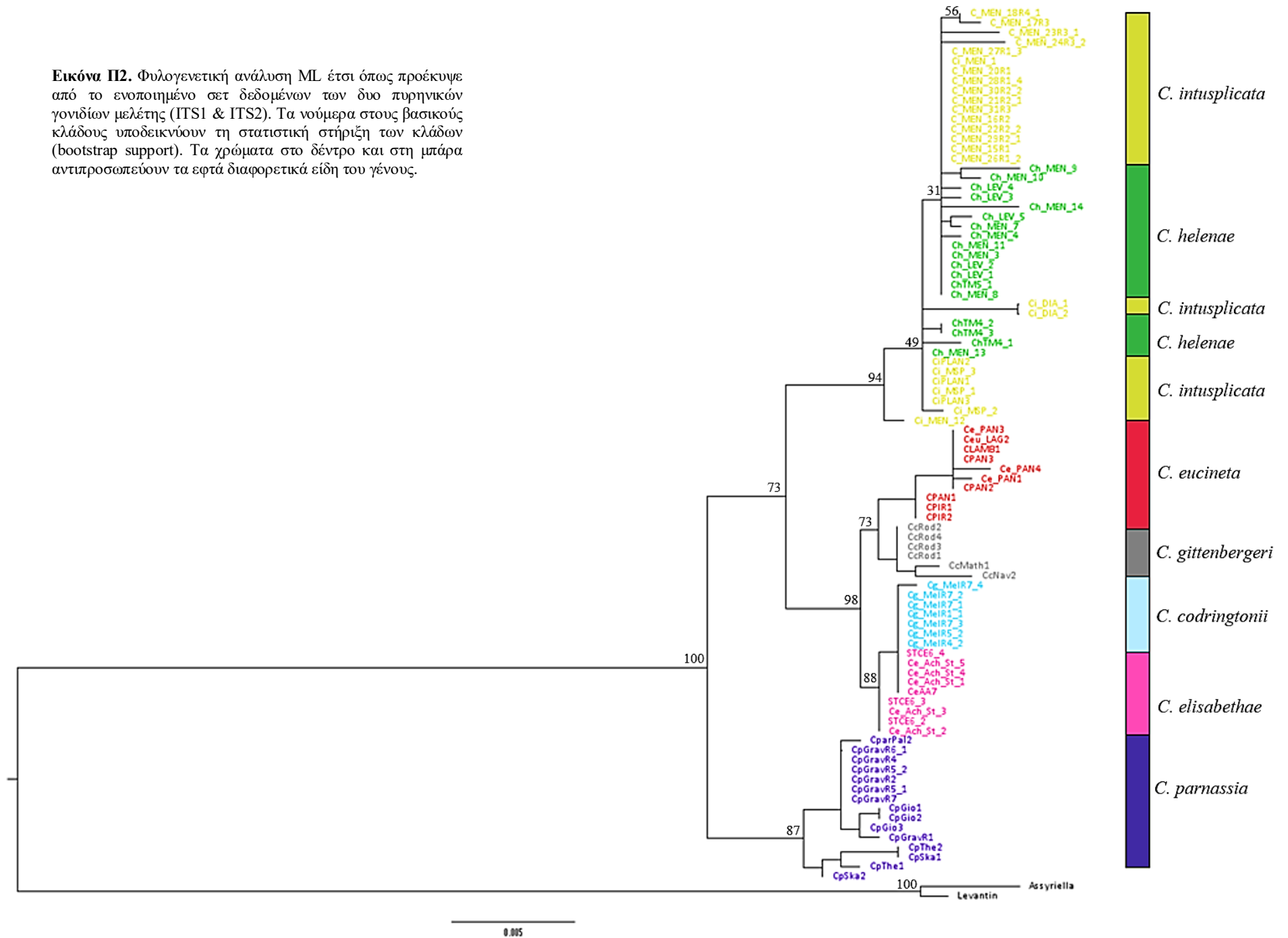
Πάνω από αυτή είναι οι δια-ειδικές γενετικές αποστάσεις σταθμισμένες με την ενδο-ειδική διαφοροποίηση.

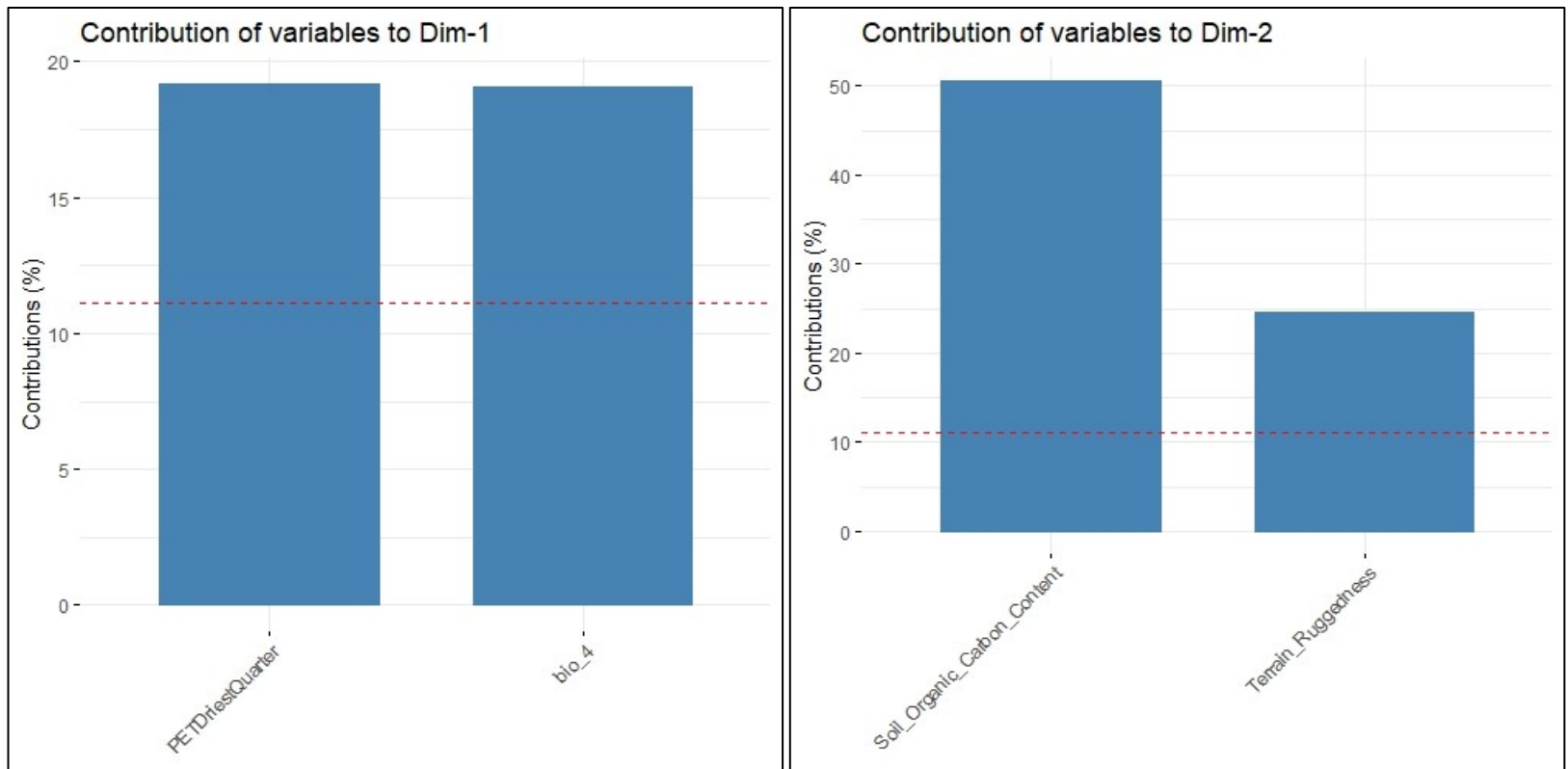
Με **κόκκινο** χρώμα επισημαίνεται η **μέγιστη** τιμή, ενώ με **γαλάζιο** η **μικρότερη** σε ένδο- και δια- ειδικό επίπεδο, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι εξωομάδες.

Εικόνα III. Φυλογενετική ανάλυση ML έτσι όπως προέκυψε από το ενοποιημένο σετ δεδομένων των τριών μιτοχondριακών γονιδίων μελέτης (16S, COI, COII). Τα νούμερα στους βασικούς κλάδους υποδεικνύουν τη στατιστική στήριξη των κλάδων (bootstrap support). Τα χρώματα στο δέντρο και στη μπάρα αντιπροσωπεύουν τα επτά διαφορετικά είδη του γένους.



Εικόνα Π2. Φυλογενετική ανάλυση ML έτσι όπως προέκυψε από το ενοποιημένο σετ δεδομένων των δυο πυρηνικών γονιδίων μελέτης (ITS1 & ITS2). Τα νούμερα στους βασικούς κλάδους υποδεικνύουν τη στατιστική στήριξη των κλάδων (bootstrap support). Τα χρώματα στο δέντρο και στη μπάρα αντιπροσωπεύουν τα επτά διαφορετικά είδη του γένους.





Εικόνα Π3. Στα παραπάνω ιστογράμματα παρουσιάζονται οι δύο μεταβλητές που συνεισφέρουν περισσότερο στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες. Συγκεκριμένα, η πρώτη κύρια συνιστώσα (Dim1) (αριστερά) επηρεάστηκε ιδιαίτερα από την (εξατμισοδιαπνοή και την εποχικότητα θερμοκρασίας). Αντίστοιχα, η δεύτερη κύρια συνιστώσα (Dim2) (δεξιά) επηρεάστηκε από το οργανικό περιεχόμενο και το ανάγλυφο του εδάφους. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή στο παραπάνω γράφημα δείχνει την αναμενόμενη μέση συνεισφορά εάν η συνεισφορά των μεταβλητών ήταν ομοιόμορφη.

Δηλώνω ρητά ότι, το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.

Παπαδάκη Χρυσούλα

