



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μοριακή φυλογένεση ειδών χερσαίων σαλιγκαριών της
νοτιοανατολικής Ευρώπης για εύρεση συσχετισμού της γενεαλογίας με
αβιοτικά χαρακτηριστικά»**

Μάινου Ανδρονίκη-Ιωάννα

Μανωλούλη Ελίζαμπεθ-Δήμητρα

Μπίνια Μαρία

Νικολόπουλος Αντώνης

Βόλος 2021

**«Μοριακή φυλογένεση ειδών χερσαίων σαλιγκαριών της νοτιοανατολικής
Ευρώπης για εύρεση συσχετισμού της γενεαλογίας με αβιοτικά χαρακτηριστικά»**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- 1. Γκάφας Γεώργιος**, Επίκουρος Καθηγητής (Ph.D.), Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2. Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**, Καθηγητής (Ph.D.), Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3. Χατζηιωάννου Μαριάνθη**, Επίκουρη Καθηγήτρια (Δρ.), Εκτροφή Σαλιγκαριών και Βατράχων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Αφιερώνεται στις οικογένειές μας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μας κύριο Γεώργιο Γκάφα για την πολύτιμη βοήθειά του στη συγγραφή της προπτυχιακής διπλωματικής μας εργασίας, καθώς και για τη συνεργασία μας. Επίσης, ευχαριστούμε θερμά την κύρια Ιωάννα Σαραντοπούλου για τη βοήθειά της στην υλοποίηση του εργαστηριακού μέρους του πειράματος, καθώς και την κυρία Μαριάνθη Χατζηιωάννου για την παροχή των δειγμάτων των σαλιγκαριών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα έρευνα κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο από είδη χερσαίων γαστερόποδων που συναντώνται στην περιοχή της νοτιοανατολικής Ευρώπης, χρησιμοποιώντας ως μοριακό δείκτη το μιτοχondριακό γονίδιο 16S. Χρησιμοποιήθηκαν τα είδη *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, *Theba pisana* και *Cochlicella acuta* για την εξαγωγή του DNA κατά το πειραματικό μέρος, ενώ για τη δημιουργία του δέντρου προστέθηκαν επιπλέον και αλληλουχίες των οικογενειών Helicidae, Hygromiidae, Clausiliidae, Enidae, Zonitidae και Geomitridae. Σκοπός της εργασίας ήταν να ελεγχθεί μέσω της γενεαλογίας των ειδών εάν οι οικογένειες της περιοχής ενδιαφέροντος ακολουθούν το ίδιο μοτίβο ομαδοποίησης όσον αφορά τα αβιοτικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος διαβίωσης και της μορφολογίας. Τα αποτελέσματα αρχικά έδειξαν ότι οι οικογένειες Helicidae και Zonitidae ομαδοποιούνται με βάση τους αβιοτικούς παράγοντες, ωστόσο κατά την τελική ομαδοποίηση όπου λήφθηκε υπόψιν και η γενεαλογία συγκροτήθηκαν τρεις διαφορετικές ομάδες που αποτελούνταν από τις οικογένειες Helicidae, Hygromiidae και Geomitridae η πρώτη, Clausiliidae και Enidae η δεύτερη, ενώ τα είδη της οικογένειας Zonitidae συγκρότησαν μια ξεχωριστή ομάδα.

Λέξεις κλειδιά: φυλογενετική ανάλυση, χερσαία γαστερόποδα, νοτιοανατολική Ευρώπη, αβιοτικοί παράγοντες, ομαδοποίηση οικογενειών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αναφορά στην τεράστια ποικιλία των γαστερόποδων.....	1
1.2. Σύνδεση αβιοτικών παραγόντων με μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	3
1.3. Σύγκριση αβιοτικών παραγόντων βάση μοριακών δεικτών και φυλογένεσης.....	7
1.4. Αντίστοιχες έρευνες με είδη της νοτιοανατολικής Ευρώπης.....	9
1.5. Υπόθεση εργασίας.....	11

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή δειγμάτων.....	12
2.2. Εξαγωγή DNA.....	14
2.3. Ποσοτικοποίηση DNA.....	16
2.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	17
2.5. Gel ηλεκτροφόρηση.....	20
2.6. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing).....	21
2.7. Στατιστική ανάλυση.....	21

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Προϊόντα PCR.....	23
3.2. Bayesian analysis.....	23
3.3. Συσχετισμός αβιοτικών παραγόντων με τα είδη των οικογενειών.....	25
3.4. ANOVA.....	28

3.5. Συσχετισμός γενετικών ομαδοποιήσεων με αβιοτικά χαρακτηριστικά.....	33
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	37
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43
6. ABSTRACT.....	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αναφορά στην τεράστια ποικιλία των γαστερόποδων

Η εμφάνιση του φύλου Mollusca χρονολογείται πριν από την Καμβρία περίοδο και λόγω της τεράστιας ποικιλομορφίας τους, ανακαλύψεις της φυλογένεσής τους έχουν αμφισβητηθεί πολλές φορές. Ο αριθμός των οικογενειών των γαστερόποδων εκτιμάται σε περίπου 112 οικογένειες και οι αναγνωρισμένες οικογένειες των Στυλλοματοφόρων είναι 71-92. Οι κύριες ομάδες είναι οι Hydrocenoidea, Helicinoidea, Cyclophoroidea, Rissooidea, Littorinoidea, Ellobioidea, Onchidioidea, Rathouisioidea, Succineoidea και όλες οι υπερ-οικογένειες των Stylommatophora. Το γεγονός ότι τα χερσαία γαστερόποδα έχουν περίπου 35.000 αρτίγονα είδη, με πλειονότητα αυτών τα πνευμονοφόρα, τα καθιστά μία από τις πιο πετυχημένες και ποικίλες ομάδες των χερσαίων οικοσυστημάτων (Barker, 2001).

Οι θαλάσσιοι πρόγονοί των πνευμονοφόρων εξελίχθηκαν επιτυχώς σε χερσαίους και αποίκισαν και στην συνέχεια το γλυκό νερό (Barker, 2001 και Berrie, 1980).

Η κατανομή των γαστερόποδων έχει τεράστια ποικιλία με παρουσία τους από την Αρκτική και την Ανταρκτική μέχρι τροπικές περιοχές (Schmidt-Nielsen et. al., 1971 και Yom-Tov Y., 1970) και έχουν παρατηρηθεί από εδάφη και υπόγεια σπήλαια, σε σκουπιδότοπους και μέρη με χαμηλή βλάστηση, μέχρι και σε πετρώματα, επιφύσεις και θόλους δέντρων (Barker, 2001). Αξιοσημείωτη είναι για παράδειγμα η προσαρμογή των *Sphincterochila boissieri* και *Xerocrassa seetzeni* σε συνθήκες ερήμου (Schmidt-Nielsen et. al., 1971). Όσον αφορά την ποικιλομορφία τους στο βόρειο ημισφαίριο μπορεί να χαρακτηριστεί μικρή, αφού η εμφάνιση τους σε αυτό είναι σχετικά

πρόσφατη, εξελικτικά. Αντιθέτως σε νησιά και τροπικά δάση του νότιου ημισφαιρίου παρατηρείται η μεγαλύτερη ποικιλομορφία (Barker, 2001).

Σύμφωνα με τον Barker (2001) τα κύρια χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην επιλογή ενός οικοτόπου είναι τα ανόργανα ιόντα, το pH, η αποστράγγιση, η υφή του εδάφους, οι τοπικές μεταβολές της θερμοκρασίας, το υψόμετρο και τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την εύρεση καταφυγίου. Επίσης σημαντικούς παράγοντες αποτελούν και η εύρεση τροφής και η αλληλεπίδραση με άλλα είδη. Τα στυλλοματοφόρα έχουν συνήθως κυρίαρχο ρόλο στις χερσαίες πανίδες, ωστόσο υπάρχουν και περιοχές που αποτελούν απλά σημαντικό μέρος αυτών, όπως η Κεντρική Αμερική και τα νησιά της Καραϊβικής (Barker, 2001).

Η διατροφή των στυλλοματοφόρων αποτελείται στην πλειονότητα από αποσυντιθέμενους φυτικούς οργανισμούς, κάποια όμως τρέφονται και με ζωντανούς φυτικούς οργανισμούς, ενώ σε κάποια είδη έχει παρατηρηθεί και κανιβαλισμός (Barker, 2001).

Η πλειοψηφία των ενδημικών ειδών παρατηρείται συνήθως σε νησιά ή νησιωτικά συμπλέγματα και πολυετείς λίμνες (Parent & Crespi 2006, 2009 και Chiba 2010), λόγω του αποικισμού, της απομονωμένης εξέλιξης, του φαινομένου της εξαφάνισης κάποιων ειδών (Parent & Crespi 2006, 2009 και Holland & Cowie, 2007), της ποικιλομορφίας των οικοτόπων τους, της γεωλογίας τους και της ηλικίας τους (Holland & Cowie, 2007). Υψηλά επίπεδα ενδημισμού παρατηρούνται επίσης σε τροπικές περιοχές, στα απομονωμένα ασβεστολιθικά καρστ, λόγω της περιορισμένης ροής των γονιδίων (Clements et. al., 2008). Η Χαβάη πληρώντας τις παραπάνω προϋποθέσεις κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό ενδημισμού, με 99% ενδημισμό στα σαλιγκάρια, περίπου 750 είδη (Holland & Cowie, 2007). Οι οικογένειες ενδημικών ειδών που έχουν παρατηρηθεί

στην Χαβάη είναι οι Hydrocenidae, Helicinidea, Tornatellininae, Achatinellinae, Leptachatinninae, Amastrinae, Pupillacea, Endodontidae, Punctidae, Euconulinae, Zonitidae και Succineidae (Solem, 1990). Άλλα παραδείγματα ενδημικών σαλιγκαριών σε νησιωτικούς βιότοπους αποτελούν το γένος *Bulimulus* με περισσότερα από 80 είδη στα νησιά Γκαλαπάγκος (Parent & Crespi, 2006, 2009), το γένος *Achatinella* με 41 είδη στις οροσειρές του νησιού O'ahu (Hadfield, Miller & Carwile, 1993), το γένος *Mandarina* στα νησιά Ogasawara (Chiba, 2010), το γένος *Everettia* στο Βόρνεο (Liew et al., 2020) και μέλη των οικογενειών Tateidae, Bithyniidae και Planorbidae στο Pelican Creek σε αρτεσιανές πηγές στην άνυδρη Αυστραλία (Rossini, Fensham & Walter, 2017). Εκτός από τους νησιωτικούς βιότοπους έχει παρατηρηθεί ενδημισμός και σε άλλα απομονωμένα μέρη του πλανήτη όπως για παράδειγμα το *Pyrgulopsis robusta* στις πηγές των δυτικών ΗΠΑ (Riley, Dybdahl & Hall, 2008), τα είδη *Cochlostoma porroi*, *Clausilia brembina*, *Clausilia whateliana* και *Charpentieria itala* στις ανατολικές Άλπεις ανάμεσα στις περιοχές Lago di Como και Lago di Garda στην Ιταλία (Nägele & Hausdorf, 2015) και το είδος *Radix dolgini* στην Σιβηρία (Vinarski et al., 2016).

1.2 Σύνδεση αβιοτικών παραγόντων με μορφολογικά χαρακτηριστικά

Συγκρίνοντας την ποικιλομορφία που υπάρχει στο φύλο Mollusca παγκοσμίως, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των ενδαιτημάτων στα οποία κατοικούν τα ζώα και της μορφολογίας τους. Φαίνεται δηλαδή, η τοποθεσία να επηρεάζει τόσο τα εξωτερικά τους χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα, το μέγεθος και το σχήμα του κελύφους, καθώς και διάφορα άλλα χαρακτηριστικά στη συμπεριφορά τους.

Πληθώρα ερευνών εστιάζει κυρίως σε μορφολογικές διαφορές μεταξύ των ειδών, όπως εκείνη του Joseph Heller (1987) που ερευνώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ οικοσυστήματος και σχήματος κελύφους στα σαλιγκάρια του Μεσογειακού και ερημικού κλίματος του Ισραήλ, συμπέρανε πως τα είδη που προτιμούν βράχους έχουν κυρίως υψηλές σπείρες και τα είδη που προτιμούν θάμνους ή σκάβουν το έδαφος έχουν χαμηλές σπείρες. Επιπλέον, τα είδη που κατοικούν σε οργανικά φυλλώδη υποστρώματα είναι συνήθως μικρού μεγέθους και διαθέτουν κελύφη με υψηλές και χαμηλές σπείρες. Για παράδειγμα τα σαλιγκάρια που σκάβουν το έδαφος στις περιόδους αδράνειας έχουν αρκετά μεγάλο πόδι, και συνεπώς ισοδιάστατο, στρογγυλό ή στροβιλωτό κέλυφος. Τέλος, οι κάτοικοι των οργανικών υποστρωμάτων φαίνεται να τα επιλέγουν ανάλογα με την ωτοκία.

Αντίστοιχα, σε έρευνα που κάνανε οι Marzec M. et. al (2020), για τη σχέση που έχουν οι κλιματικές συνθήκες: θερμοκρασία και βροχόπτωση στους πληθυσμούς του είδους *Xerolenta obniva* στην Πολωνία, έγιναν δειγματοληψίες από τα Νοτιοδυτικά και τα Βορειοανατολικά μέρη της χώρας. Στα ΝΔ υπάρχουν μεγαλύτερα, σκούρα κελύφη με λωρίδες, ενώ στα ΒΑ υπάρχουν μικρότερα, λευκά κελύφη. Επομένως, είναι πιθανό τα μεγαλύτερα κελύφη σε περιοχές με θερμότερο και ξηρότερο περιβάλλον να αποτελούν απαντήσεις στην επιλογή περιβαλλοντικών παραγόντων.

Το ενδημικό γένος *Mandarina* της περιοχής Hahajima στην Ogasawara αποτελεί επίσης καλό παράδειγμα για μελέτη της προσαρμοστικότητας, γι' αυτό και μελετήθηκε από τους Chiba S. και Davidson A. (2007). Το *Mandarina polita* εμφανίζει μεταβλητότητα ως προς τη μορφολογία του κελύφους, ενώ φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση και μεταξύ της μορφολογίας και του βάθους του φυλλώματος που βρίσκονται τα άτομα, καθώς και της ύπαρξης ή μη άλλων χερσαίων ειδών στο οικοσύστημα.

Εκτός βέβαια από τις μορφολογικές διαφοροποιήσεις στα κελύφη των χερσαίων γαστερόποδων, μπορεί επίσης να εμφανίσουν και άλλες ιδιαιτερότητες, όπως για παράδειγμα τρίχες, δόντια κλπ. Πιο συγκεκριμένα, οι Proćków et al. (2018) συγκρίνοντας το είδος *Trochulus hispidus* με το *Trochulus sericeus*, τα οποία εμφανίζουν ευρεία κατανομή σε όλη την Ευρώπη αλλά και μεγάλη ποικιλία οικοτόπων, διαπίστωσαν ότι το *T. sericeus* είναι αρκετά ανεκτικό στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και φέρει επίσης τρίχες στο κελύφός του, ώστε να προσκολλάται ευκολότερα στα φυτά όταν βρίσκεται σε υγρά περιβάλλοντα. Αντίθετα, το *T. hispidus* επιλέγει ξηρά και εύφωτα ενδιαιτήματα με σταθερές θερμοκρασίες και δεν φέρει τρίχες στο κελύφος του. Τα δύο αυτά είδη δεν ανήκουν σε διαφορετικές γενετικές ομάδες παρά τις μορφολογικές διαφορές τους, οι οποίες είναι προγονικής προέλευσης.

Σε παλαιότερη έρευνά τους, θέλοντας να ελέγξουν κατά πόσο το ενδιαίτημα επηρεάζει τη μορφολογία του κελύφους και αν υπάρχει πιθανότητα για υποείδη στο *Trochulus striolatus* οι Proćków et al. (2017) βρήκαν ότι άτομα που κατοικούν στα ορεινά τείνουν να εμφανίζουν μικρότερα κελύφη και βραδύτερη ανάπτυξη αυτών, ενώ κάτοικοι πεδινών περιοχών έχουν ταχεία ανάπτυξη και συνεπώς μεγαλύτερα κελύφη.

Παρατηρήθηκε ότι οι κλιματικές συνθήκες επηρεάζουν ακόμα και τη συμπεριφορά των σαλιγκαριών (χρόνος ανάπτυξης, περίοδος αναπαραγωγής, νυκτόβια κλπ.). Έτσι και ο Murphy M.J. (2002) σε έρευνά του πάνω στο χερσαίο σαλιγκάρι *Hedleyella falconeri* της Αυστραλίας, εντόπισε συσχετισμό της συμπεριφοράς του (νυκτόβια ενεργητικότητα, εναπόθεση αυγών, ημερήσια εύρεση καταφυγίου και διατροφή) με το οικοσύστημα. Η υγρασία φάνηκε να ευνοεί την ενεργητικότητα και την μετακίνηση των ατόμων του είδους σε αντίθεση με την ξηρασία.

Ο Cook E.M. (2008) σε έρευνά του για το είδος *Cepaea nemoralis* της οικογένειας Helicidae, διαπίστωσε ότι τα άτομα που ζουν σε ανοιχτά λιβάδια και πιο εκτεθειμένες σε θηρευτές περιοχές, εμφανίζουν κίτρινο και με ρίγες κέλυφος σε αντίθεση με τους κατοίκους των δασικών και μη προστατευμένων περιοχών που τα κελύφη τους δεν εμφανίζουν κανένα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

Η κλίση της επιφάνειας που κινούνται τα σαλιγκάρια φαίνεται επίσης να επηρεάζει το σχήμα και το μέγεθος του κελύφους, δηλαδή αν τα σαλιγκάρια επιλέγουν οριζόντιες ή κάθετες επιφάνειες μετακίνησης. Έτσι, οι Cameron και Cook (1989) σε έρευνά τους πάνω στα σαλιγκάρια των νήσων Μαδέιρα μελέτησαν τόσο ενδημικά είδη όσο και τις οικογένειες: Helicidae, Clausiliidae, Ferussaciidae, Pupillidae που κατοικούν εκεί.

Μεταξύ άλλων, συμπέραναν ότι τα είδη των οικογενειών αυτών ακολουθούν το μοτίβο που λέει ότι είδη με ψηλές σπείρες στο κέλυφός τους έρχονται συνήθως σε κάθετες και απότομες επιφάνειες, σε αντίθεση με τα είδη που έχουν πεπλατυσμένες σπείρες και προτιμούν οριζόντιες επιφάνειες. Τα είδη με σφαιρικά κελύφη μπορούν να υπάρξουν σε ασταθείς επιφάνειες και προεξοχές σε μεγαλύτερο βαθμό.

Αντίστοιχα, το 1984 οι L. M. Cook και W. N. Jaffar μελετώντας δεκατέσσερα διαφορετικά είδη σαλιγκαριών από τρεις διαφορετικές περιοχές της νοτιοδυτικής Αγγλίας, εντόπισαν ότι η προσαρμογή τους σε κάθετες επιφάνειες σχετίζεται με το ύψος των σπειρών τους. Τα είδη με σχετικά σφαιρικό κέλυφος φαίνεται να μην παρουσιάζουν προτίμηση για κάποια συγκεκριμένη κλίση επιφάνειας, ενώ εξαίρεση αποτελεί το είδος *Helix aspersa* που σε αντίθεση με τα είδη που έχουν παρόμοιο σχήμα κελύφους, συμπεριφέρεται όπως τα είδη με υψηλές σπείρες.

1.3 Σύγκριση αβιοτικών παραγόντων βάση μοριακών δεικτών και φυλογένεσης

Για την παραπάνω σύνδεση αβιοτικών παραγόντων με κοινά εξωτερικά χαρακτηριστικά των χερσαίων σαλιγκαριών, υπάρχει μια πληθώρα ερευνών που την εξετάζει με βάση μοριακών δεικτών και φυλογένεσης. Όπως για παράδειγμα η μελέτη των Raphalo et al. (2020), στην οποία πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση οκτώ ειδών του γένους *Gittenouardia* της Νότιας Αφρικής με χρήση των μοριακών δεικτών 16S rRNA και COI. Βρέθηκε ότι τα είδη που είχαν ευρύτερο σκούρο καφέ κέλυφος με περιφερειακή καρίνα προτιμούν περιοχές με υψηλά επίπεδα υγρασίας στο ανατολικό ακρωτήριο και στις επαρχίες KwaZulu-Natal . Ωστόσο αυτά που είχαν μεσαίου μεγέθους κέλυφος και σκούρα περιφερειακή ταινία χωρίς καρίνα βρέθηκαν στα παράκτια δάση, στους αμμόλοφους και σε γκρεμούς στο νότιο ακρωτήριο .

Όσον αφορά τη δομή του κελύφους, οι Caro et al. (2019) ανακατασκεύασαν τη φυλογενετική ανάλυση των *Leptaxinae* χρησιμοποιώντας δύο μιτοχονδριακά γονίδια (COI και 16S) σε 41 δείγματα. Τα είδη με κλιμακωτή (σπειροειδή) δομή κελύφους (*Cryptosaccini*) σχετίζονται με σκιερά περιβάλλοντα και δεν ανέχονται τις ξηρές συνθήκες. Αντιθέτως, το γένος *Fractanella* με ελάχιστα ασβεστοποιημένο καστανό-πράσινο κέλυφος, εύκαμπτο, ημιδιαφανές και δομή που μοιάζει με μικρά θραύσματα προτιμά εκτεθειμένα, χωρίς σκιά βραχώδη συντριμμια, πυκνούς χαμηλούς θάμνους και κρύβεται κάτω από βράχια.

Επιπλέον το είδος *Aylacostoma stigmaticum* της Νότιας Αμερικής μελετήθηκε από τους Vogler et al. (2016) και με χρήση του μιτοχονδριακού γονιδίου 12S rRNA, παράχθηκαν μοριακά δεδομένα (13 δείγματα) για το εν λόγω εξαφανισμένο είδος. Βρέθηκε να έχει ένα συγκριτικά πιο στρογγυλό κέλυφος και περισσότερο ωοειδή στόμιο σε σχέση με

άλλα 2 είδη του γένους *Aylacostoma* και προτιμά τα εξαιρετικά οξυγονωμένα γλυκά νερά κοντά στα ορμητικά σημεία Yacyreta «Aripe» στον ποταμό High Parana (Αργεντινή - Παραγουάη).

Σε άλλη μελέτη οι Chang Z-Y, Liew T-S.(2021) διερεύνησαν την φυλογενετική σχέση με τους COI, 16S και ITS-1 μεταξύ των ειδών *Geotrochus* (11 είδη) και *Trochomorpha* (4 είδη) στο Sabah και βρέθηκε ότι στις ορεινές περιοχές με πιο υγρές συνθήκες τα είδη παρουσίασαν πιο τραχύ και πιο χονδρό κέλυφος.

Ωστόσο, έχει μελετηθεί επίσης και η συμπεριφορά των σαλιγκαριών και πως αυτή επηρεάζει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους αλλά και με το οικοσύστημα που κατοικούν. Έτσι, σε έρευνα που έγινε σε 182 είδη της οικογένειας Velutinidae της Ανταρκτικής από τους Giulia Fassio et al.(2018) χρησιμοποιώντας τους COI, 16S rDNA, 28S rDNA και ITS2 και κατασκευάζοντας φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Bayes, βρέθηκε ότι 4 από τα είδη μελέτης με μικρότερη διάμετρο πυρήνα και περισσότερες σπείρες στο εμβρυικό κέλυφος παρουσιάζουν μεγαλύτερη διάρκεια Πελαγικής Φάσης Προνυμφών και μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς. Ειπώθηκε επίσης ότι τα χρωματικά μοτίβα των Velutinidae προέρχονται από χρωστικές των Ασκιδίων (Ascidians), στα οποία ζουν ως ξενιστές και γεννούν τα αυγά τους.

Επιπλέον, άλλο ένα μορφολογικό χαρακτηριστικό που φαίνεται να αλληλοεπιδρά με το περιβάλλον είναι η ύπαρξη ή όχι τριχών στο κέλυφος. Σε μελέτη των . για δώδεκα είδη του γένους *Trochulus* σε σημεία της Νότιας Γερμανίας, της Ανατολικής Γαλλίας και της Ελβετίας, χρησιμοποιήθηκε φυλογενετική Bayesian analysis με τους μοριακούς δείκτες COI, 16S και του αλληλόμορφου ITS-1. Το πείραμα έδειξε αυξημένη προσκόλληση ειδών που διέθεταν κέλυφος με τρίχες σε υγρές επιφάνειες. Τα είδη με τριχωτά κελύφη εντοπίστηκαν σε περιοχές με χαμηλή εξάτμιση και υψηλή βροχόπτωση

ενώ αντίθετα αυτά που είχαν πιο λείο κέλυφος βρέθηκαν σε μέρη με υψηλή εξάτμιση ή χαμηλότερη βροχόπτωση. Επιπλέον το πείραμα έδειξε ότι σε υγρούς βιότοπους τα είδη σαλιγκαριών προτιμούν να τρέφονται με ποώδη φυτά με μεγάλα φύλλα ενώ αντίθετα σε ξηρούς οικοτόπους, αποφεύγουν τη σκληρή φυτική ύλη και τρέφονται κατά προτίμηση με νεκρό υλικό που βρίσκεται στο έδαφος.

1.4 Αντίστοιχες έρευνες με είδη από την νοτιοανατολική Ευρώπη

Σημαντικές έρευνες έχουν διεξαχθεί και στην νοτιοανατολική Ευρώπη (Βαλκάνια, Ελλάδα, Τουρκία). Σε εγχώριο επίπεδο, οι Giokas, S., et al. (2013) εξέτασαν το γένος *Albinaria* στην Ελλάδα, ελέγχοντας τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά των ειδών που συλλέξανε και απέδειξαν ότι υπάρχει διαφορά μεγέθους και σχήματος μεταξύ δύο φαινοτύπων στο γένος. Τα είδη με ραβδωτά κελύφη (πιο ανοιχτόχρωμα, λεπτά και ψηλά) τείνουν να αποθηκεύουν ευκολότερα το νερό στην επιφάνεια τους, ενώ από την άλλη αυτά με λείο κέλυφος τείνουν να συγκρατούν καλύτερα το νερό που έχει ήδη αποθηκευτεί. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τα βοηθάνε να αποθηκεύσουν και να διατηρήσουν την υγρασία που χρειάζονται.

Ο Cook (1997) σε έρευνά του πάνω στις μεγαλύτερες και συχνά εμφανιζόμενες οικογένειες σαλιγκαριών της Τουρκίας (*Helicidae*, *Enidae*, *Zonitidae* και *Clausilidae*) συμπέρανε ότι το ενδιαίτημα των σαλιγκαριών παίζει ρόλο στην ποικιλομορφία του μεγέθους και του σχήματος των κελυφών τους. Πιο συγκεκριμένα, σε ψυχρά και υγρά κλίματα συναντάμε σαλιγκάρια μικρότερου μεγέθους με πιο κωνικά κελύφη, ενώ σε μέρη με Μεσογειακά και ηπειρωτικά ξηρά κλίματα συναντάμε είδη σαλιγκαριών μεγαλύτερου σωματικού μεγέθους.

Όσον αφορά την περιοχή των Βαλκανίων, οι Manson et.al (2020) μελέτησαν το γένος *Montenegrina* και κατασκεύασαν φυλογενετικό δέντρο με χρήση των COI, 16S και 12S μοριακών δεικτών. Στα αποτελέσματα το είδος *M. skipetarica gurelurensis* με ραβδωτό κέλυφος εμφανίστηκε σε μόνο μία τοποθεσία ενώ το *M. skipetarica puskasi* με λείο κέλυφος βρέθηκε να έχει μεγάλη εμβέλεια με εύρος 50-100 km².

Συνεχίζοντας τις συγκρίσεις κελυφών με χρήση των COI, COII και 16S rRNA μοριακών δεικτών οι Feher et.al (2013) πραγματοποίησαν μοριακή ανάλυση σε 9 είδη *Agathylla* (Gastropoda, Clausiliidae) της Αλβανίας. Τα είδη που βρέθηκαν στη Νότια Αλβανία παρουσίασαν πιο λεπτό κέλυφος με ύψος από 8 mm - 12 mm και προεξέχον οβάλ άνοιγμα. Το *Agathylla neutra* εντοπίστηκε σε μεγαλύτερα υψόμετρα με ένα λεπτότερο κέλυφος (αναλογία W / H 0,23), στρογγυλεμένο άνοιγμα που μόλις προεξέχει και σχετικά παχύ περιστόμιο. Τέλος, θεωρήθηκε ότι η μετάβαση της μορφολογίας του κελύφους από μη ραβδωτό σε ραβδωτό κέλυφος οφείλεται στην προσαρμογή των σαλιγκαριών σε συγκεκριμένο περιβαλλοντικό κλίμα .

Ωστόσο, ο ανθρωπογενής παράγοντας ενδέχεται να επηρεάζει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σαλιγκαριών. Η έρευνα των Rađa et al. (2012) για το είδος *Eobania vermiculata* της Κροατίας όπου διεξήχθη 16S ριβοσωμικό DNA (rDNA), γονίδιο υπομονάδας I (COI) μιτοχονδριακής οξειδάσης και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο χρησιμοποιώντας Bayesian ανάλυση έδειξε ότι η αύξηση στο μέγεθος του κελύφους των σαλιγκαριών οφείλεται στη γεωργία, την αναδάσωση και τις κηπευτικές δραστηριότητες των ανθρώπων. Αντίθετα παρατηρήθηκε ότι τα είδη που εκτίθενται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (νησιά Palagruža και Sušac) εμφάνιζαν έναν «νανισμό» που ίσως οφείλεται σε γεωγραφική απομόνωση που έλαβε μέρος 10,000 χρόνια πριν.

1.5 Υπόθεση Εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να συμπεράνουμε εάν οι οικογένειες των χερσαίων σαλιγκαριών που υπάρχουν στη νοτιοανατολική Ευρώπη ομαδοποιούνται ανάλογα τα αβιοτικά χαρακτηριστικά των περιοχών που διαβιούν. Εξετάζοντας τα πιο συνηθισμένα είδη των οικογενειών που εμφανίζονται στην περιοχή ενδιαφέροντος, ελέγχουμε αν ακολουθούν το ίδιο μοτίβο ομαδοποίησης με άλλες παρόμοιες φυλογενετικές αναλύσεις. Θέλουμε δηλαδή να ερευνήσουμε εάν τα αποτελέσματα της φυλογενετικής μας ανάλυσης αντικατοπτρίζουν τα στοιχεία οικολογίας των οικογενειών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δείγματα σαλιγκαριών που συλλέχθηκαν από την περιοχή ενδιαφέροντος, καθώς και δείγμα DNA από το θαλάσσιο σαλιγκάρι *Aplysia fasciata* που χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς (εξωομάδα-outgroup) για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου, αλλά και το είδος *Eobania vermiculata* για τις πρώτες δοκιμαστικές εξαγωγές DNA. Όλα τα δείγματα ήταν συντηρημένα σε αλκοόλη πριν τη χρήση τους.

Η διαδικασία εξαγωγής DNA ξεκίνησε με το σπάσιμο του κελύφους των σαλιγκαριών (για λόγους ευζωίας χρησιμοποιήσαμε πάγο κατά τη θανάτωση των ζώων), ενώ στη συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά η σάρκα, κόπηκε τμήμα από το πόδι του κάθε ζώου και μεταφέρθηκε σε erpendorfs με αλκοόλη περιεκτικότητας 90% για να συντηρηθεί μέχρι την εξαγωγή.

Πίνακας 1 Είδη σαλιγκαριών, σήμανση, αρίθμηση και τοποθεσίες περισυλλογής.

Σήμανση	Αρίθμηση	Επιστημονική Ονομασία	Τοποθεσία
G1.1	1	<i>Helix lucorum</i>	Κεντρική Μακεδονία
G1.2	2	<i>Helix lucorum</i>	Κεντρική Μακεδονία
G1.3	3	<i>Helix lucorum</i>	Κεντρική Μακεδονία
G2.1	4	<i>Theba pisana</i>	Κρήτη
G2.2	5	<i>Theba pisana</i>	Κρήτη

G2.3	6	<i>Theba pisana</i>	Κρήτη
G3.1	7	<i>Cochlicella acuta</i>	Αλυκές, Νέες Παγασές
G3.2	8	<i>Cochlicella acuta</i>	Αλυκές, Νέες Παγασές
G4.1	9	<i>Theba pisana</i>	Ελικοδρόμιο, Νέα Ιωνία
G4.2	10	<i>Theba pisana</i>	Ελικοδρόμιο, Νέα Ιωνία
G7.1	11	<i>Helix aspersa aspersa</i>	Γαλανόρεμα, Ανατολικό Πήλιο
G8.1	12	<i>Theba pisana</i>	Αϊβαλιώτικα
G8.2	13	<i>Theba pisana</i>	Αϊβαλιώτικα
G8.3	14	<i>Theba pisana</i>	Αϊβαλιώτικα
	15	<i>Aplysia fasciata</i> (υδατικό σαλιγκάρι)	Άγνωστη τοποθεσία



Εικόνα 1 Χάρτης με τις περιοχές δειγματοληψίας.

2.2 Εξαγωγή DNA

Για την εξαγωγή του DNA από τους ιστούς των ζώων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της φαινόλης-χλωροφορμίου και αποτελείτο από τα παρακάτω στάδια:

1. Προσθήκη 500 μ L TNE

- α) Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM \rightarrow διατηρεί το pH σταθερό 7-8
- β) EDTA 1 mM \rightarrow διαχωρίζει και απομακρύνει δυσμενή κατιόντα (Ca^{2+} , Mg^{2+}) τα οποία βρίσκονται συνήθως στα μεταλλοένζυμα και έχουν ανασταλτικό ρόλο.
- γ) NaCl 100 mM σταθεροποιεί το DNA σε ισοτονικό μέσο και βοηθά στην αποικοδόμηση των κυτταρικών μεμβρανών

2. Προσθήκη 100 μ L Tris-HCl συγκέντρωσης 1M

3. Προσθήκη 80 μ L SDS συγκέντρωσης 20% κατ' όγκου \rightarrow δέσμευση κυτταρικών μεμβρανών, λιπιδίων, πρωτεϊνών

4. Προσθήκη 10 μ L Proteinase K+ συγκέντρωσης 20 mg/ml \rightarrow μετουσιώνει τις πρωτεΐνες

5. Ανάδευση σε vortex.

6. Τοποθέτηση, των δειγμάτων στο υδατόλουτρο στους 60 $^{\circ}\text{C}$ για όλο το βράδυ ώστε να διαλυθεί ο ιστός, να σπάσουν τα κύτταρα και να αποδεσμευθεί το DNA. Έπειτα ακολουθεί ο 'καθαρισμός' του DNA από τα υπόλοιπα προϊόντα-'θραύσματα'.

7. Προσθήκη 300 μL φαινόλης που δεσμεύει όλα τα παραπάνω παραπροϊόντα εκτός του DNA.
8. Προσθήκη 300 μL διάλυμα χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24 χλωροφόρμιο / 1 ισοαμυλική αλκοόλη.
9. Ανάδευση για περίπου 10 λεπτά με το χέρι και φυγοκέντριση στις 12.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά.
10. Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο Eppendorf.
11. Προσθήκη 600 μL διάλυμα χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, ανάδευση με το χέρι για 10 λεπτά και φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες με πριν. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Eppendorf.
12. Προσθήκη 1 mL αιθανόλης 100%.
13. Προσθήκη 25 μL sodium acetate συγκέντρωσης 3M.
14. Επώαση στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για μισή ώρα, ώστε το DNA να μαζευτεί στον πυθμένα του Eppendorf.
15. Φυγοκέντριση στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά, ώστε να δημιουργηθεί το ίζημα στον πυθμένα του Eppendorf και απομάκρυνση της αιθανόλης.
16. Προσθήκη 200 μL παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκέντριση στις 12.000 στροφές για 5 λεπτά.
17. Απομάκρυνση της αιθανόλης και αφυδάτωση των ιζημάτων στον φούρνο για 10-20 λεπτά περίπου, μέχρι να εξατμιστεί τελείως η οποιαδήποτε υγρασία.

18. Προσθήκη 50 μL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) και ανάδευση με πιπέτα (by-pipetting).

2.3 Ποσοτικοποίηση DNA

Μετά την απομόνωση του DNA, ακολουθεί η ποσοτικοποίησή του , ώστε να φανεί εάν το DNA που εξήχθη από τα δείγματα είναι καλό ως προς την ποιότητα και την καθαρότητα, ώστε να χρησιμοποιηθεί για την PCR. Η διαδικασία αυτή θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000). Το φασματοφωτόμετρο μετράει σε 230, 260 και 280 μήκος κύματος. Ο λόγος 260/280 μας δείχνει την ποιότητα του DNA, ενώ ο λόγος 260/230 την καθαρότητα και η βέλτιστη τιμή των λόγων αυτών κυμαίνεται από 1,8 έως 2.

Πίνακας 2 Ποιότητα και καθαρότητα DNA.

Σήμανση	Επιστημονική Ονομασία	Ποσότητα DNA (ng/ μL)	Ποιότητα DNA (260/280)	Καθαρότητα DNA (260/230)
G1.1	<i>Helix lucorum</i>	44,21	1,89	1,42
G1.2	<i>Helix lucorum</i>	57,97	1,86	1,56
G1.3	<i>Helix lucorum</i>	16,34	1,89	1,12
G2.1	<i>Theba pisana</i>	40,38	1,46	1,18
G2.2	<i>Theba pisana</i>	22,09	1,98	1,24

G2.3	<i>Theba pisana</i>	11,96	1,77	1,05
G3.1	<i>Cochlicella acuta</i>	10,72	1,44	0,68
G3.2	<i>Cochlicella acuta</i>	39,80	1,36	1,22
G4.1	<i>Theba pisana</i>	270,5	2,01	2,02
G4.2	<i>Theba pisana</i>	250,3	1,98	1,91
G7.1	<i>Helix aspersa aspersa</i>	184,1	2,03	2,11
G8.1	<i>Theba pisana</i>	93,0	2,05	1,91
G8.2	<i>Theba pisana</i>	368,9	1,94	2,02
G8.3	<i>Theba pisana</i>	262,1	1,96	2,11

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος του μιτοχondριακού γονιδίου 16S. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο εξής:

16S-1 (5'-TGACTGTGCAAAGGTAGC-3')

16S-2 (5'-CTGGCTTACGCCGGTCTG-3')

Ενώ για την κατασκευή του mastermix προστέθηκαν τα παρακάτω υλικά σε ένα Eppendorf των 1,5 ml πολλαπλασιασμένα επί τον αριθμό των δειγμάτων (18):

Πίνακας 3 Υλικά mastermix

Υλικά	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση (μL)
DNA	1	
Buffer	5	90

MgCl	2	36
dNTP's	0,2	3,6
Primer Forward	0,5	9
Primer Reverse	0,5	9
Taq DNA Polymerase	0,1	1,8
H2O	10,7	192,6

Σε 18 PCR tubes των 200μL και αφού αριθμήθηκαν, έγινε προσθήκη 1μL DNA από κάθε δείγμα στα αντίστοιχα eppendorfs, αφήνοντας και ένα κενό που θα λειτουργήσει ως το 'τυφλό' δείγμα (μάρτυρας), και 19 μL από το mastermix που παρασκευάστηκε.

Για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας υβριδισμού του εκκινητή 16S που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε gradient PCR με δύο δείγματα (S₁ και S₂). Όπου S₁ το είδος G2.1. *Theba pisana* και S₂ G8.1. *Theba pisana*. Οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ήταν οι εξής:

Πίνακας 4 Gradient PCR

°C	50	54,3	56	58,5	59,8
16S	S ₁	S ₁	S ₁	S ₁	S ₁
16S	S ₂	S ₂	S ₂	S ₂	S ₂

Για την κατασκευή του mastermix ακολουθήθηκε η παρακάτω συνταγή:

DNA: 1ml

Buffer: 5 ml

MgCl₂: 2 ml

dNTP's: 0,2 ml

primer: 0,5 + 0,5 ml

taqpolymerase: 0,1 ml

H₂O: 10,7 ml

Και οι συνθήκες της PCR:

- 1) 95 °C για 15'
- 2) 95 °C για 1'
- 3) 50 °C και 60 °C max για 1'
- 4) 72 °C για 1' (30'')
- 5) 2,3 και 4 x 30 φορές
- 6) 72 °C για 15' (10')

Για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή 16S είναι οι 50 °C.

Έπειτα, εκτελέστηκε η διαδικασία της PCR σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες.

Πίνακας 5 Συνθήκες PCR για το γονίδιο 16S

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	15 min	1
Αποδιάταξη	95	1 min	30
Υβριδοποίηση εκκινητή	50	30 sec	
Επέκταση	72	30 sec	
Τελική επέκταση	72	10 min	1

Όταν ολοκληρώθηκε η αντίδραση, έγινε έλεγχος των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v.

2.5 Gel ηλεκτροφόρηση

Φτιάχνουμε πρώτα το gel με την εξής διαδικασία:

1. Παρασκευή TAE 50x (Tris base 48,4 gr + Acetic Acid 11,42ml + EDTA 0,5M 20ml μέχρι τελικό όγκο 200ml + απιονισμένο νερό μέχρι τα 250ml)
2. Αραίωση 20 ml TAE 50x σε απεσταγμένο νερό 980 ml, για τη σύνθεση TAE 1x σε τελικό όγκο 1000 ml.
3. Ζύγισμα Αγαρόζης 0,72 g
4. Διάλυση της αγαρόζης σε 60 ml TAE 1x και ανάδευση.
5. Θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων για 1,5 – 2 λεπτά μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές και προσθήκη 3μL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).
6. Το διάλυμα κρύνεται κάτω από τρεχούμενο νερό.

7. Τοποθέτηση του gel στην ειδική συσκευή MiniBis DNR, για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων υπό τη λάμπα υπεριώδους φωτός.

2.6 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing)

Για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία των γονιδίων των ατόμων που θέλουμε να μελετήσουμε. Έτσι, τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR στέλνονται σε ειδικές εταιρίες προς αλληλούχιση.

2.7 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων του GBIF, για είδη που εμφανίζονται συχνότερα στην περιοχή ενδιαφέροντος, την νοτιοανατολική Ευρώπη, και ανήκουν στις οικογένειες Helicidae, Clausiliidae, Zonitidae, Enidae, Geomitridae και Hygromiidae. Από τις έξι αυτές οικογένειες, οι δύο (Helicidae και Geomitridae) συμπεριλαμβάνουν και τα είδη που υπάρχουν στο πείραμα, επομένως προστέθηκαν είδη από τέσσερις ακόμα οικογένειες που διαβιούν σε παρόμοια οικοσυστήματα και γειτονικές περιοχές, ώστε να γίνει μια πιο ολοκληρωμένη σύγκριση στο τέλος. Έπειτα, λαμβάνοντας υπόψιν τα είδη για τα οποία υπάρχουν οι περισσότερες καταγραφές στην περιοχή, ανακτήθηκαν οι αντίστοιχες αλληλουχίες του γονιδίου 16S από τη βάση δεδομένων του NCBI. Μέσω του προγράμματος Exrasy, οι αλληλουχίες 'κόπηκαν' εκεί που έπρεπε, ώστε να μην διακόπτονται ενδιάμεσα από κάποιο κωδικόνιο λήξης και να είναι όσο το δυνατόν μακρύτερες. Στη συνέχεια έγινε συστοιχία αυτών, βάση προς βάση με το πρόγραμμα

ClustalX, και κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου (Σχήμα 3.1) με το πρόγραμμα MrBayes, με βάση τη μέθοδο Bayesian Inference και τις εξής παραμέτρους:

(1,500,000 generations, with a 100 generations sampled each time and the burn-in was set to 375,000 (25% of generations)).

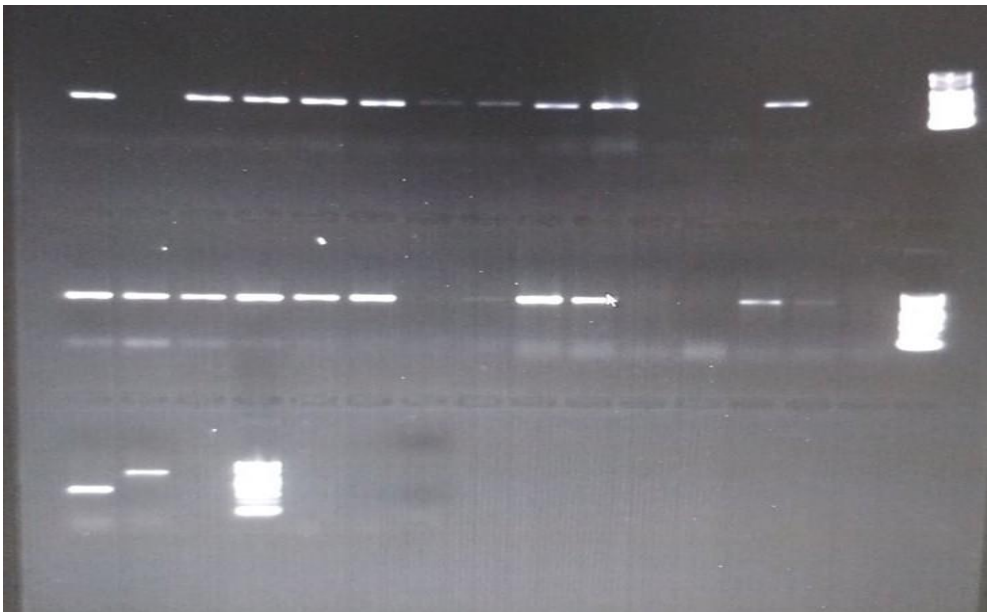
Επιπλέον, έγινε αναζήτηση στην πλατφόρμα animalbase για την ταυτοποίηση των αβιοτικών χαρακτηριστικών των ειδών που συμπεριλαμβάνονται στην φυλογένεση, δηλαδή αν κατοικούν σε ανοιχτά ή προστατευμένα, ξηρά ή υγρά περιβάλλοντα, καθώς και αν έχουν σκουρόχρωμο ή ανοιχτόχρωμο κέλυφος, ώστε να ελεγχθεί η πιθανότητα της ομαδοποίησης των οικογενειών με βάση τα αβιοτικά χαρακτηριστικά τους.

Ακολούθησε η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis) με βάση τα αβιοτικά χαρακτηριστικά των ειδών των οικογενειών και η απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με δύο τρόπους: θερμικός χάρτης (heatmap) (Σχήμα 3.2.) και διάγραμμα PCA (Σχήμα 3.3.), ενώ στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν η μηδενική υπόθεση των συσχετίσεων των ποιοτικών χαρακτηριστικών μεταξύ τους είναι αληθής, μέσω της ANOVA. Επιπλέον, κατασκευάστηκε Heatmap που συμπεριλαμβάνει και τις γενετικές ομαδοποιήσεις, σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο, ενώ έγινε νέα ANOVA με τις γενετικές ομαδοποιήσεις και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά στην προηγούμενη.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Προϊόντα PCR

Αρχικά, παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR για τα είδη *Helix lucorum*, *Helix aspersa*, *Theba pisana* και *Cochlicella acuta*, όπως φάνηκαν υπό την UV ακτινοβολία, έπειτα από την gel ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 2. Προϊόντα PCR

3.2. Bayesian Analysis

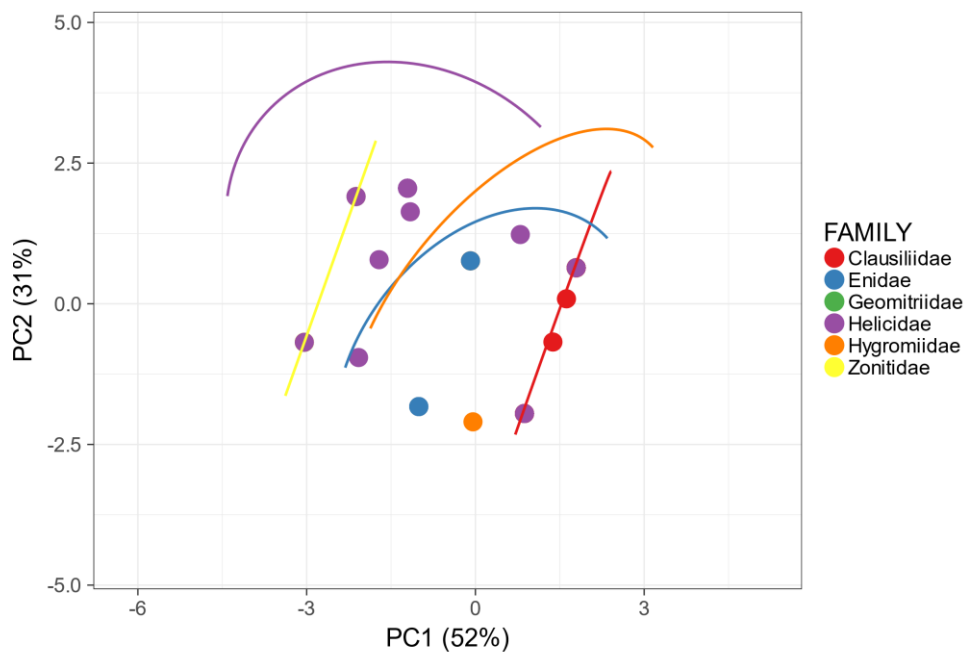
Στη συνέχεια, παρατίθεται το φυλογενετικό δέντρο από την Bayesian ανάλυση (Σχήμα 3.1.) που συγκροτήθηκε από 74 διαφορετικές αλληλουχίες του γονιδίου 16S και έδειξε ότι τα συμπεριλαμβανόμενα είδη συγκρότησαν τρεις βασικές ομαδοποιήσεις με

εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability) 0,97 ή περισσότερο. Το θαλάσσιο σαλιγκάρι *Aplysia fasciata* λειτούργησε ως ομάδα αναφοράς (εξωομάδα-outgroup) για τον προσδιορισμό της ρίζας του δέντρου με εκ των υστέρων πιθανότητα 1.

Δημιουργήθηκαν λοιπόν δύο αρχικοί κλάδοι με εκ των υστέρων πιθανότητα 0,97 που περιλαμβάνουν από τη μία τις οικογένειες Enidae και Clausiliidae και από την άλλη όλες τις υπόλοιπες. Έπειτα, ο κλάδος με τις περισσότερες οικογένειες χωρίστηκε σε άλλους δύο κλάδους με εκ των υστέρων πιθανότητα ίση με 1 και περιλαμβάνει από τη μια την οικογένεια Zonitidae και από την άλλη τις υπόλοιπες οικογένειες (Hygromiidae, Helicidae και Geomitridae). Η οικογένεια Zonitidae εμφάνισε μονοφιλία, ενώ όλες οι υπόλοιπες οικογένειες είναι πολυφυλετικές. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη *Helix aspersa* και *Cantareus apertus* φάνηκε να είναι γενετικά πλησιέστερα μεταξύ τους αφού συγκρότησαν ένα ‘sister group’ με εκ των υστέρων πιθανότητα 1, ενώ είναι παραφυλετικά σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Helix*. Επιπλέον, στην οικογένεια Hygromiidae, είδη του ίδιου γένους σχετίζονται γενετικά μεταξύ τους, όπως αναμένεται, ενώ η οπίσθια πιθανότητα γενεαλογικής σύνδεσης ανάμεσα στα τρία διαφορετικά γένη κυμαίνεται από 0,99 μέχρι 1. Τα είδη *Cochlicella acuta* και *Cochlicella barbara* φαίνεται επίσης να είναι πιο κοντά με τις οικογένειες Hygromiidae και Helicidae, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας Geomitridae. Όσον αφορά την οικογένεια Enidae, το *Chondrula tridens* είναι εμφωλιασμένο μεταξύ των ειδών του γένους *Mastus* και συγκροτεί ‘sister group’ με το *Mastus rossmaessieri*, ενώ το *Mastus etuberculatus* απέχει γενετικά κατά πολύ από το *Mastus carneolus*. Τέλος, στην οικογένεια Clausiliidae τα είδη του γένους *Albinaria* συγκρότησαν μια παραφυλετική ομάδα σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας.

Zonitidae και Helicidae είναι έντονα κόκκινα στις στήλες 'υγρά περιβάλλοντα' (wet environments) αφενός γιατί προτιμούν όλα υγρά περιβάλλοντα και αφετέρου γιατί έχουν κοινά και αρκετά από τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά. Αντιθέτως, τα είδη της οικογένειας Geomitridae εμφανίζουν χρωματισμούς που κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και - 0,5 που σημαίνει ότι δεν εμφανίζουν μεγάλη ομοιομορφία ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά με καμία άλλη οικογένεια, αλλά μόνο μεταξύ τους. Γι' αυτό και είναι και πιο απομακρυσμένα από τα υπόλοιπα είδη στο κλαδόγραμμα στο πάνω μέρος του σχήματος.

Από την PCA συσχετισμού αβιοτικών χαρακτηριστικών (Σχήμα 3.3.) με τα είδη των οικογενειών προέκυψαν δύο άξονες που αντιπροσωπεύουν το 52% (PC1) και το 31% (PC2) της συνολικής διακύμανσης. Ομοίως με τον Heatmap, οι οικογένειες Helicidae και Zonitidae φαίνεται να συσχετίζονται με βάση τα αβιοτικά χαρακτηριστικά, όπως επίσης και μερικά είδη των οικογενειών Helicidae και Clausiliidae. Ενώ η οικογένεια Geomitridae (πράσινο χρώμα) που δεν εμφάνισε μεγάλη ομοιομορφία με καμία άλλη οικογένεια, απουσιάζει από το διάγραμμα της PCA.



Σχήμα 3 PCA συσχετισμού αβιοτικών χαρακτηριστικών και ειδών των οικογενειών.

3.4. ANOVA

Η πρώτη ANOVA βασισμένη στα αβιοτικά χαρακτηριστικά είχε τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 6 Περιγραφική στατιστική για τους 6 ανεξάρτητους παράγοντες

Παράγοντας	Ανοιχτόχρωμο κέλυφος	Σκουρόχρωμο κέλυφος	Ανοιχτά περιβάλλοντα	Προστατευμένα περιβάλλοντα	Ξηρά περιβάλλοντα	Υγρά περιβάλλοντα	Σύνολα
Παρατηρήσεις N	56	55	56	56	56	56	335
Άθροισμα $\sum x_i$	33	23	33	21	37	18	165
Μέσος \bar{x}	0.589	0.418	0.589	0.375	0.661	0.321	0.496
Άθροισματα τετραγώνων $\sum x_i^2$	33	23	33	21	37	18	165
Διακύμανση δειγμάτος s^2	0.246	0.248	0.246	0.239	0.229	0.222	0.251
Τυπική απόκλιση δειγμάτος s	0.496	0.498	0.496	0.489	0.478	0.471	0.501
Τυπική απόκλιση μέσου $SE_{\bar{x}}$	0.066	0.067	0.066	0.065	0.064	0.063	0.027

Πίνακας 7 One-way ANOVA για τους 6 ανεξάρτητους παράγοντες

Πηγή διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	mean square	F statistic	p-value
Παράγοντας	5.350	5	1.070	4.491	0.0006
Σφάλμα	78.382	329	0.238		
Σύνολο	83.731	334			

Πίνακας 8 Post-hoc Tukey's test

Ζευγάρια παραγόντων	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
Ανοιχτόχρωμο ή Σκουρόχρωμο κέλυφος	2.6114	0.4392892	insignificant
Ανοιχτόχρωμο κέλυφος ή Ανοιχτό περιβάλλον	0.0000	0.8999947	insignificant

Ζευγάρια παραγόντων	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
Ανοικτόχρωμο κέλυφος ή Προστατευμένο περιβάλλον	3.2853	0.1875872	insignificant
Ανοικτόχρωμο κέλυφος ή Ξηρό περιβάλλον	1.0951	0.8999947	insignificant
Ανοικτόχρωμο κέλυφος ή Υγρό περιβάλλον	4.1066	0.0451019	* p<0.05
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Ανοιχτό περιβάλλον	2.6114	0.4392892	insignificant
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Προστατευμένο περιβάλλον	0.6591	0.8999947	insignificant
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Ξηρό περιβάλλον	3.7016	0.0958090	insignificant
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Υγρό περιβάλλον	1.4767	0.8999947	insignificant
Ανοιχτό ή Προστατευμένο περιβάλλον	3.2853	0.1875872	insignificant
Ανοιχτό ή Ξηρό περιβάλλον	1.0951	0.8999947	insignificant
Ανοιχτό ή Υγρό περιβάλλον	4.1066	0.0451019	* p<0.05
Προστατευμένο ή Ξηρό περιβάλλον	4.3804	0.0256290	* p<0.05
Προστατευμένο ή Υγρό περιβάλλον	0.8213	0.8999947	insignificant
Ξηρό ή Υγρό περιβάλλον	5.2018	0.0037051	** p<0.01

Μετά την διόρθωση Bonferroni, μόνο τα ζευγάρια παραγόντων: Προστατευμένο ή Ξηρό περιβάλλον και Ξηρό ή υγρό περιβάλλον θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά και επομένως μπορεί να θεωρηθεί ότι η μηδενική υπόθεση συσχετισμού αυτών είναι αληθής. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της ANOVA που βασίστηκε στις γενετικές ομαδοποιήσεις με βάση το φυλογενετικό δέντρο αλλά και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά από την πρώτη ANOVA, είναι τα εξής:

Πίνακας 9 Περιγραφική στατιστική για τους 7 ανεξάρτητους παράγοντες

Παράγοντας	Ανοιχτόχρωμο κέλυφος	Σκουρόχρωμο κέλυφος	Ανοιχτά περιβάλλοντα	Προστατευμένα περιβάλλοντα	Ξηρά περιβάλλοντα	Υγρά περιβάλλοντα	Γενετική ομαδοποίηση	Σύνολα
Παρατηρήσεις N	56	55	56	56	56	56	56	391
Άθροισμα $\sum x_i$	33.0000	23.0000	33.0000	21.0000	37.0000	18.0000	91.0000	256.0000
Μέσος \bar{x}	0.5893	0.4182	0.5893	0.3750	0.6607	0.3214	1.6250	0.6547
Άθροισματα τετραγώνων $\sum x_i^2$	33.0000	23.0000	33.0000	21.0000	37.0000	18.0000	177.0000	342.0000
Διακύμανση δειγμάτων s^2	0.2464	0.2478	0.2464	0.2386	0.2282	0.2221	0.5295	0.4472
Τυπική απόκλιση δειγμάτων s	0.4964	0.4978	0.4964	0.4885	0.4778	0.4713	0.7277	0.6687
Τυπική απόκλιση μέσου $SE_{\bar{x}}$	0.0663	0.0671	0.0663	0.0653	0.0638	0.0630	0.0972	0.0338

Πίνακας 10 One-way ANOVA για τους 7 ανεξάρτητους παράγοντες.

Πηγή διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Mean square	F statistic	p-value
Παράγοντας	66.8819	6	11.1470	39.8156	1.1102e-16
Σφάλμα	107.5068	384	0.2800		
Σύνολο	174.3887	390			

Πίνακας 11 Αποτελέσματα Tukey HSD

Ζευγάρια παραγόντων	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
Ανοιχτόχρωμο ή Σκουρόχρωμο κέλυφος	2.4090	0.5983565	insignificant
Ανοιχτόχρωμο κέλυφος ή Ανοιχτό περιβάλλον	0.0000	0.8999947	insignificant

Ζευγάρια παραγόντων	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
Ανοιχτόχρωμο κέλυφος ή Προστατευμένο περιβάλλον	3.0306	0.3295246	insignificant
Ανοιχτόχρωμο κέλυφος ή Ξηρό περιβάλλον	1.0102	0.8999947	insignificant
Ανοιχτόχρωμο κέλυφος ή Υγρό περιβάλλον	3.7883	0.1065440	insignificant
Ανοιχτόχρωμο κέλυφος ή Γενετική ομαδοποίηση	14.6481	0.0010053	** p<0.01
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Ανοιχτό περιβάλλον	2.4090	0.5983565	insignificant
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Προστατευμένο περιβάλλον	0.6080	0.8999947	insignificant
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Ξηρό περιβάλλον	3.4147	0.1951277	insignificant
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Υγρό περιβάλλον	1.3622	0.8999947	insignificant
Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Γενετική Ομαδοποίηση	16.9910	0.0010053	** p<0.01
Ανοιχτό ή Προστατευμένο περιβάλλον	3.0306	0.3295246	insignificant
Ανοιχτό ή Ξηρό περιβάλλον	1.0102	0.8999947	insignificant
Ανοιχτό ή Υγρό περιβάλλον	3.7883	0.1065440	insignificant
Ανοιχτό περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση	14.6481	0.0010053	** p<0.01
Προστατευμένο ή Ξηρό περιβάλλον	4.0409	0.0673267	insignificant
Προστατευμένο ή Υγρό περιβάλλον	0.7577	0.8999947	insignificant
Προστατευμένο περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση	17.6788	0.0010053	** p<0.01
Ξηρό ή Υγρό περιβάλλον	4.7985	0.0133591	* p<0.05
Ξηρό περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση	13.6379	0.0010053	** p<0.01
Υγρό Περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση	18.4364	0.0010053	** p<0.01

Ειδικότερα, αυτό που δείχνει η τελική ANOVA είναι ότι τα ζευγάρια παραγόντων:

- Ανοιχτόχρωμο κέλυφος ή Γενετική ομαδοποίηση (Light shell vs genetic cluster),
- Σκουρόχρωμο κέλυφος ή Γενετική Ομαδοποίηση (Dark shell vs genetic cluster),
- Ανοιχτό περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση (Open environment vs genetic Cluster),
- Προστατευμένο περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση (Protected environment vs Genetic cluster),
- Ξηρό περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση (Dry Environment vs Genetic cluster),
- Υγρό Περιβάλλον ή Γενετική Ομαδοποίηση (Wet environment vs Genetic cluster) και
- Ξηρό ή Υγρό περιβάλλον (Wet vs Dry environment),

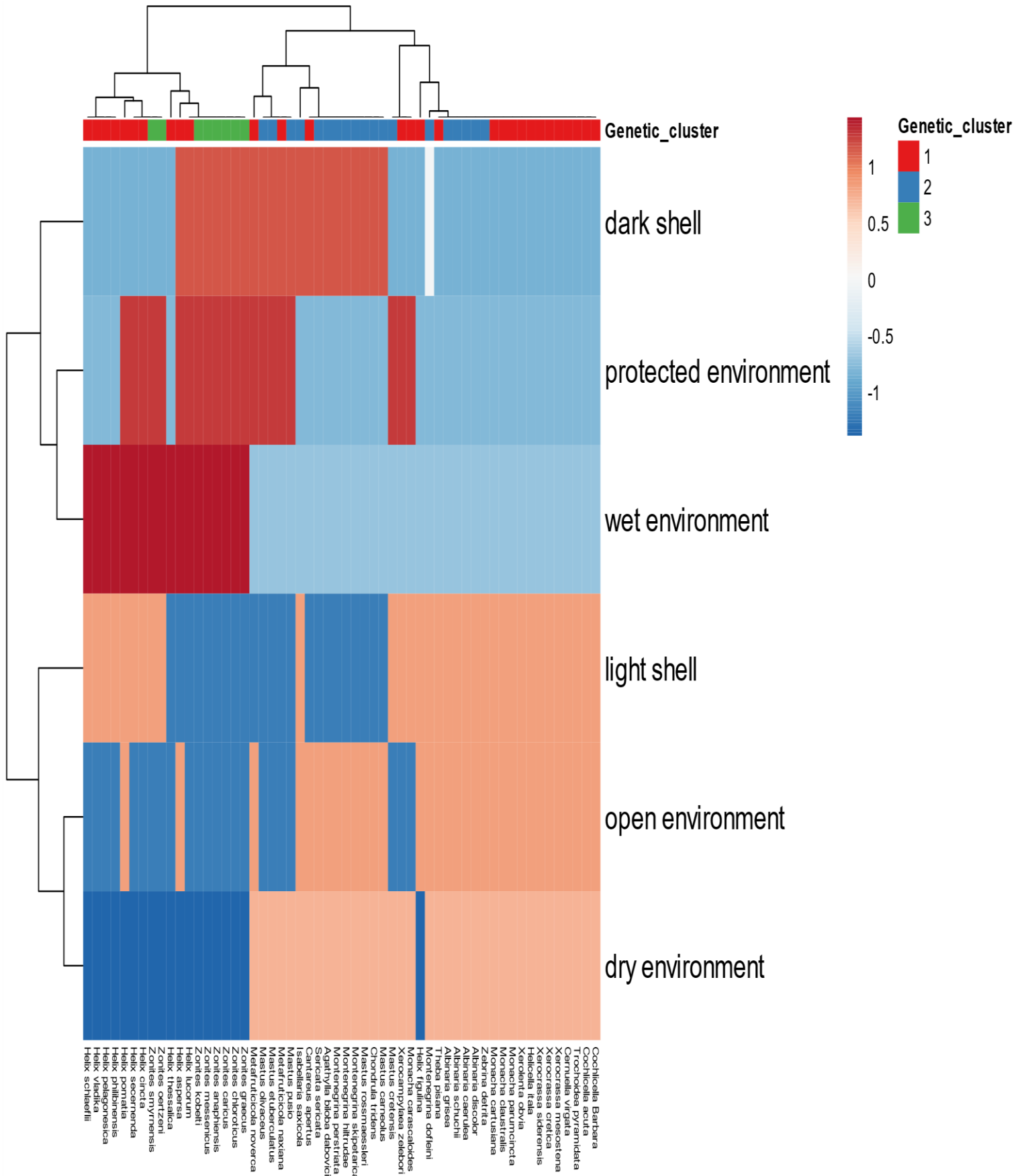
είναι στατιστικά σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα τα ζευγάρια παραγόντων που αφορούν αβιοτικά χαρακτηριστικά και γενετικές ομαδοποιήσεις είναι στατιστικά σημαντικότερα από το ζεύγος που αφορά μόνο αβιοτικά χαρακτηριστικά (ξηρό ή υγρό περιβάλλον) με τιμές $p < 0,01$ και $p < 0,05$ αντίστοιχα. Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι η μηδενική υπόθεση της συσχέτισης μεταξύ των αβιοτικών παραγόντων και των γενετικών ομαδοποιήσεων είναι αληθής.

3.5. Συσχετισμός γενετικών ομαδοποιήσεων με αβιοτικά χαρακτηριστικά

Σύμφωνα με τον Heatmap των γενετικών και αβιοτικών ομαδοποιήσεων (Σχήμα 3.4) η τελική ομαδοποίηση των οικογενειών με βάση πλέον και τη γενεαλογία, έγινε ως εξής: η πρώτη ομαδοποίηση αφορά στα είδη των

οικογενειών Hygromiidae, Geomitridae και Helicidae (κόκκινο χρώμα), η δεύτερη στα είδη των Clausiliidae και Enidae (μπλε χρώμα) και η τρίτη στα είδη της οικογένειας Zonitidae (πράσινο χρώμα). Ωστόσο, παρατηρούμε ότι τα είδη των οικογενειών Helicidae και Zonitidae που εμφάνιζαν τα περισσότερα κοινά αβιοτικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, με κυριότερο την προτίμηση για υγρά περιβάλλοντα, από τον προηγούμενο συσχετισμό (Σχήμα 3.2) συγκροτούν πλέον διαφορετικές ομάδες (1, κόκκινη και 3, πράσινη αντίστοιχα) λόγω φυλογένειας. Από την άλλη, ορισμένα είδη των οικογενειών Clausiliidae και Enidae εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά με κυριότερο το σκούρο κέλυφος και ο συσχετισμός αυτός υποστηρίζεται και από τη φυλογενεΐά τους, αφού ανήκουν στην ίδια γενετική ομαδοποίηση (2, μπλε). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι είδη των οικογενειών Helicidae και Hygromiidae εμφανίζουν κοινά αβιοτικά χαρακτηριστικά με κυριότερο το χαρακτηριστικό της διαβίωσης σε προστατευόμενο περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα ανήκουν και στην ίδια γενετική ομαδοποίηση (1, κόκκινη). Ο λόγος για τα είδη *Helix pomatia*, *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, *Helix secernenda* και *Helix cincta* από την οικογένεια Helicidae, καθώς και τα είδη *Monacha carascaloeides* και *Xerocampylaea zelebori* της οικογένειας Hygromiidae. Τα είδη *Chondrula tridens* και *Mastus rossmaessieri* έχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με κυριότερό τους το σκούρο κέλυφος, γεγονός που υποστηρίζεται και από την γενεαλογία τους αφού συγκρότησαν ένα sister group κατά την Bayesian analysis. Από την άλλη, τα είδη *Mastus etuberculatus* και *Mastus carneolus* απέχουν κατά πολύ μεταξύ τους ως προς τη γενεαλογία και σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους και, όπως φαίνεται και από τον heatmap τα δυο αυτά είδη διαφοροποιούνται ως προς την προτίμηση

προστατευμένου ή όχι περιβάλλοντος. Τα πρώτα ζουν σε προστατευμένα και τα δεύτερα σε ανοικτά περιβάλλοντα.



Σχήμα 4 Heatmap γενετικών και αβιοτικών ομαδοποιήσεων

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της φυλογένεσης και τις γενετικές ομαδοποιήσεις που συστάθηκαν σε συνδυασμό πάντα και με την στατιστική σημαντικότητα αυτών, βλέπουμε ότι το φυλογενετικό δέντρο χωρίζεται αρχικά σε δύο κλάδους, εκ των οποίων ο ένας περιλαμβάνει τις οικογένειες Clausiliidae και Epidae και ο άλλος όλες τις υπόλοιπες οικογένειες, που κ αυτός με τη σειρά του χωρίζεται σε άλλους δυο κλάδους που περιλαμβάνουν την οικογένεια Zonitidae ο ένας και ο άλλος όλες τις υπόλοιπες (Hygromiidae, Helicidae, Geomitridae).

Τα αποτελέσματα του συσχετισμού των αβιοτικών χαρακτηριστικών με τον γενετικό συσχετισμό δείχνουν ότι όλα τα είδη της οικογένειας Zonitidae και το γένος *Helix* της οικογένειας Helicidae (εκτός του *Helix figulina*), παρά την ομαδοποίησή τους ως προς τα αβιοτικά χαρακτηριστικά, διαφοροποιούνται ως προς τη γενεαλογία. Επομένως, η κοινή τους προτίμηση για υγρά περιβάλλοντα όπως και όλα τα υπόλοιπα κοινά χαρακτηριστικά δεν συσχετίζονται και γενετικά, γεγονός που απορρίπτει την υπόθεσή μας. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι οι δύο οικογένειες είναι πιο κοντά μεταξύ τους σε σχέση με τις οικογένειες Epidae και Clausiliidae που συγκροτούν έναν διαφορετικό αρχικό κλάδο.

Τα είδη του γένους *Helix* της οικογένειας Helicidae ομαδοποιούνται όλα μαζί με βάση την διαβίωση σε υγρά ενδιαιτήματα, με εξαίρεση το είδος *Helix figulina*, ενώ τα είδη *Cantareus apertus* και *Theba pisana* διαφοροποιούνται, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη γενεαλογία τους.

Η οικογένεια Helicidae εμφανίζεται κυρίως στη Μεσόγειο και ευρύτερα στη Δυτική Παλαιαρκτική ζώνη, ενώ παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων που

διακρίνονται σε υγρούς βιότοπους σε κλειστή βλάστηση και ξηρούς βιότοπους σε ανοιχτό περιβάλλον (Steinke D. et al 2004). Έτσι εξηγείται βέβαια και η διαφοροποίηση μεταξύ ειδών διαφορετικού γένους.

Το *Theba pisana* παρόλο που επιλέγει κ αυτό παρόμοια ενδιαίτηματα με τα είδη του γένους *Helix*, διαφοροποιείται ως προς τα μικρά και μεγάλα άτομα που βρίσκονται σε ψηλούς θάμνους χωρίς επαφή με το έδαφος και σε χωμάτινες επιφάνειες αντίστοιχα (Baker, G. Et al. 1988). Έχει αποδειχτεί ότι το *Theba pisana* στους αμμόλοφους μεταναστεύει από τους πυκνούς θάμνους της Ακακίας σε πιο εκτεθειμένους χλοώδεις οικοτόπους το καλοκαίρι και το χειμώνα χρησιμοποιώντας τους προστατευμένους πυκνούς θάμνους για αδρανοποίηση (Baker, G. Et al. 1988). Αυτή του η διαφοροποίηση, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας, ενδέχεται να συμβάλλει στην διατήρηση του ανά τα χρόνια και στην εξάπλωσή του ανά την περιοχή, αφού οι προκλήσεις που καλούνται να αντιμετωπίσουν τα χερσαία γαστερόποδα είναι πολλές, μεταξύ άλλων η θήρευση, οι ακραίες κλιματικές συνθήκες, τα φυτοφάρμακα, και τα λιπάσματα.

Από την άλλη, το *Helix figulina* που επίσης διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα είδη του γένους ως προς τα αβιοτικά χαρακτηριστικά, θεωρείται ότι έχει χαμηλή εξάπλωση και είναι πιο συντηρητικό ως προς την επιλογή ενδιαίτηματος, ειδικότερα όσον αφορά εποχές αδράνειας, σε αντίθεση με το *Helix aspersa* που αποτελεί κοσμοπολίτικο είδος με ευρεία κατανομή. Επιπλέον, η διαφοροποίησή τους ως προς την προσαρμογή σε διάφορα περιβάλλοντα αντικατοπτρίζεται και από τη γενεαλογία τους, αφού το *Helix aspersa* συγκρότησε παραφυλετική ομάδα σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα είδη του γένους *Helix*. Το περιορισμένο εποχιακό μοτίβο αδρανοποίησης που ακολουθεί το *Helix figulina*, αφενός συμβάλλει στη διατήρησή του σε ένα συγκεκριμένο

οικοσύστημα και αφετέρου το καθιστά ευάλωτο σε περίπτωση που οι κλιματικές συνθήκες μεταβληθούν απότομα. Από την άλλη, η πλαστικότητα που εμφανίζει το *Helix aspersa* ως προς τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία το βοηθά να αξιοποιεί τα αποθέματα ενέργειας στο μέγιστο (Kostakiozi P. et al. 2012) και επιπλέον, να εξαπλώνεται και να επιβιώνει σε διάφορα περιβάλλοντα. Πιο συγκεκριμένα, από την Ολόκαινο εποχή και μετά, εντοπίζεται κυρίως σε ανθρωπογενή περιβάλλοντα στη Δυτική Ευρώπη, δηλαδή σε κήπους σπιτιών, σε γεωργικές περιοχές και στα προάστια. Επιπλέον, θεωρείται και φυσικό ‘παράσιτο’ σε περιοχές που έχει εισαχθεί πρόσφατα (Νότια Αμερική, Αυστραλία)(Madec et al. 2000).

Όσον αφορά την οικογένεια Zonitidae έγινε έλεγχος μόνο του γένους Zonites και ίσως για αυτό να εμφανίσει και τόση ομοιομορφία, αντίστοιχη έρευνα πάνω σε όλα τα γένη της οικογένειας ίσως ξεκαθαρίσει περισσότερο το τοπίο. Το γένος Zonites είναι αυτό που κατοικεί στην περιοχή ενδιαφέροντος μας και είναι αναμενόμενο να παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά, λόγω των κοινών κλιματικών συνθηκών, όπως κάνουν ούτως ή άλλως και πολλά άλλα είδη. Δεν είναι απίθανο δηλαδή, τα είδη της οικογένειας που δεν εξετάστηκαν σε αυτή την έρευνα να ομαδοποιούνται με είδη άλλης οικογένειας με μεγαλύτερη ταύτιση, παρά τη διαφορετική γεωγραφική εξάπλωση. Όπως υποστηρίζει άλλωστε και ο Mordan P.B. (1977) σε έρευνά του πάνω σε είδη της οικογένειας, που ανήκουν σε άλλα γένη από αυτά που παρουσιάζονται εδώ, υπάρχουν σημαντικές οικολογικές διαφορές μεταξύ των ειδών.

Το γένος *Montenegrina* της οικογένειας Clausiliidae, εγγενές σε βραχώδεις βιότοπους της Βαλκανικής χερσονήσου, ανήκει στην ίδια υπο-οικογένεια με το *Albinaria* και έχει παρόμοιες προτιμήσεις οικοτόπων (μεγάλες και μη επικαλυπτόμενες πέτρινες επιφάνειες, βραχώδεις δασικές εκτάσεις, βραχώδη λιβάδια, φαράγγια κ.λπ.).

Ωστόσο όμως, παρουσιάζουν διαφορά ως προς τον χρωματισμό του κελύφους, τα πρώτα εμφανίζουν σκουρόχρωμο και τα δεύτερα ανοιχτόχρωμο χρωματισμό. Αν λάβουμε λοιπόν υπ' όψιν και πάλι τη γενεαλογία, παρατηρούμε ότι και εδώ, η ομαδοποίηση γίνεται με βάση το γένος.

Οι διαφοροποιήσεις ως προς την επιλογή του βιοτόπου που διαβιούν τα διάφορα είδη είναι επίσης πιθανό, να επηρεάζονται και από τον ανταγωνισμό και τη θήρευση, όπως συμβαίνει άλλωστε και με τα είδη του γένους *Montanegrina* (Fehér Z. Et al. 2018). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η μορφολογία του κελύφους ίσως να επηρεάζεται από την παρουσία ή όχι άλλων ειδών στο οικοσύστημα (Chiba S. & Davidson A. 2007), όπως επίσης και από την ανθρωπογενή δραστηριότητα (Abu-Bakar SB. et al. 2014).

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε ο συσχετισμός δύο αβιοτικών παραγόντων, που σχετίζονται με το ενδιαίτημα, και ενός μορφολογικού με τη γενεαλογία των ειδών, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την διατήρηση των ειδών και το πως οι κλιματικές συνθήκες επηρεάζουν τα είδη. Ωστόσο, το φύλο *Mollusca* εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία και υπάρχουν αρκετά άλλα χαρακτηριστικά που μπορούμε να ελέγξουμε για παρόμοιο σκοπό. Για παράδειγμα, οι Parmakelis A. et al. (2007) εισηγούνται ότι το σχήμα και το μέγεθος του σπερματοφόρου σάκου του γένους *Mastus* εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία και συνεπώς αυτή η απόκλιση, που δεν σχετίζεται με οικολογικές διαφορές, ίσως να είναι υπεύθυνη για τη σημερινή αφθονία του γένους στην Κρήτη, αφού σύμφωνα με έρευνες η εξέλιξη των γενετικών οργάνων που σχετίζεται και με την σεξουαλική επιλογή ίσως να έχει ως αποτέλεσμα την αναπαραγωγική απομόνωση και την ειδογένεση. Ο διαγνωστικός αυτός χαρακτήρας έχει χρησιμοποιηθεί επίσης και για την χαρτογράφηση των περισσότερων ειδών του γένους στην Κρήτη. Η αναπαραγωγική απομόνωση του γένους *Mastus* φαίνεται και από τη σύγκρισή του με το γένος *Albinaria*

που επίσης κατοικεί στην Κρήτη και ενώ δεν εμφανίζει διαφορά ως προς την ανατομία των γεννητικών οργάνων, τείνει να υβριδοποιείται, σε αντίθεση με το *Mastus* που στερείται υβριδικών ειδών.

Η οικογένεια Geomitridae, παρόλο που έχει ερευνηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια, δεν κατάφερε να αποδώσει συσχετισμό με τις οικογένειες που συγκρίθηκε στην παρούσα έρευνα. Ωστόσο, η μελέτη των ειδών της παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον τόσο ως τη μορφολογία, αλλά και της σύνδεσης της με τη γενεαλογία. Πιο συγκεκριμένα, οι Lazaridou M. & Chatziioannou M. (2005) σε έρευνά τους πάνω στο είδος *Xerolenta obniva* ισχυρίστηκαν ότι πληθυσμοί χωρίς σκουρόχρωμες ραβδώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερη ανεκτικότητα στη ζέστη και συνεπώς πλεονεκτούν στις ξηρές και θερμές κλιματικές συνθήκες σε αντίθεση με τους πληθυσμούς που φέρουν τον αντίστοιχο φαινότυπο. Πιθανότατα λοιπόν, ελέγχοντας τη μορφολογία του κελύφους, να μπορούμε να συμπεράνουμε ότι διαμορφώνουν και τη συμπεριφορά τους ανάλογα το κλίμα που διαβιούν, τείνουν δηλαδή να προσαρμοστούν στις κλιματικές συνθήκες όσον αφορά την ενεργητικότητά, όπως για παράδειγμα τον ρυθμό αύξησης, γονιμότητας ή θνησιμότητας. Μπορεί να θεωρηθεί επομένως ότι τα είδη που βρίσκονται σχετικά κοντά μεταξύ τους ανταποκρίνονται στις εξελικτικές πιέσεις του περιβάλλοντος με την προσαρμογή σε αυτές αλλάζοντας το φαινότυπό τους. Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγουν και οι Chueca L. et al (2016) όσον αφορά τη διαφοροποίηση του μεγέθους των ειδών του γένους *Xerocrassa*, όταν αυτά κατοικούν σε μικρά νησιά, γεγονός που θέτει όμως το μέγεθος ως μη ισχυρό κριτήριο ταξινόμησης. Επιπλέον, ο Lewis G.(1975) αναφέρει ότι τα ζώα του είδους *Cochlicella acuta* που βρίσκονται σε αμμώδη περιβάλλοντα εμφανίζουν πιο σκούρο κέλυφος, γεγονός που τα βοηθάει να προστατευτούν από τους θηρευτές, όμως φαίνεται να

διαφοροποιούνται όταν βρεθούν σε χλοερά περιβάλλοντα, αφού εμφανίζουν ανοιχτόχρωμα κελύφη που τα καθιστά πιο εύκολα ορατά και ισχυρίζεται ότι ενδέχεται να ακολουθούν το μοτίβο που λέει ότι τα γονίδια που υπάρχουν κοντινότερα στους γενετικούς τόπους που αφορούν το χρώμα των ραβδώσεων και του φόντου, παράγουν και ορατά χαρακτηριστικά στο κέλυφος. Παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν τις συχνότητες των γονιδίων αυτών μπορεί να είναι επίσης η θερμοκρασία και το γεωγραφικό πλάτος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα της οικογένειας Helicidae ήταν ικανοποιητικό ως προς τον αριθμό ειδών και επομένως μπορούμε να εξάγουμε ισχυρότερα συμπεράσματα. Ωστόσο, τα δεδομένα των ειδών των οικογενειών της περιοχής ενδιαφέροντος είναι ελάχιστα και χρειάζεται να γίνει περισσότερη έρευνα επί του θέματος, αλλά και όσον αφορά τη χαρτογράφηση των ειδών της περιοχής, ώστε να μπορέσουμε να εξάγουμε σχετικά συμπεράσματα για το αν υπάρχει συσχετισμός των αβιοτικών παραγόντων και της γενεαλογίας.

Συγκρίνοντας λοιπόν, παρόμοια μοτίβα από μελέτες που έχουν γίνει σε άλλα είδη σαλιγκαριών, σε συνδυασμό και με τη σύγκριση της γενεαλογίας βάση μιτοχρονδιακών γονιδίων, μπορούμε να εξάγουμε και τα ανάλογα συμπεράσματα κάθε φορά, ελέγχοντας μια σειρά αβιοτικών παραγόντων που μαρτυράνε πολλά σχετικά με την διατήρηση αλλά και τον έλεγχο των ειδών στα διάφορα οικοσυστήματα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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. doi:10.1007/s11033-014-3029-5
- Baker, G. H., & Vogelzang, B. K. (1988). Life History, Population Dynamics and Polymorphism of *Theba pisana* (Mollusca: Helicidae) in Australia. *The Journal of Applied Ecology*, 25(3), 867. doi:10.2307/2403752
- Barker, G.M., 2001. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. In: Barker, G.M. (Ed.), *The biology of terrestrial molluscs*. CAB International, New York, pp. 1–146.
- Berrie, A. D. (1980). Pulmonates. Academic Press, London, Volume 2A Systematics, Evolution and Ecology. Pp. xi+ 540. Pound 24.50. Volume 2B Economic Malacology. Vol. 49, No. 3 (Oct., 1980), pp. 1013-1014 Published by: British Ecological Society
- Biljana Rađa, Tonći Rađa, Jasna Puizina, Ivica Šamanić, and Mate Šantić "Shell Characteristics of Land Snail *Eobania vermiculata* (Müller, 1774) (Helicidae) from Croatia," *American Malacological Bulletin* 30(2), 299-307, (1 June 2012). <https://doi.org/10.4003/006.030.0209>
- Cameron, R. A. D., & Cook, L. M. (1989). Shell size and shape in Madeiran land snails: do niches remain unfilled? *Biological Journal of the Linnean Society*, 36(1-2), 79–96. doi:10.1111/j.1095-8312.1989.tb00484.x

- Caro, A., Neiber, M. T., Juan Gómez-Moliner, B., & José Madeira, M. (2019). Molecular phylogeny and biogeography of the land snail subfamily Leptaxinae (Gastropoda: Hygromiidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106570. doi:10.1016/j.ympev.2019.106570
- Chang, Z-Y., Liew, T-S. (2021) A molecular phylogeny of Geotrochus and Trochomorpha species (Gastropoda: Trochomorphidae) in Sabah, Malaysia reveals convergent evolution of shell morphology driven by environmental influences Published February 2, 2021, PubMed 33604162. doi.org/10.7717/peerj.10526
- Chiba, S. (2010). Species Diversity and Conservation of *Mandarina*, an Endemic Land Snail of the Ogasawara Islands. *Restoring the Oceanic Island Ecosystem*, 117–125. doi:10.1007/978-4-431-53859-2_18
- Chiba, S., & Davison, A. (2007). Shell shape and habitat use in the North-west Pacific land snail *Mandarina polita* from Hahajima, Ogasawara: current adaptation or ghost of species past? *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(1), 149–159. doi:10.1111/j.1095-8312.2007.00790.x
- Chueca, L. J., Gómez-Moliner, B. J., Forés, M., & Madeira, M. J. (2016). Biogeography and radiation of the land snail genus *Xerocrassa* (Geomitridae) in the Balearic Islands. *Journal of Biogeography*, 44(4), 760–772. doi:10.1111/jbi.12923
- Clements, R., Ng, P. K. L., Lu, X. X., Ambu, S., Schilthuizen, M., & Bradshaw, C. J. A. (2008). Using biogeographical patterns of endemic land snails to improve conservation planning for limestone karsts. *Biological Conservation*, 141(11), 2751–2764. doi:10.1016/j.biocon.2008.08.011

- Cook, L. M. (2008). Variation with habitat in *Cepaea nemoralis*: the Cain & Sheppard diagram. *Journal of Molluscan Studies*, 74(3), 239–243.
doi:10.1093/mollus/eyn011
- Cook, L. M., & Jaffar, W. N. (1984). Spire index and preferred surface orientation in some land snails. *Biological Journal of the Linnean Society*, 21(3), 307–313. doi:10.1111/j.1095-8312.1984.tb00368.x
- Fassio, G., Modica, M. V., Alvaro, M. C., Buge, B., Salvi, D., Oliverio, M., & Schiaparelli, S. (2019). An Antarctic flock under the Thorson's rule: Diversity and larval development of Antarctic Velutinidae (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 132, 1–13.
doi:10.1016/j.ympev.2018.11.017
- Fehér, Z., Mason, K., Szekeres, M., Haring, E., Bamberger, S., Páll-Gergely, B., & Sóllymos, P. (2018). Range-constrained co-occurrence simulation reveals little niche partitioning among rock-dwelling Montenegrina land snails (Gastropoda: Clausiliidae). *Journal of Biogeography*, 45(6), 1444–1457.
doi:10.1111/jbi.13220
- Feher, Z., Parmakelis, A., Koutalianou, M., Mourikis, T., Eross, Z. P., & Krizsik, V. (2013). A contribution to the phylogeny of Albanian Agathylla (Gastropoda, Clausiliidae): insights using morphological data and three mitochondrial markers. *Journal of Molluscan Studies*, 80(1), 24–34.
doi:10.1093/mollus/eyt039
- Giokas, S., Páll-Gergely, B. & Mettouris, O. Nonrandom variation of morphological traits across environmental gradients in a land snail. *Evol Ecol* 28, 323–340 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10682-013-9676-5>

- Hadfield, M. G., Miller, S. E., & Carwile, A. H. (1993). The Decimation of Endemic Hawai'ian Tree Snails by Alien Predators. *American Zoologist*, 33(6), 610–622. doi:10.1093/icb/33.6.610
- Heller, J. (1987). Shell shape and land-snail habitat in a Mediterranean and desert fauna. *Biological Journal of the Linnean Society*, 31(3), 257–272. doi:10.1111/j.1095-8312.1987.tb01992.x
- Holland, B. S., & Cowie, R. H. (2007). A geographic mosaic of passive dispersal: population structure in the endemic Hawaiian amber snail *Succinea caduca* (Mighels, 1845). *Molecular Ecology*, 16(12), 2422–2435. doi:10.1111/j.1365-294x.2007.03246.x
- Kotsakiozi, P., Pafilis, P., Giokas, S., & Valakos, E. (2012). A comparison of the physiological responses of two land snail species with different distributional ranges. *Journal of Molluscan Studies*, 78(2), 217–224. doi:10.1093/mollus/ey003
- Lazaridou, M., & Chatziioannou, M. (2005). Differences in the life histories of *Xerolenta Obvia* (Menke, 1828) (Hygromiidae) in a coastal and a mountainous area of northern Greece. *Journal of Molluscan Studies*, 71(3), 247–252. doi:10.1093/mollus/eyi032
- Lewis, G. (1975). Shell polymorphism in the snail *Cochlicella acuta* (Müller) and some data on its genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 7(2), 147–160. doi:10.1111/j.1095-8312.1975.tb00737.x
- Liew T, Marzuki ME, Schilthuizen M, Chen Y, Vermeulen JJ, Mohd-Azlan J. (2020). Molecular phylogenetics and evolutionary history of the endemic land

snail genus *Everettia* in northern Borneo. *PeerJ* 8:e9416

<https://doi.org/10.7717/peerj.9416>

- Madec, L. (2000). Phenotypic plasticity in reproductive traits: importance in the life history of *Helix aspersa* (Mollusca: Helicidae) in a recently colonized habitat. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(1), 25–39.
doi:10.1006/bjpl.1999.0324
- Marzec, M., Kuźnik-Kowalska, E., & Proćków, M. (2020). Shell morphology, growth pattern and population dynamics of the land snail *Xerolenta obvia* (Menke, 1828) in two areas of different climatic conditions within a temperate climate region. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 66(1), pp. 69–84, 2020 DOI: 10.17109/AZH.66.1.69.2020
- Mason, K., Fehér, Z., Bamberger, S., Reier, S., Szekeres, M., Sattmann, H., Kruckenhauser, L., De Mattia, W., Haring, E. (2020). New insights into and limitations of the molecular phylogeny in the taxon-rich land snail genus *Montenegrina* (Mollusca: Gastropoda: Clausiliidae)
<https://doi.org/10.1111/jzs.12413>
- Mordan, P.B. (1977). Factors affecting the distribution and abundance of *Aegopinella* and *Nesovitrea* (Pulmonata: Zonitidae) at Monks Wood National Nature Reserve, Huntingdonshire. *Biological Journal of the Linnean Society*, 9: 59-72. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1977.tb00259.x>
- Murphy, M. J. (2002). *Molluscan Research*, 22(2), 149. doi:10.1071/mr02007
- Nägele, K.-L., & Hausdorf, B. (2015). Comparative phylogeography of land snail species in mountain refugia in the European Southern Alps. *Journal of Biogeography*, 42(5), 821–832. doi:10.1111/jbi.12477

- Parent, C. E., & Crespi, B. J. (2006). Sequential colonization and diversification of Galapagos endemic land snail genus *Bulimulus* (Gastropoda, Stylommatophora). *Evolution*, 60(11), 2311–2328. doi:10.1111/j.0014-3820.2006.tb01867.x
- Parent, C. E., & Crespi, B. J. (2009). Ecological Opportunity in Adaptive Radiation of Galápagos Endemic Land Snails. *The American Naturalist*, 174(6), 898–905. doi:10.1086/646604
- Parmarkelis, A., Pfenninger, M., Spanos, L., Papagiannakis, G., Louis, C., & Mylonas, M. (2005). Inference of a radiation in *Mastus* (Gastropoda, Plumonata, Enidae) on the island of Crete. *Evolution*, 59(5), 991–1005. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb01038.x
- Pfenninger, M., Hrabáková, M., Steinke, D., & Dèpraz, A. (2005). Why do snails have hairs? A Bayesian inference of character evolution *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 59. doi:10.1186/1471-2148-5-59
- Proćków, M., Kuźnik-Kowalska, E., & Mackiewicz, P. (2017). The Influence of Climate on Shell Variation in *Trochulus striolatus* (C. Pfeiffer, 1828) (Gastropoda: Hygromiidae) and Its Implications for Subspecies Taxonomy. *Annales Zoologici*, 67(2), 199–220. doi:10.3161/00034541anz2017.67.2.002
- Proćków, M., Proćków, J., Błażej, P., & Mackiewicz, P. (2018). The influence of habitat preferences on shell morphology in ecophenotypes of *Trochulus hispidus* complex. *Science of The Total Environment*, 630, 1036–1043. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.311
- Raphalo, E. M., Cole, M. L., & Daniels, S. R. (2020). Climatic Raphalo, E. M., Cole, M. L., & Daniels, S. R. (2020). Climatic oscillations during the

Mio/Pliocene epochs induced cladogenesis in the terrestrial snail genus *Gittenedouardia* (Mollusca: Gastropoda: Cerastidae) from South Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107000.

doi:10.1016/j.ympev.2020.107000

- Riley, L. A., Dybdahl, M. F., & Hall, R. O. (2008). Invasive species impact: asymmetric interactions between invasive and endemic freshwater snails. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(3), 509–520.
doi:10.1899/07-119.1
- Rossini, R. A., Fensham, R. J., & Walter, G. H. (2017). Spatiotemporal variance of environmental conditions in Australian artesian springs affects the distribution and abundance of six endemic snail species. *Aquatic Ecology*, 51(4), 511–529. doi:10.1007/s10452-017-9633-4
- Schmidt-Nielsen K., Taylor C. R. & Shkolnik A. (1971). "Desert Snails: Problems of Heat, Water and Food". *The Journal of Experimental Biology*. 55 (2): 385–398. PMID 5114030.
- Solem, Alan. (1990). "How many Hawaiian land snail species are left? And what we can do for them." *Bishop Mus. Occas. Pap.* 30 (1990): 27-40.
- Steinke, D., Albrecht, C., & Pfenninger, M. (2004). Molecular phylogeny and character evolution in the Western Palaearctic Helicidae s.l. (Gastropoda: Stylommatophora). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(3), 724–734.
doi:10.1016/j.ympev.2004.03.004
- Vinarski, M. V., Aksenova, O. V., Beshpalaya, Y. V., Bolotov, I. N., Schniebs, K., Gofarov, M. Y., & Kondakov, A. V. (2016). *Radix dolgini*: The integrative taxonomic approach supports the species status of a Siberian endemic snail

(Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae). *Comptes Rendus Biologies*, 339(1), 24–36. doi:10.1016/j.crv.2015.11.002

- Vogler, R. E., Beltramino, A. A., Strong, E. E., Rumi, A., & Peso, J. G. (2016). Insights into the Evolutionary History of an Extinct South American Freshwater Snail Based on Historical DNA. *PLOS ONE*, 11(12), e0169191. doi:10.1371/journal.pone.0169191
- Yom-Tov Y. (1970). The Effect of Predation on Population Densities of Some Desert Snails. *Ecology*, September 1970, Vol. 51, No. 5: pp. 907-911

6. ABSTRACT

In the present study, the construction of the phylogenetic tree was achieved, consisting of terrestrial snail species from southeast Europe and by using the mitochondrial gene 16S as a molecular marker. *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, *Theba pisana* and *Cochlicella acuta* species were used for the DNA extraction at the experimental part, while sequences from Helicidae, Hygromiidae, Clausiliidae, Enidae, Zonitidae και Geomitridae species were added for the phylogenetic tree construction. The aim of this study was to check through phylogenetic relationships whether the snail families from the region of interest follow the pattern of group together depending on abiotic parameters such as habitat and morphology. Results show that Helicidae and Zonitidae cluster together according to abiotic parameters, but in the final grouping in which phylogeny of species was taken into account, three different clusters occurred. The first consisted of Helicidae, Hygromiidae and Geomitridae, the second consisted of Clausiliidae and Enidae, while Zonitidae species cluster with each other at the last grouping.

Keywords: phylogenetic analysis, terrestrial snails, northeast Europe, abiotic parameters, family grouping