



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ  
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ  
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Εκπαίδευσης και Αρχικής  
Επαγγελματικής Κατάρτισης

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ-ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

“Πληθυσμιακή γενετική του εδώδιμου σαλιγκαριού, *Helix aspersa*  
με χρήση μικρο-δορυφορικού DNA.”

**ΓΚΟΓΚΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ**

ΒΟΛΟΣ 2008

“Πληθυσμιακή γενετική του εδώδιμου σαλιγκαριού, *Helix aspersa* με χρήση μικροδορυφορικού DNA με στόχο την διατήρηση φυσικών αποθεμάτων και ανάπτυξη τεχνογνωσίας εντατικής εκτροφής του.”

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**-Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**  
**Λέκτορας Γενετικής Υδροβίων Ζωικών Οργανισμών**  
**Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος**  
**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**  
**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**  
**Επιβλέπων**

**-Χρήστος Νεοφύτου**  
**Καθηγητής Υδροβιολογίας-Ιχθυολογίας**  
**Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος**  
**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**  
**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**  
**Μέλος**

**-Μαρία Λαζαρίδου**  
**Καθηγήτρια Γενικής Ζωολογίας**  
**Τομέας Ζωολογίας**  
**Τμήμα Βιολογίας**  
**Σχολή Θετικών Επιστημών**  
**Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης**  
**Μέλος**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ θερμά τον Μανώλη Μαλανδράκη την Κατερίνα Χατζηπλή και την Όλγα Ντανταλή για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η γενετική παραλλακτικότητα και ο πολυμορφισμός του κελύφους του εδώδιμου σαλιγκαριού *H. aspersa* από έντεκα διαφορετικού πληθυσμούς της Ελλάδας και της Κύπρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του κελύφους εξαρτώνται από τις κλιματικές συνθήκες σε αντίθεση με τα μορφολογικά. Το δενδρογράμμα των μορφολογικών χαρακτηριστικών του κελύφους ομαδοποίησε τους πληθυσμούς με βάση τις ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες.

Τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι το ποσοστό της μοριακής παραλλακτικότητας εντός των πληθυσμών ήταν υψηλότερο από αυτό μεταξύ των πληθυσμών. Οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg ήταν στατιστικά σημαντικές για όλα τα ζεύγη των γενετικών τόπων για όλους τους πληθυσμούς. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας και των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Οι τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας ήταν σχετικά χαμηλές ( $F_{ST} = 0,141$ ,  $P < 0.001$ ). Όλοι οι πληθυσμοί πέρασαν η περνούν από στενωπό με αποτέλεσμα τη μείωση της αναμενόμενης παραλλακτικότητας. Τα δενδρογράμματα των γενετικών αποστάσεων ομαδοποίησαν τους πληθυσμούς σε ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές.

Λέξεις Κλειδιά: *H. aspersa*, γενετική παραλλακτικότητα, μικρο-δοτυφορικό DNA,

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	6
1.1.	Συστηματική κατάταξη .....	8
1.2.	Γεωγραφική εξάπλωση .....	11
1.3.	Βιότοποι .....	12
1.4.	Αναπαραγωγή .....	14
1.5.	Περιγραφή.....	15
2.	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	16
2.1.	Περιοχές συλλογής και επεξεργασία δειγμάτων.....	16
2.2.	Απομόνωση DNA .....	21
2.3.	Ηλεκτροφόρηση DNA .....	23
2.4.	Επιλογή μικροδορυφορικών τόπων .....	24
2.5.	Γονοτύπιση μικροδορυφορικών αλληλουχιών .....	28
2.6.	Στατιστική ανάλυση.....	30
3.	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	32
3.1.	Μορφομετρικά χαρακτηριστικά .....	32
3.2.	Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης.....	37
4.	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	50
5.	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	55
6.	<b>ABSTRACT</b> .....	60
7.	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	61

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το εδώδιμο σαλιγκάρι *Helix aspersa* είναι ένα από τα σημαντικότερα είδη σαλιγκαριών σε παγκόσμια κλίμακα. Το μεγαλύτερο μέρος των ποσοτήτων αυτού του είδους που καταναλώνεται προέρχεται από συλλογή σαλιγκαριών από φυσικούς πληθυσμούς. Η ελάττωση όμως των φυσικών πληθυσμών έχει ως αποτέλεσμα την ανάγκη για τη δημιουργία εκτροφείων σε πολλές χώρες του κόσμου όπου υπάρχουν φυσικοί πληθυσμοί αυτού του είδους. Σήμερα, η **σαλιγκαροτοφία** έχει αναπτυχθεί κατά κύριο λόγο στη Γαλλία και σε μεγάλο βαθμό στην Ισπανία, στην Ιταλία, στη Βραζιλία, στην Αργεντινή και στις Η.Π.Α.

Στη χώρα μας ο κλάδος της σαλιγκαροτροφίας δεν έχει αναπτυχθεί παρά το γεγονός ότι υπάρχουν όλες οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξή του και μάλιστα παρουσιάζει συγκριτικό πλεονέκτημα ανταγωνιστικότητας σε σχέση με τις περισσότερες χώρες όπου επιχειρείται να αναπτυχθεί η εκτροφή των σαλιγκαριών.

Για την ανάπτυξη αυτού του κλάδου της ημιυδροβιας ζωικής παραγωγής, δύο είναι τα σημαντικότερα ζητήματα που πρέπει να μελετηθούν:

- η βιολογία αναπαραγωγής και
- η τεχνολογία παραγωγής

Το πρωταρχικό και κρισιμότερο στάδιο που αφορά την τεχνογνωσία της βιολογίας αναπαραγωγής του σαλιγκαριού είναι η προέλευση και η επιλογή των γεννητόρων. Κάθε μονάδα εκτροφής προμηθεύεται και ανανεώνει το γεννητικό υλικό (γεννήτορες) από σαλιγκάρια που προέρχονται από φυσικούς πληθυσμούς. Είναι σημαντικό, επομένως, να καθοριστούν εκείνα τα κριτήρια επιλογής γεννητόρων οι οποίοι θα διαθέτουν τα μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά που θα εξυπηρετούν τις παραγωγικές ανάγκες κάθε εκτροφείου σαλιγκαριών.

Τα πρωτόκολλα αναπαραγωγής και πάχυνσης των σαλιγκαριών σε συνθήκες τεχνητής εκτροφής, η υλικοτεχνική υποδομή κάθε εκτροφείου, η γεωγραφική περιοχή που είναι εγκατεστημένο καθώς και οι απαιτήσεις της αγοράς σχετικά με την ποιότητα των παραγόμενων σαλιγκαριών, καθορίζουν την τεχνολογία παραγωγής σαλιγκαριών. Ο καθορισμός όλων των παραπάνω παραμέτρων που αφορούν την τεχνολογία παραγωγής εξαρτώνται αποκλειστικά και μόνο από τα χαρακτηριστικά των φυσικών πληθυσμών των σαλιγκαριών που θα χρησιμοποιηθούν ως γεννήτορες.

Οι περιοχές εξάπλωσης των φυσικών πληθυσμών του *H. aspersa* στη χώρα μας εκτείνονται από τη Στερεά Ελλάδα και νοτιότερα, καθώς επίσης και σε όλες τις νησιωτικές περιοχές. Το έντονο ανάγλυφο του εδάφους, τα διαφορετικά είδη φυτοκάλυψης και βλάστησης και οι ιδιαίτερες μικροκλιματικές συνθήκες στις περιοχές εξάπλωσης του είδους αυτού, ενδεχομένως, έχει ως αποτέλεσμα τη γενετική απομόνωση των πληθυσμών. Η απομόνωση αυτή μπορεί εξελικτικά να προκαλεί έντονες διαφοροποιήσεις τόσο στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, ακόμη και των γειτονικών πληθυσμών, όσο και στις ηθολογικές τους αποκρίσεις. Η διάρκεια θερινής νάρκης, η χειμερινή νάρκη σε ορισμένους πληθυσμούς, η χρονική περίοδος της αναπαραγωγής και η χρονική περίοδος αύξησης των σαλιγκαριών είναι δυνατόν να διαφέρουν σε μικρό ή μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών.

Τα παραπάνω στοιχεία είναι τα πλέον κρίσιμα για την επιλογή των γεννητόρων στις μονάδες εκτροφής σαλιγκαριών καθώς αποτελούν τη βάση για τη δημιουργία των πρωτοκόλλων αναπαραγωγής.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω αναφερθέντα η παρούσα εργασία έθεσε ως στόχο τη μελέτη των φυσικών πληθυσμών σαλιγκαριών από διαφορετικές περιοχές με την καταγραφή των μορφομετρικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών του κελύφους καθώς και της γενετικής τους παραλλακτικότητας. Σκοπός αυτής της



εργασίας είναι να εντοπιστούν οι φυσικοί πληθυσμοί σαλιγκαριών που διαθέτουν τα γενετικά χαρακτηριστικά που ανταποκρίνονται καλύτερα σε συνθήκες εκτροφής και εκείνα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που είναι πιο αρεστά στους καταναλωτές.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού αποτελούν την έκφραση της εξελικτικής διαδικασίας του γονοτύπου στο φαινότυπο. Η δυνατότητα της διαδικασίας ανάπτυξης αρμοστικού φαινοτύπου, παρά τους ενδεχόμενους παράγοντες διατάραξης, ορίζεται από την αναπτυσσόμενη σταθερότητα η οποία μπορεί να επηρεαστεί από γενετικές και περιβαλλοντικές παραμέτρους. (Wilkins et al., 1995).

Ο γεωγραφικός πολυμορφισμός στα εδώδιμα σαλιγκάρια του ερευνηθέντος είδους *H. aspersa* έχει μελετηθεί με την ανάλυση ισοενζύμων – αλλοενζύμων, με την εξέταση μιτοχονδιακού DNA και την καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών του κελύφους σε πληθυσμούς σαλιγκαριών της Δυτικής Ευρώπης και της Βορείου Αφρικής (Madec, 1991a, b; Madec and Guiller, 1994; Guiller et al., 1994, 2000; Madec et al., 2000). Στην Ελλάδα ο πολυμορφισμός στα εδώδιμα σαλιγκάρια του είδους *H. aspersa* έχει μελετηθεί με την ανάλυση ισοενζύμων – αλλοενζύμων (Lazaridou-Dimitriadou et al., 1993).

Στην παρούσα εργασία η γενετική παραλλακτικότητα εξετάστηκε από τον εντοπισμό μικροδορυφορικών τόπων από DNA διαφορετικής ποιότητας και ποσότητας από σαλιγκάρια 11 πληθυσμών των ευρύτερων περιοχών Πελοποννήσου, Κρήτης, Σύρου και Κύπρου.

### **1.1. Συστηματική κατάταξη**

Το *H. aspersa* ανήκει στην κλάση των Γαστεροπόδων του φύλου Μαλάκια. Είναι στυλομματοφόρο σαλιγκάρι, πνευμονοφόρο και μέλος της οικογένειας των Helicidae.

Το φύλο των Μαλακίων είναι το πολυπληθέστερο στο ζωικό βασίλειο μετά από αυτό των Αρθροπόδων. Η πολυπληθέστερη κλάση είναι των Γαστεροπόδων καθώς περιλαμβάνει περίπου 30.000–35.000 είδη, τα οποία κατανέμονται σε 230 οικογένειες και 1.640 γένη (Solem, 1977).

Η συστηματική κατάταξη του σαλιγκαριού *H. aspersa* σύμφωνα με το Solem (1977) είναι η παρακάτω:

- Φύλο: Mollusca (Μαλάκια)
- Κλάση: Gastropoda (Γαστερόποδα)
- Υποκλάση: Pulmonata (Πνευμονοφόρα)
- Τάξη: Stylommatophora (Στυλομματοφόρα)
- Υπεροικογένεια: Helicacea
- Οικογένεια: Helicidae
- Γένος: *Helix*
- Είδος: *aspersa* (Müller, 1774)

#### *Helix aspersa* (Müller, 1774)

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια διαμάχη σχετικά με τη συστηματική κατάταξη και επιστημονική ονοματολογία του *Helix aspersa*. Το ζήτημα της ονοματολογίας του είδους αυτού (κατά άλλους *Cornu aspersum*) δείχνει πως το όνομα διαφορετικών ειδών σαλιγκαριών έχει ανακαταταχθεί σε άλλα γένη, είδη ή και υποείδη.

Για πρώτη φορά, το είδος περιγράφηκε ως *Helix aspersa* από το Δανό φυσιοδίφη Otto Friedrich Müller (1730-1784) στο "Vermium Terrestrium et Fluviatilium seu animalium infusorium, helminthicorum, et testaceorum non marinorum succincta historia". Μια άλλη συστηματική ονομασία για το *Helix aspersa*, το *Cryptomphalus*

*aspersus* αποδόθηκε το 1837 από τον Jean de Charpentier στο "Catalogue des mollusques terrestres et fluviatiles de la Suisse". Το *Cryptomphalus* στα ελληνικά σημαίνει «κρυμμένος ομφαλός» και αναφέρεται στον ομφαλό που βρίσκεται στο κάτω μέρος του κελύφους.

Στον κατάλογο European Continental Mollusca (Clecom, 2001) το είδος καταχωρείται ως *Cornu aspersum aspersum* (Muller, 1774) από το γένος *Cornu*, (Born, 1778). Οι Giusti et al. (1996) στο βιβλίο τους "The non-marine molluscs of the Maltese Islands" κατατάσσουν το *Helix aspersa* (Muller, 1774) και το *Cantareus apertus* (Born, 1778) σε ένα κοινό γένος, το *Cantareus* (Risso, 1826). Η παραπάνω άποψη των Giusti et al. (1996) για την ταξινόμηση του *Cornu* και *Cantareus* σε ένα κοινό γένος, το *Cantareus* δε γίνεται αποδεκτή από την πλειοψηφία των Μαλακολόγων.

Σήμερα, μερικοί Μαλακολόγοι χρησιμοποιούν το όνομα *Cantareus aspersus* σύμφωνα με τους Giusti et al. (1996), ενώ άλλοι παραμένουν στο *Cornu aspersum* σύμφωνα με το κατάλογο CLECOM (2001).

Στην παρούσα εργασία το σαλιγκάρι θα αναφέρεται ως *Helix aspersa* μια και το συγκεκριμένο εδώδιμο σαλιγκάρι αποτελεί ένα από τα πιο εμπορικά είδη σαλιγκαριών στο κόσμο και η προαναφερθείσα λατινική του ονομασία χρησιμοποιείται διεθνώς στις εμπορικές συναλλαγές. Επιπλέον, εκατοντάδες επιστημονικές εργασίες τα τελευταία 30 και πλέον χρόνια στη διεθνή κυρίως βιβλιογραφία χρησιμοποιούν το όνομα *Helix aspersa*.

## 1.2. Γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. aspersa* αποτελεί ένα από τα πιο επιτυχημένα εξελικτικά είδη μεταξύ των χερσαίων πνευμονοφόρων γαστερόποδων, γεγονός που αποδίδεται στην εξαιρετική του προσαρμοστικότητα, η οποία είναι απόρροια των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του αναπαραγωγικού του συστήματος (π.χ. πολλαπλά ζευγαρώματα) και του βιολογικού του κύκλου (Selander & Kaufman 1975; Madec & Daguzan 1993). Γενικά, προτιμά υγρές περιοχές με ήπιο κλίμα, μαλακό έδαφος και χαμηλό υψόμετρο, αν και μερικές φορές συναντάται σε υψόμετρο πάνω από 555 m, (Lazaridou-Dimitriadou et al., 1993)

Θεωρείται είδος μεσογειακής καταγωγής το οποίο, με τη βοήθεια του ανθρώπου, έχει διασπαρεί σε εύκρατες και τροπικές περιοχές, και έτσι συναντάται πλέον σε πολλές περιοχές του κόσμου (Burch, 1960). Εκτός από τις παραμεσόγειες χώρες, είναι ευρύτατα διαδεδομένο στις ωκεάνιες χώρες της Δ. Ευρώπης (κυρίως στη Γαλλία), ενώ σποραδικά συναντάται στην Κ. Ευρώπη, στη Β. Αφρική και στην Α. Ασία. Από το 1859 το είδος αυτό έχει μεταφερθεί και στην περιοχή της Καλιφόρνιας και από εκεί εξαπλώθηκε και σε άλλες δυτικές πολιτείες των Η.Π.Α. (Basinger, 1931; Capinera, 2001).

Τα τελευταία χρόνια έχει μεταφερθεί και στη Ν. Αφρική, στο Μεξικό, στη Ν. Αμερική, και στην Αυστραλία (Gallo, 1986). Απολιθώματα από το ανώτερο πλειόκαινο στη Β. Αφρική, καθώς επίσης και στη Ν. Γαλλία, στην Ισπανία και στην Κορσική δείχνουν κατανομή του και στη Δυτική Μεσόγειο. Το είδος αυτό μεταφέρθηκε στα βρετανικά νησιά από τους Κέλτες πολύ πριν από τους Ρωμαίους, ενώ σε πολλές περιοχές της Ευρώπης διαδόθηκε από τους Ρωμαίους. Η εξάπλωσή

του συνέβη κατά τη διάρκεια των σύγχρονων χρόνων, μέσω της μεταφοράς φρούτων και λαχανικών.

Στην Κ. Ευρώπη δεν μπόρεσε να εξαπλωθεί ακολουθώντας ένα πρότυπο συνεχόμενης κατανομής, γιατί αδυνατεί να αντιμετωπίσει τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες που σημειώνονται το χειμώνα (λόγω του μεμβρανώδους επιφράγματος που παράγει σε αντίθεση με άλλα σαλιγκάρια της οικογένειας Helicidae που παράγουν ασβεστώδες επίφραγμα που τους παρέχει προστασία από χαμηλές θερμοκρασίες (Ansart, 2002). Απαντάται σε περιοχές κοντά στο Ρήνο και γύρω από τη Βιέννη. Στη χώρα μας είναι ευρύτατα διαδεδομένο στη νότια ηπειρωτική χώρα (από το νόμο Φθιώτιδας και νοτιότερα) και στα νησιά, ιδιαίτερα στην Κρήτη, όπου η οικογένεια Helicidae καταλαμβάνει το 30% της συνολικής πανίδας των μαλακίων (Λαζαρίδου - Δημητριάδου & Κάττουλας, 1985).

### **1.3. Βιότοποι**

Οι βιότοποι του *H. aspersa* στην Ελλάδα μπορούν να ομαδοποιηθούν στις παρακάτω κατηγορίες (προσωπικές καταγραφές):

1. Ελαιώνες με δέντρα μεγάλης ηλικίας που στον κορμό τους σχηματίζεται μεγάλος αριθμός κοιλωμάτων (κουφάλες). Τα κοιλώματα των δέντρων προφέρουν καταφύγιο στα σαλιγκάρια από τους φυσικούς τους εχθρούς, προστασία από τις ακραίες καιρικές συνθήκες, κατάλληλες συνθήκες κατά τη χειμερινή και τη θερινή τους νάρκη. Τα αποσυντιθέμενα φύλλα του δέντρου αποτελούν τη βασική τροφή των σαλιγκαριών. Στους ελαιώνες τα σαλιγκάρια αποθέτουν τα αυγά τους γύρω από τη ρίζα του δέντρου, όπου, όταν υπάρχει κλίση του εδάφους, οι ωαποθέσεις τους είναι προστατευμένες από το νερό κατά τις έντονες βροχοπτώσεις. Ωαποθέσεις

έχουν παρατηρηθεί και στα κοιλώματα των δέντρων που έχει σωρευτεί χώμα από τον άνεμο και φύλλα σε αποσύνθεση. Σε αυτές τις θέσεις τα σαλιγκάρια μπορούν να ωαποθέσουν όταν κατά την αναπαραγωγική περίοδο οι συνθήκες υγρασίας δεν είναι οι κατάλληλες και αυτό γιατί το χώμα σ' αυτές τις θέσεις διατηρεί την υγρασία και καθίσταται δυνατή η εκκόλαψη των αυγών. Είναι αναγκαίο να τονισθεί ότι σε ελαιώνες με δέντρα μικρής ηλικίας δε βρέθηκαν σαλιγκάρια αν και σε αυτούς υπάρχουν συστήματα άρδευσης που δημιουργούν ιδανικές συνθήκες υγρασίας .

2. Καλλιέργειες από εσπεριδοειδή (πορτοκαλιές, λεμονιές και μανταρινιές). Τα σαλιγκάρια σε αυτές τις καλλιέργειες τα συναντούμε πάνω στα δέντρα, γύρω από τη βάση του δέντρου καθώς και σε χόρτα που βρίσκονται ανάμεσα στα δέντρα. Η τροφή των σαλιγκαριών αποτελείται από φύλλα των εσπεριδοειδών σε αποσύνθεση, από τη φλούδα των καρπών καθώς και από διάφορα είδη πόων που φύονται ανάμεσα στα δέντρα. Κύριο χαρακτηριστικό αυτών των βιοτόπων είναι η έντονη βλάστηση λόγω των υψηλών τιμών υγρασίας από τα συστήματα άρδευσης (μπεκ υδρονέφωσης, σταγόνες κ.λπ.). Τα σαλιγκάρια ωαποθέτουν γύρω από τη βάση των εσπεριδοειδών, ακριβώς όπως και στους ελαιώνες. Η κινητικότητα των σαλιγκαριών σ' αυτούς τους βιοτόπους είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στους ελαιώνες .
3. Χέρσες πετρώδεις εκτάσεις με χαμηλή βλάστηση σε υψόμετρο συνήθως άνω των 300 m από την επιφάνεια της θάλασσας. Τα σαλιγκάρια εντοπίζονται κάτω από μεγάλες πέτρες ή σε πέτρινες αναβαθμίδες. Η τροφή τους αποτελείται από μονοετή ποώδη φυτά .

4. Περιοχές δίπλα σε ρέματα, αρδευτικά κανάλια με πυκνή βλάστηση από μονοετή φυτά και θάμνους. Τα σαλιγκάρια απαντώνται ανάμεσα στη βλάστηση, πάνω στα φυτά και τους θάμνους και τρέφονται με φύλλα ή χόρτα σε αποσύνθεση.

#### **1.4. Αναπαραγωγή**

Η αναπαραγωγική περίοδος του *H. aspersa* στη χώρα μας αρχίζει από τα μέσα Σεπτεμβρίου και λήγει στα μέσα Νοεμβρίου. Η έναρξη και η λήξη της ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή και το είδος του βιοτόπου. Στην Πελοπόννησο ξεκινά από τα μέσα Σεπτεμβρίου και λήγει στα τέλη Οκτωβρίου, ενώ στην Κρήτη ξεκινά στα μέσα Οκτωβρίου και λήγει στα μέσα Νοεμβρίου (Λαζαρίδου - Δημητριάδου & Κάττουλας, 1985).

Στην Πελοπόννησο η έναρξη και η λήξη της αναπαραγωγικής περιόδου ποικίλλει ανάλογα με το γεωγραφικό μήκος. Η διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου για τα σαλιγκάρια της Αν. Πελοποννήσου είναι μικρότερη από της Δ. Πελοποννήσου. Επίσης η βλάστηση του βιοτόπου καθώς και το υψόμετρο μεταβάλλουν τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (Λαζαρίδου - Δημητριάδου & Κάττουλας, 1985).

Η γεννητική ωρίμανση των σαλιγκαριών επέρχεται δύο χρόνια μετά την εκκόλαψη τους όταν η μεγάλη διάμετρος του κελύφους τους ξεπεράσει τα 30 mm και το βάρος τους υπερβεί τα 9 g (Felsenstein, 1989). Κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα ενός ώριμου αναπαραγωγικά σαλιγκαριού είναι το γυρισμένο περιστόμιο (Λαζαρίδου - Δημητριάδου & Κάττουλας, 1985).

Τα σαλιγκάρια γεννούν από 70 έως 100 αυγά. Τα νεοεκκολαπτόμενα σαλιγκάρια δε φέρουν ομφαλό (Λαζαρίδου - Δημητριάδου & Κάττουλας, 1985).

## 1.5. Περιγραφή

Το κέλυφος του *H. aspersa* έχει σχήμα σφαιρικό με τη μεγάλη διάμετρο του κελύφους να κυμαίνεται από 25 έως 40 mm και το ύψος από 25 έως 35 mm.

Χαρακτηριστικό του κελύφους των σαλιγκαριών είναι ο πολυχρωμισμός και ο πολυμορφισμός (Cain, 1981). Ο χρωματισμός της βάσης του κελύφους ποικίλλει από ανοιχτό κίτρινο μέχρι σκούρο καφέ.

Πάνω στο κέλυφος υπάρχουν σκουρόχρωμες επιμήκεις ζώνες διαφόρων τύπων (ζιγκ-ζαγκ λωρίδες, διακεκομμένες, πιτσιλωτές κ.λπ.) και χρωματισμών (Bookstein, 1989). Το χρώμα των ζωνώσεων εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σκούρες ζωνώσεις εμφανίζονται κυρίως σε σαλιγκάρια που μεγαλώνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες. Όταν τα σαλιγκάρια μεγαλώνουν σε θερμοκρασίες άνω των 25<sup>0</sup>C το χρώμα των ζωνώσεων γίνεται κόκκινο (Odile Lecompte et al., 1998).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

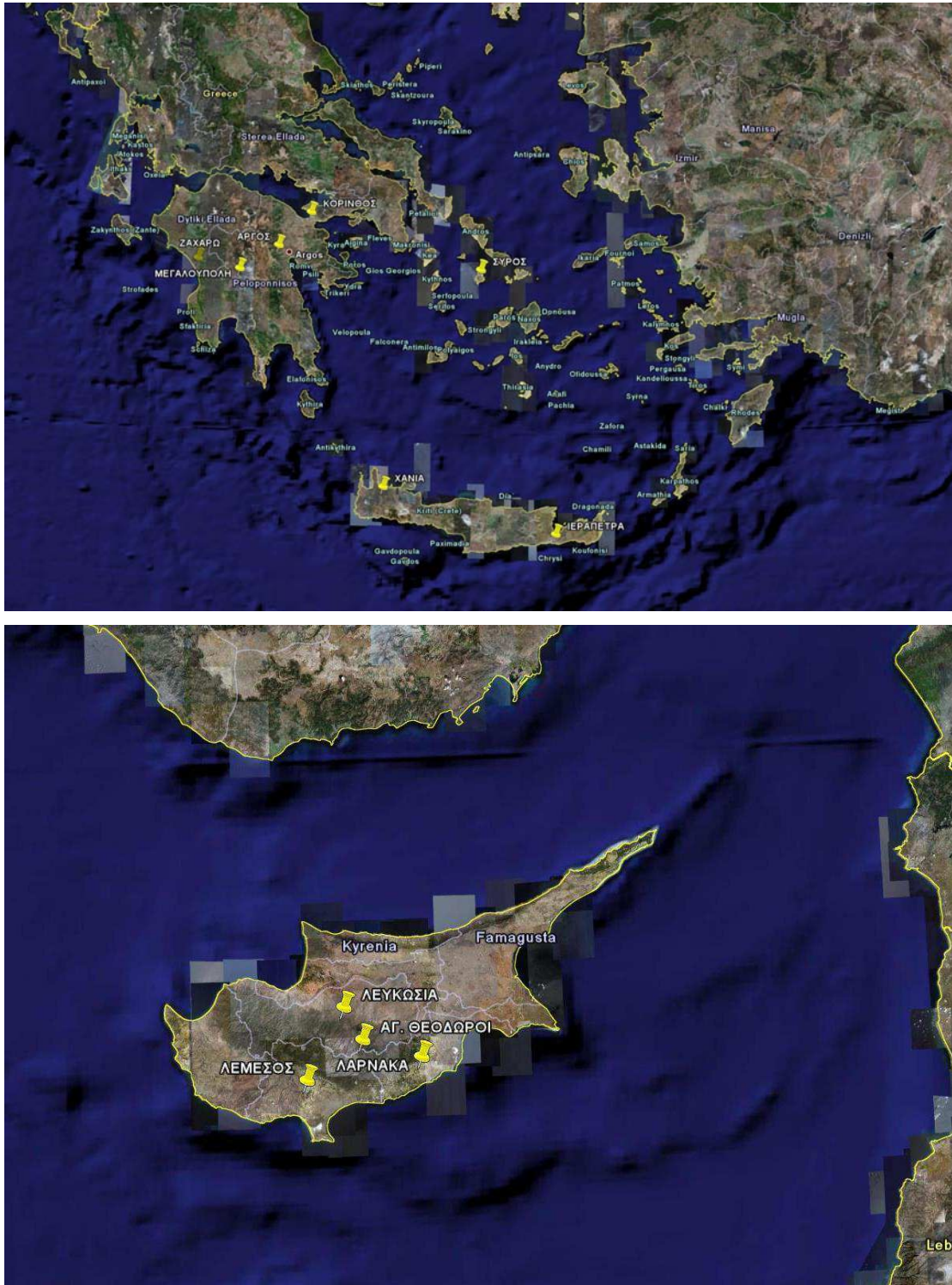
### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. Περιοχές συλλογής και επεξεργασία δειγμάτων

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας συλλέχθηκαν σαλιγκάρια από τέσσερις περιοχές της Πελοποννήσου, δύο της Κρήτης, τέσσερις της Κύπρου και μιάς της Σύρου. Ο αριθμός των ατόμων που συλλέχθηκαν από κάθε πληθυσμό κυμαινόταν από 45 έως 105 άτομα. Η επιλογή των περιοχών έγινε με βάση το ανάγλυφο του εδάφους, το είδος της βλάστησης και τη διαθεσιμότητα των σαλιγκαριών (Πίνακας 1, Εικόνα 1).

**Πίνακας 1.** Περιοχές δειγματοληψίας του *H. aspersa*, χαρακτηρισμός του βιοτόπου και αριθμός ατόμων που συλλέχθηκαν.

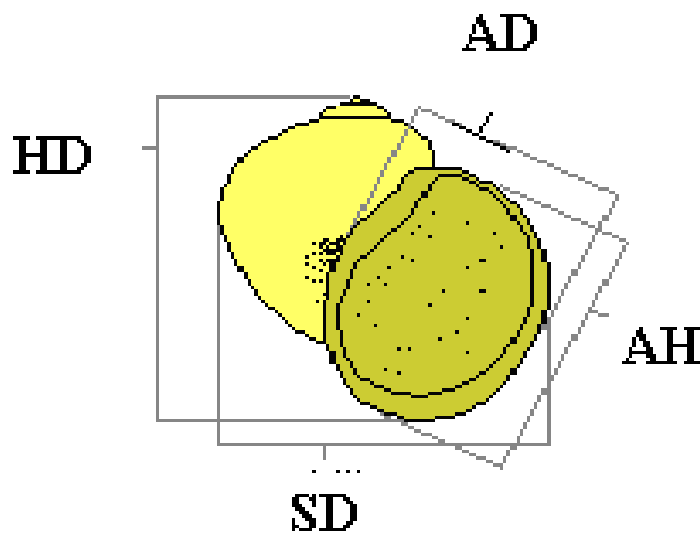
Περιοχές δειγματοληψίας	Είδος βιοτόπου	Υψόμετρο (m)	Αριθμός ατόμων
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΕΛΑΙΩΝΑΣ	150	105
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΧΕΡΣΑ ΠΕΤΡΩΔΗΣ ΕΚΤΑΣΗ	300	98
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	ΕΛΑΙΩΝΑΣ	140	100
ΖΑΧΑΡΩ	ΕΛΑΙΩΝΑΣ	270	64
ΣΥΡΟΣ	ΧΕΡΣΑ ΠΕΤΡΩΔΗΣ ΕΚΤΑΣΗ	80	56
ΧΑΝΙΑ	ΕΛΑΙΩΝΑΣ	180	77
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΧΕΡΣΑ ΠΕΤΡΩΔΗΣ ΕΚΤΑΣΗ ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΗ ΒΛΑΣΤΗΣΗ	120	88
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΧΑΜΗΛΗ ΒΛΑΣΤΗΣΗ	300	42
ΛΑΡΝΑΚΑ	ΧΕΡΣΑ ΠΕΤΡΩΔΗΣ ΕΚΤΑΣΗ	200	53
ΛΕΜΕΣΟΣ	ΧΕΡΣΑ ΠΕΤΡΩΔΗΣ ΕΚΤΑΣΗ	100	56
ΑΓΙΟΙ ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΧΕΡΣΑ ΠΕΤΡΩΔΗΣ ΕΚΤΑΣΗ	300	50



**Εικόνα 1.** Χάρτης όπου απεικονίζονται οι περιοχές δειγματοληψίας του είδους *H. aspersa* στην Ελλάδα και την Κύπρο.

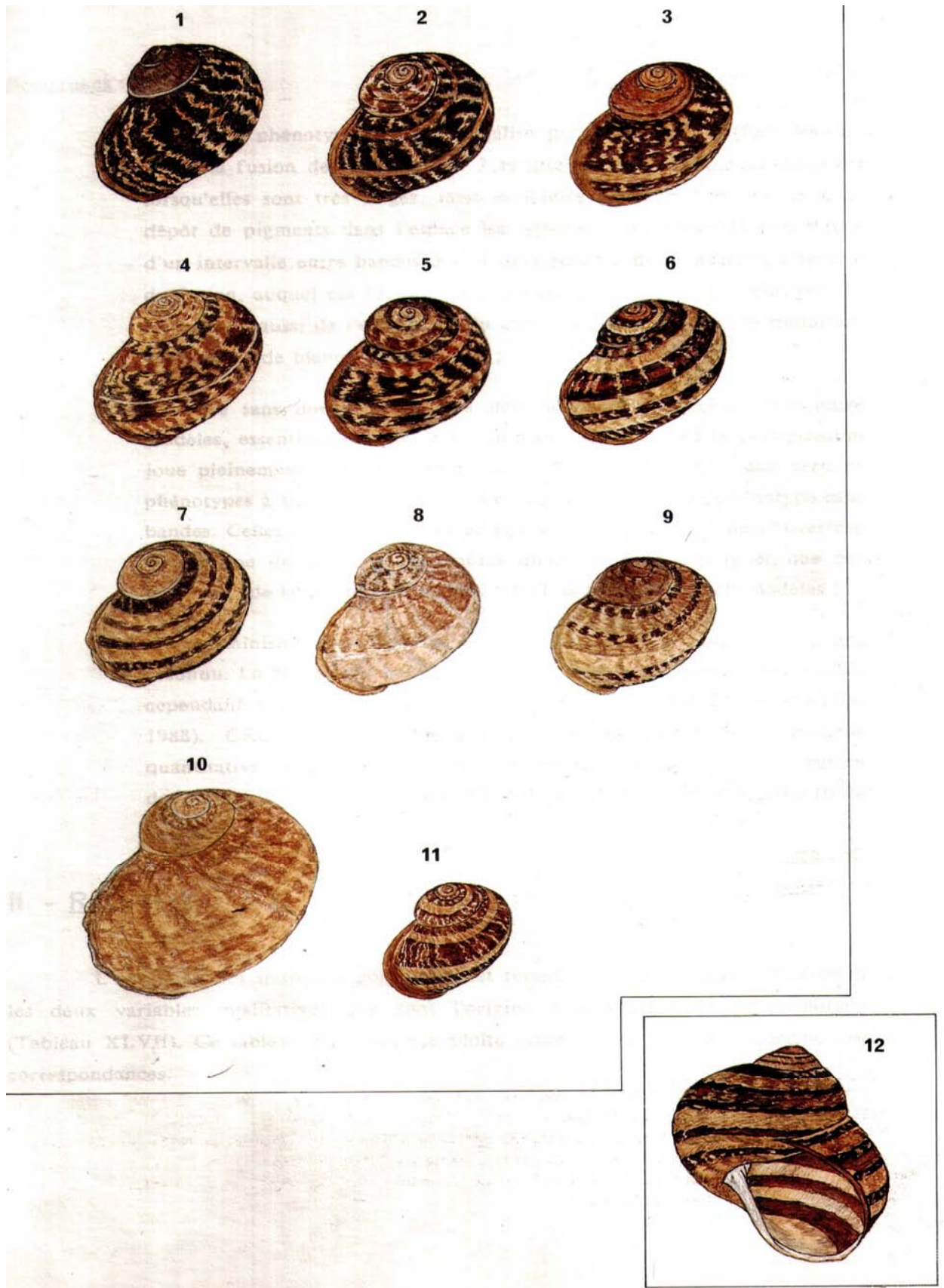
Για την καταγραφή των μορφομετρικών χαρακτηριστικών των σαλιγκαριών καταγράφηκαν τέσσερα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Εικ. 2):

- η μεγάλη διάμετρος του κελύφους (S.D),
- το ύψος του κελύφους (H.D),
- το ύψος του περιστομίου (A.H)
- η διάμετρος του περιστομίου (A.D).
- το υγρό βάρος των σαλιγκαριών (W).



**Εικόνα 2.** Απεικόνιση των τεσσάρων ποσοτικών χαρακτηριστικών του κελύφους του *H. aspersa* που καταγράφηκαν.

Για την καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κελύφων μετρήθηκαν οι ζωνώσεις που φέρουν, καθώς και το πρότυπο χρωματισμού τους (Εικ. 3). Με βάση το είδος και τον αριθμό τους δημιουργήθηκαν 15 πρότυπα κελυφών. Η κατάταξη των σαλιγκαριών έγινε με βάση τα πρότυπα που δημιουργήθηκαν από τον Madec (1989), όπως φαίνονται στην Εικόνα 3.



**Εικόνα 3.** Πρότυπα κελύφη σαλιγκαριών του *H. aspersa* με βάση την κατάταξη κατά Madec (1989)





**Εικόνα 4.** Κελύφη σαλιγκαριών του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου με διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων.

## 2.2. Απομόνωση DNA

Για την εξαγωγή του DNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο φαινόλης/χλωροφορμίου (Exadactylos, 1997). Αρχικά, αφαιρέθηκε κομμάτι ιστού (~0,01 g) από την περιοχή του ποδιού των σαλιγκαριών. Ο ιστός τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Δείγμα ιστού τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf
2. Στο Eppendorf προσθέτονταν:
  - 500μl διαλύματος TNE (10 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8)
  - 50 μl Tris-HCl, pH 8
  - 25 μl διαλύματος SDS περιεκτικότητας 25%
  - 20 μl πρωτεϊνάση K (Proteinase K) συγκέντρωσης 10 mg/l.και ανακινούνται ελαφρώς.
3. Στη συνέχεια έγινε η λιοτρίβιση του ιστού με έμβολο και ακολούθησε επώαση του σε κλίβανο (WTB Binder, Labortechnik GmbH) σε θερμοκρασία 55 °C για 2 ώρες.
4. Ύστερα από την επώαση και αφού αφέθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν 600μl φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1 (για την των νουκλεϊκών οξέων και τη δέσμευση των πρωτεϊνών).
5. Ανακινήθηκε ελαφρώς και ύστερα φυγοκεντρήθηκε (Hettich, MIKRO 12-24 UNIVERSAL) για 10 min σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4 °C για να διαχωριστούν οι 2 φάσεις .

6. Με το τέλος της φυγοκεντρήθηκε αφαιρέθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο (υδατική φάση) με πιπέτα και τοποθετήθηκε σε δεύτερο Eppendorf.
7. Στο νέο Eppendorf προστίθεται 600μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1 και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση (για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης).
8. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές.
9. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε ξανά το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε τρίτο Eppendorf στο οποίο προστέθηκε 1 ml καθαρής αιθανόλης (100%).
10. Προστέθηκαν 6 μl Sodium Acetate συγκέντρωσης 3M και το Eppendorf τοποθετήθηκε σε καταψύκτη στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 30 min (για τη δέσμευση του DNA σε στερεά μορφή).
11. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρωση για 5 min στις 13.000 στροφές.
12. Στο κάτω μέρος του Eppendorf παρατηρήθηκε ένα λευκού χρώματος ίζημα (pellet).
13. Μετά την προσεκτική αφαίρεση της αλκοόλης (προσέχοντας να μην πέσει το pellet) προστέθηκαν 200 μl κρύας αιθανόλης ( $4^{\circ}\text{C}$ ) περιεκτικότητας 70 % και φυγοκεντρήθηκε ξανά για 5 min στις 13000 στροφές.
14. Η αιθανόλη αφαιρέθηκε τελείως και το Eppendorf τοποθετήθηκε με ανοικτό το πάμα στον κλίβανο επώασης για περίπου 20 min στους  $40^{\circ}\text{C}$  για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
15. Μετά την επώαση προστέθηκαν 50 μl υπερστειρωμένο νερό (Gibco ultra-sterilized water) και τοποθετήθηκε στον καταψύκτη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , έως ότου αναλυθεί.

Όλα τα παραπάνω χημικά ήταν της εταιρείας Sarlau.

### 2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA

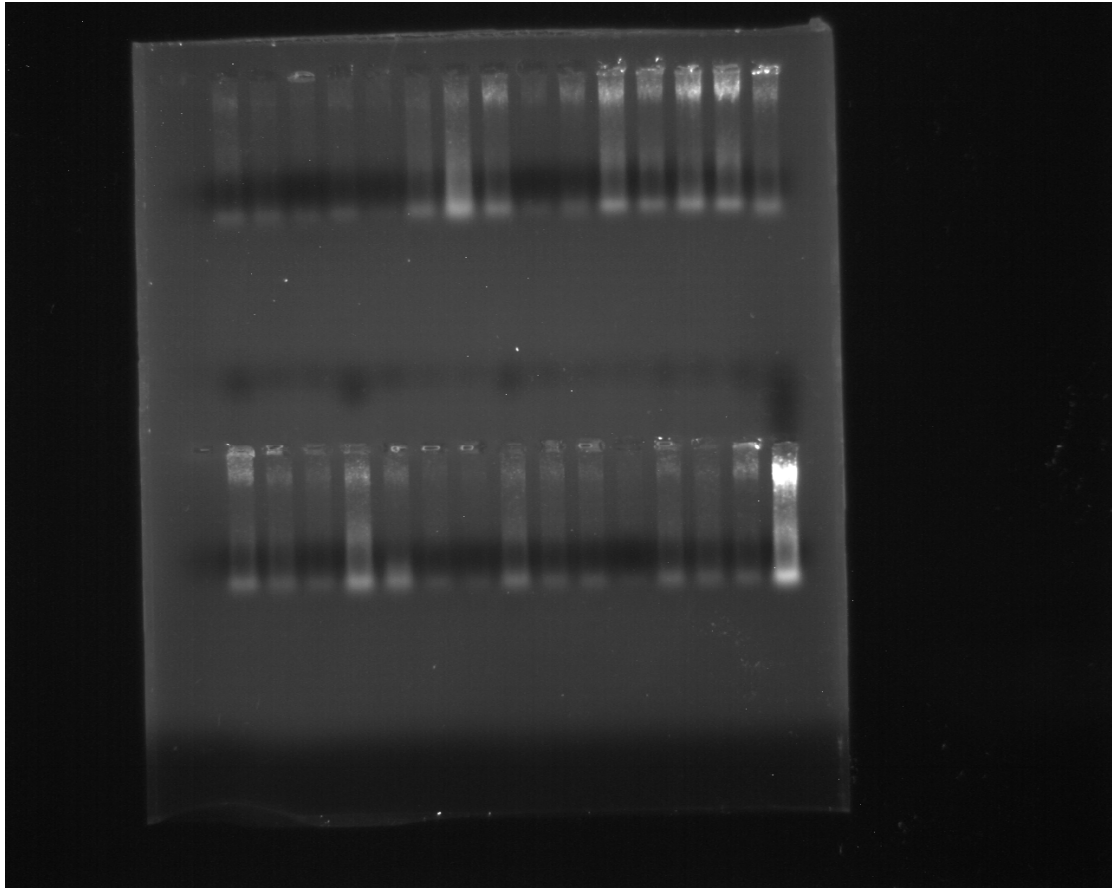
Η ανίχνευση της ποιότητας και ποσότητας του απομονωμένου DNA έγινε ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Το διάλυμα του TAE αραιωνόταν από ένα stock buffer TAE 50% (242 g Tris-HCl, 57 ml Acetic Acid, 0,05 M EDTA pH 8).

Για την πηκτή της αγαρόζης (Sambrook et al., 1986) χρησιμοποιήθηκαν 1,4 g στερεής αγαρόζης, σε 70 ml διαλύματος TAE 2% και διαλύθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (KENWOOD microwave) για 2 min, στους 90°C. Αμέσως μετά προστέθηκαν 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου 1% (Sarlau) και μετά από σύντομη ανακίνηση τοποθετήθηκε σε τετράγωνο Plexiglas, μήκους 10 cm. Το Plexiglas είχε 2 εσοχές (1 cm) εκατέρωθεν του πάνω μέρους των δύο πλευρικών τοιχωμάτων του όπου εφάρμοζαν 2 «χτενάκια» για τη δημιουργία των υποδοχών (πηγάδια). Με το κάθε χτενάκι ήταν δυνατή η δημιουργία 16 θέσεων όγκου 14 μl.

Ο συνολικός όγκος που φορτώνονταν με την "by pipetting" τεχνική στην πηκτή ήταν 12 μl: 2 μl DNA, 2 μl χρωστικής (Blue-bromophenol, Invitrogen) και 8 μl απεσταγμένου νερού. Η χρωστική είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των προϊόντων. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση ήταν TAE 1%. Η φόρτωση των δειγμάτων γινόταν μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Στη συνέχεια έγινε παροχή τάσης (60 volt) από το τροφοδοτικό (CONSORT E143) στη συσκευή (SCIE-PLAS) για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετούνταν σε φωτογραφική μηχανή (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems) υπό υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), όπως φαίνεται στην Εικ. 5.





**Εικόνα 5.** Φωτογραφική απεικόνιση ποιότητας και ποσότητας DNA σαλιγκαριού υπό υπεριώδη ακτινοβολία

#### **2.4. Επιλογή μικροδορυφορικών τύπων**

Εξετάστηκαν με επιτυχία 5 ζεύγη εκκινητών μικροδορυφορικής αλληλουχίας (microsatellite Primers) με κωδική ονομασία Ha2, Ha5, , Ha9, Ha10, και Ha12 (Guiller et al., 1996). Η αλληλουχία τους αναφέρεται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Ονομασία, αλληλουχία και επανάληψη στο κλώνο των Primer

Ονομασία Primer	Αλληλουχία	Επανάληψη στον κλώνο
Ha5	GTGTGACACACTGCCCTGGA	( TG) <sub>19</sub>
	CAATGGCAAACACTACTGAAAGCAA	
Ha6	TTATCCGCTTGATATATCCT	( GA) <sub>23</sub> ( GGA) <sub>4</sub>
	ACTCGTACATGGTTGAAAAC	
Ha8	AGTTTGCTGGTTTGTACACTCG	( CA) <sub>14</sub> CGTG( CA) <sub>3</sub> AGATG( CA) <sub>2</sub>
	CGTTTTTAGCTCTTGAATACGG	
Ha9	AGCTAACCCACACTCAGATTT	( TG) <sub>5</sub> ... ( CA) <sub>20</sub> ... ( AT) <sub>6</sub>
	AGCCAGCTAATATGTTTGGGA	
Ha10	GCGTTC AATGTAGTTTATGTGCG	( CA) <sub>6</sub> ( CGCA) <sub>3</sub> ( CA) <sub>4</sub> TACACG( CA) <sub>14</sub>
	GAGAACATGCATACAAACAACAT G	

Η εξέτασή τους έγινε στο εργαστήριο με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή PCR (MJ Research, PTC-0150). Οι συνθήκες της PCR (Exadactylos, 1997) καθορίστηκαν με πειραματικό σχεδιασμό αλλάζοντας μία κάθε φορά συνθήκη. Η θερμοκρασία επαναδιάταξης των primer (μη σημασμένοι) βασίστηκε στην μαθηματική εξίσωση:

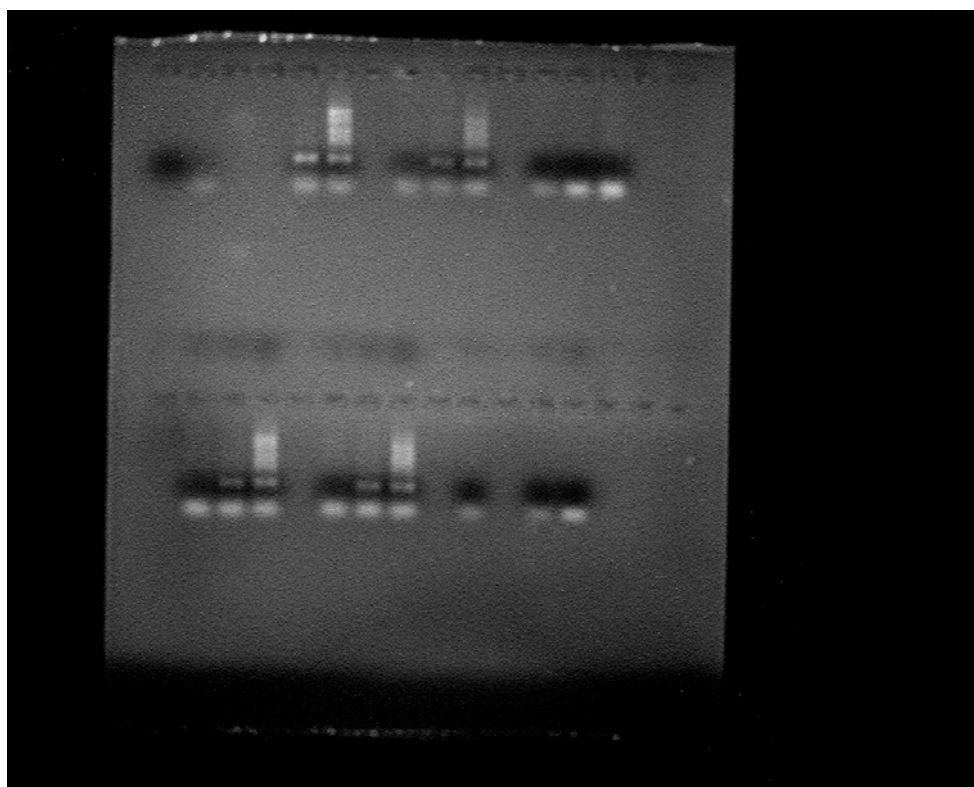
$$T_a = 4x(G+C) + 2x(A+T)$$

όπου:

- G ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Γουανίνη,
- C ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Κυτοσίνη,
- A ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Αδενίνη
- T ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Θυμίνη

Η  $T_a$  είναι μεγαλύτερη κατά 5 °C από την  $T_m$  (θερμοκρασία συγκόλλησης εκκινητή).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φαίνεται στην Εικόνα 6 όπου στην πρώτη τριάδα η κάθε στήλη έχει διαφορετική ποσότητα χλωριούχου μαγνησίου (1, 1,5, 2 μl) με 1 μl DNA ενώ στη δεύτερη οι ίδιες ποσότητες χλωριούχου μαγνησίου αντέδρασαν με 2 μl DNA. Στην τέταρτη και πέμπτη ομάδα υπάρχουν οι ανάλογες συγκεντρώσεις  $MgCl_2$  και DNA αλλά με διαφορετική συγκέντρωση Primer. Το μίγμα για την ηλεκτροφόρηση είχε όγκο 12 μl: 10 μl προϊόν PCR και 2 μl χρωστικής (Blue-bromophenol). Χρησιμοποιήθηκε και μίγμα χωρίς DNA, ομάδες τρίτη και έκτη (negative reaction) για έλεγχο επιμόλυνσης.



**Εικόνα 6.** Φωτογραφία προϊόντων PCR με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $MgCl_2$ , DNA και Primer.

Οι τελικές συνθήκες για τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων (Πίν. 3) ήταν 2 μl DNA, 2 μl Reaction Buffer 10x (Invitrogen), 1,6 μl dNTP's 10 mM (Invitrogen), 1,5

μl MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen), 1 μl από κάθε primer 15 μM (Invitrogen), 0,1 μl Taq-polymerase 0,5U/ μl (Invitrogen) και συμπλήρωση μέχρι τα 20 μl με 10,8 μl υπερστειρωμένο νερό.

**Πίνακας 3.** Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA	2 μl
Buffer	2 μl (10X)
MgCl <sub>2</sub>	1,5 μl (25 mM)
DNTP's	1,6 μl (10mM)
Primer (Re+Fw)	2 μl (1+1) (10μM)
Taq-polymerase	0,15 μl (5U/ μl)
H <sub>2</sub> O	10,8 μl

Οι συνθήκες των θερμοκρασιακών κύκλων της αρχικής αποδιάταξης (first denaturation), των τριών σταδίων αποδιάταξη (denaturation) – επαναδιάταξης (annealing) – επιμήκυνσης (extention) και της τελικής επιμήκυνσης (final extention) φαίνονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων της PCR

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	3 min	1
Αποδιάταξη	95	1 min	30
Επαναδιάταξη	T <sub>a</sub>	50 sec	

Επιμήκυνση	72	50 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10 min	1

## 2.5. Γονοτύπιση μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Η γονοτύπιση έγινε με σημασμένους primer σε αυτόματο sequencer (MJ Research, Base Station) στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης. Οι σημασμένοι Primer ήταν βαμμένοι με τρεις διαφορετικές χρωστικές έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η ταυτόχρονη γονοτύπιση τριών αλληλουχιών.

Λόγω της ευαισθησίας του sequencer οι συνθήκες της PCR διαφοροποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και της θερμοκρασίας επαναδιάταξης (annealing temperature).

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 µl με συγκεντρώσεις όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR για το sequencer.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA	1 µl (1/10 αρχικού)
Buffer	1 µl (1X)
MgCl <sub>2</sub>	0,6 µl (25 mM)
dNTP's	0,2 µl (10mM)
Primer (R+Fw)	1,2 µl (0,6+0,6) (10µM)
Taq-polymerase	0,1 µl (5U/ µl)
H <sub>2</sub> O	5,85 µl

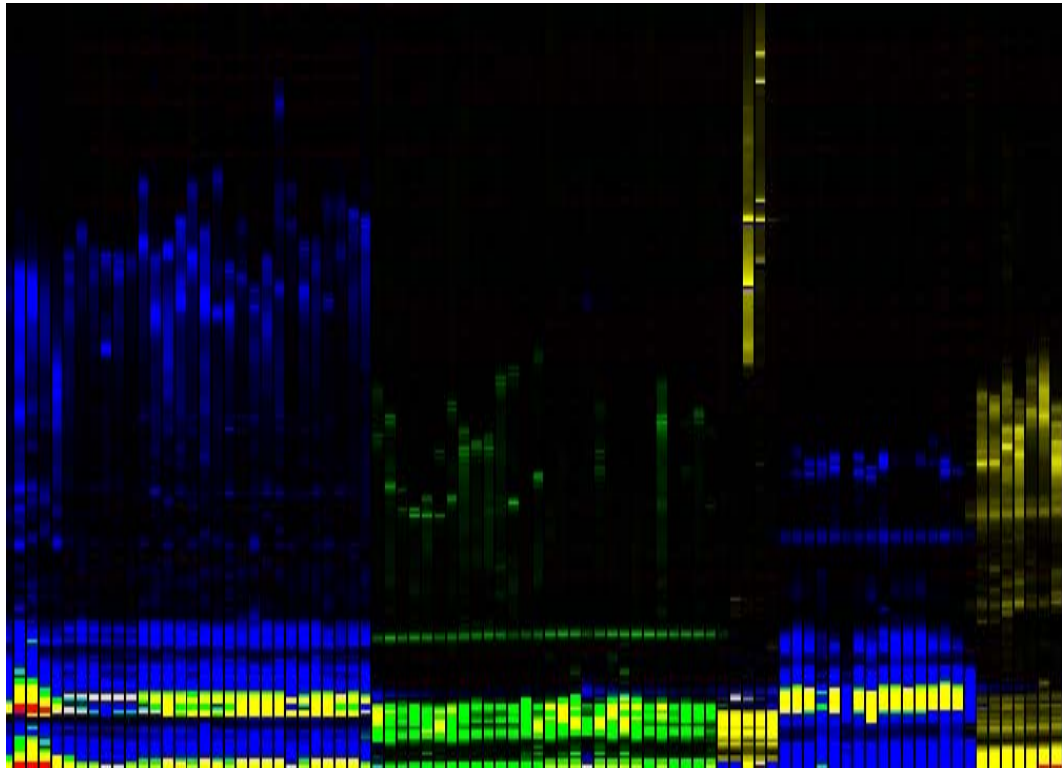
Η θερμοκρασία επαναδιάταξης καθορίστηκε με την τεχνική gradient της PCR MJ Research, PTC-200 PCR

Οι γενετικοί τόποι που έγινε η γονοτύπηση ήταν βαμμένοι με τα εξής χρώματα:

- Fw-SAI 10 FAM - μπλε χρώματος (Operon)
- Fw-SAI 12 TET - πράσινου χρώματος (Operon)
- Re-SAI 19 HEX - κίτρινου χρώματος (Operon)
- Fw-Pma1 FAM - μπλε χρώματος (Invitrogen)
- Fw-Pma2 HEX - κίτρινου χρώματος (Invitrogen)

Για το διαχωρισμό των βάσεων χρησιμοποιήθηκε πηκτική πολυακρυλαμίδης 6% (MJ Research) με οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Το μίγμα (RUN) της ηλεκτροφόρησης είχε όγκο 5 μl: 1 μl προϊόν PCR, 3,9 μl φορμαμίδιο και 0,1 μl μάρτυρα. Στη συνέχεια το μίγμα αποδιαταζόταν για 5 min στους 95 °C και φυλαζόταν σε πάγο μέχρι την αυτόματη φόρτωσή του στη πηκτική.

Με την παροχή υψηλής τάσης (4000 volts) το μίγμα (RUN) εισερχόταν στην πηκτική και με τη χρήση οπτικής ίνας laser γινόταν η αποτύπωση των βάσεων. Η εικόνα που έβγαине ως τελικό αποτέλεσμα (Εικ. 7) την επεξεργαστήκαμε με το πρόγραμμα Cartographer όπου στη συνέχεια γινόταν η μέτρηση των βάσεων των αλληλομόρφων.



**Εικόνα 7.** Χρωματική απεικόνιση των βάσεων των αλληλομόρφων.

## 2.6. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των ποιοτικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών που καταγράφηκαν χρησιμοποιήθηκε το SPSS 14.0 και έγιναν με αυτό μονοπαραγοντικές (ANOVA, Tukey tests) και πολυπαραγοντικές αναλύσεις ταξινόμησης, ομαδοποίησης και κατάταξης (Discriminant analysis, Factorial analysis, PCA, Cluster analysis). Για την ομαδοποίηση χρησιμοποιήθηκε η Average ομοιότητα (Sokal & Michener, 1958).

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων, η αναμενόμενη και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία σύμφωνα με το νόμο Hardy-Weinberg, ο δείκτης γονιδιακής ροής  $N_m$ , το κριτήριο  $\chi^2$  και οι πιθανότητες  $P$  υπολογίστηκαν με το λογισμικό πακέτο GenePop 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). Οι αποκλίσεις από τον νόμο του Hardy-Weinberg

( $P_{0,99}$ ) εξετάστηκε σύμφωνα με τους Guo & Thompson (1992). Ο δείκτης  $N_m$  υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Slatkin (1993). Τέλος, για την εκτίμηση των πιθανοτήτων  $P$  χρησιμοποιήθηκε η Markov-chain μέθοδος, ενώ για το κριτήριο  $\chi^2$  η μέθοδος Fichier.

Ο δείκτης ενδοπληθυσμιακής παραλλακτικότητας ( $F_{ST}$ ), ο δείκτης ενδογαμίας ( $F_{IS}$ ), ο δείκτης ολικής παραλλακτικότητας ( $F_{IT}$ ) κατά Jackknifing, υπολογίστηκαν σύμφωνα με τους Weir & Cockerham (1984) με το λογισμικό πακέτο FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995).

Οι γενετικές αποστάσεις (standard genetic distance)  $D_s$  (Nei, 1972), οι 2x2 πίνακες γενετικής απόστασης (distance matrices) υπολογίστηκαν με το λογισμικό πακέτο POPULATION 1.2.28.

Για την απεικόνιση των δενδρογραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, η Neighbor-Joining και η UPGMA με τα λογισμικά πακέτα Phylip 3.62 και TreeView 1.6.6 (Felsenstein, 1989).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Μορφομετρικά χαρακτηριστικά

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των ποσοτικών χαρακτηριστικών του κελύφους SH, SD, AH, AD, WW, κατέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών (Πίν. 6). Οι πληθυσμοί που διαφοροποιούνται είναι της Μεγαλόπολης και της Ζαχάρως. Οι μέσες τιμές της μεγάλης διαμέτρου του κελύφους (SD) κυμάνθηκαν από 30.82 mm (πληθυσμός της Λεμεσού) έως 39.61 mm (πληθυσμός της Μεγαλόπολης), μια διαφορά μεγέθους της τάξης του 23%. Οι μέσες τιμές του ύψους του κελύφους (SH) κυμάνθηκαν από 28,75 mm (πληθυσμός της Λεμεσού) έως 38,18 mm (πληθυσμός Μεγαλόπολης). Η μικρότερη τιμή του ύψους του περιστομίου (AH) 21,28 mm παρατηρήθηκε στον πληθυσμό των Αγ. Θεοδώρων ενώ η μεγαλύτερη τιμή 27,55 mm παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της Μεγαλόπολης. Η διάμετρος του περιστομίου (AD) κυμάνθηκε από 19,85 mm (πληθυσμός Αγ. Θεοδώρων) έως 24,18 mm (πληθυσμός της Μεγαλόπολης). Τα σαλιγκάρια με το μεγαλύτερο βάρος (13,68 g) ήταν αυτά της Μεγαλόπολης ενώ με το μικρότερο ήταν αυτά της Σύρου (6,7 g). Ο δείκτης παραλλακτικότητας (CV) των τιμών SH, SD, AH, AD, ανάμεσα στους πληθυσμούς κυμάνθηκε από 5.3 έως 10.2%, ενώ για το βάρος κυμάνθηκε από 15.3 έως 21.8%.

**Πίνακας 6.** Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της μεγάλης διαμέτρου (SD) και του ύψους (SH) του κελύφους, της διαμέτρου (AD) και του ύψους (AH) του περιστομίου και του υγρού βάρους (W) του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου όπως και το τυπικό σφάλμα (SE). Στην παρένθεση φαίνεται ο συντελεστής ποικιλότητας (CV). Οι μέσοι όροι ανά στήλη με ίδιο δείκτη δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $P<0.05$ ).

ΠΑΡΕΝΘΕΣΕΙΣ		SH	SD	AH	AD	WW	
ΕΛΛΑΔΑ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΡΓΟΛΙΔΑ	33.63±0.19c (5.7)	36.31±0.22b,c (6.1)	24.19±0.15c (6.3)	23.2±0.18b,c (8.7)	9.92±0.16b,c (16.1)
		ΚΟΡΙΝΘΟΣ	31.09±0.24e (7.6)	32.73±0.27g (8.3)	22.27±0.15d (6.5)	21.25±0.18e,f (8.3)	8.58±0.18d,e,f (20.1)
		ΜΕΓΑΛΟΠΟΛΗ	38.18±0.26a (6.8)	39.61±0.25a (6.3)	27.55±0.18a (6.6)	24.18±0.19a (8.0)	13.8±0.27a (19.6)
		ΖΑΧΑΡΩ	35.15±0.35b (7.9)	37.04±0.38b (8.1)	25.13±0.23b (7.3)	23.48±0.23a,b (7.7)	10.8±0.28b (21.0)
	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ	32.89±0.26c,d (6.8)	35.51±0.30c,d (7.2)	23.71±0.22c (7.9)	22.4±0.22c,d (8.5)	9.43±0.21c,d (19.5)
		ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	33.34±0.21c (5.5)	34.49±0.21d,e,f (5.3)	23.44±0.15c (5.7)	22.01±0.19d,e (7.7)	9.77±0.17c (15.3)
	ΑΙΓΑΙΟ	ΣΥΡΟΣ	29.62±0.28f,g (7.6)	30.99±0.28h (7.2)	21.61±0.17d,e (6.2)	19.74±0.21g (8.5)	6.7±0.18g (21.8)
	ΚΥΠΡΟΣ	ΛΑΡΝΑΚΑ	32,01±0.35d,e (8,2)	35.08±0.29c,d,e (6.1)	23.63±0.22c (6.8)	21.4±0.22d,e,f (7.6)	10.04±0.25b,c (18.5)
		ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	30,64±0.27e,f (6,2)	33.18±0.31f,g (6.5)	21.28±0.25e (8.4)	19.85±.23" (8*4)	8.11±0.22e,f (19.3)
		ΛΕΥΚΩΣΙΑ	31,74±0.39d,e (8,4)	33.93±0.32e,f,g (6.6)	22.31±0.24d,e (7.2)	20.5±0.28f,g (9.2)	8.92±0.28c,d,e (21.4)
ΛΕΜΕΣΟΣ		28,75±0.27g (6,9)	30.82±0.30h (7.3)	21.29±0.29e (10.2)	19.96±0.25g (9.6)	7.57±0.17f,g (16.7)	

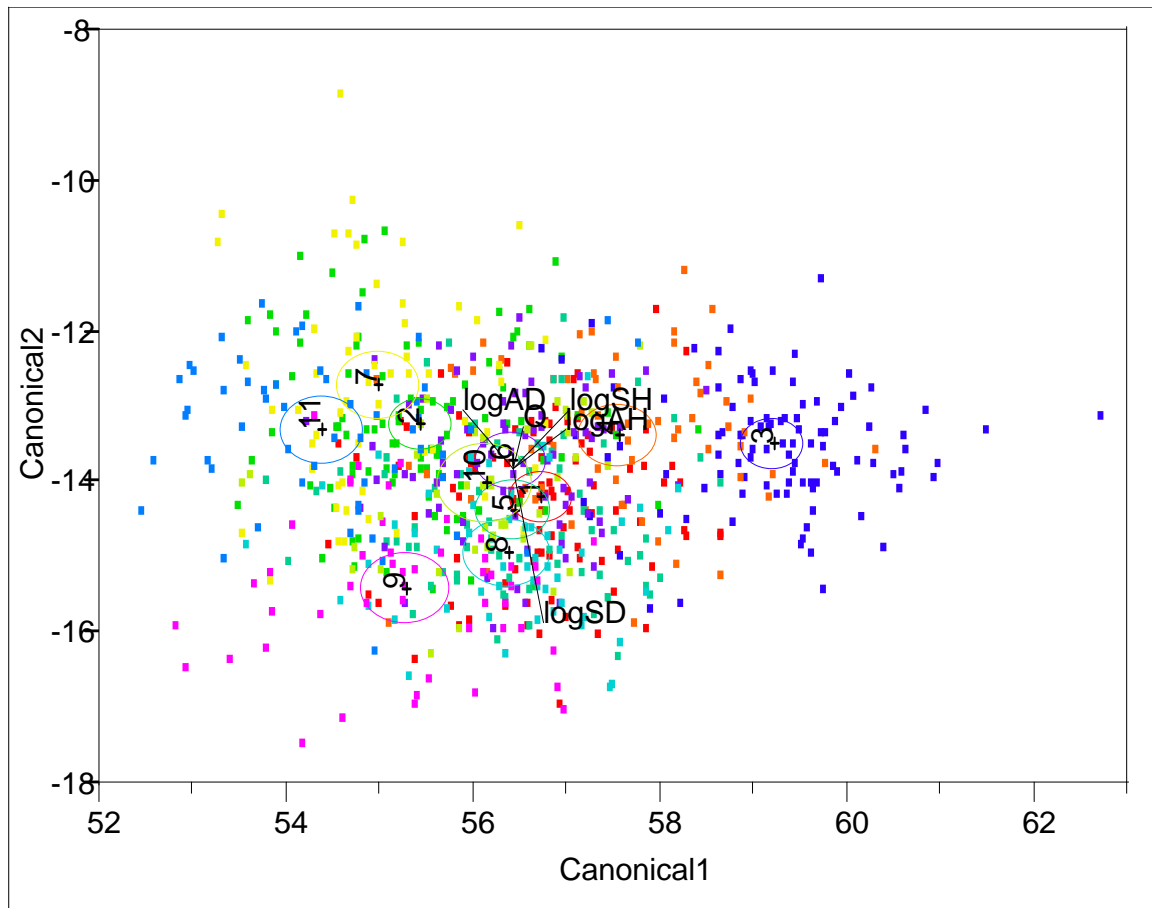
Η PCA ανάλυση έδειξε πώς το Eigenvalue του συντελεστή 1 ισούται με 1.95 και συσχετίζεται με το μορφολογικά του περιστομίου (AH, AD), ενώ ο συντελεστή 2 (με τιμή Eigenvalue 0,48) με τη διάμετρο του περιστομίου. Τα αποτελέσματα της PCA ανάλυσης εξηγούν περίπου το 90 % της παραλλακτικότητας (Πίν. 7).

**Πίνακας 7.** Αποτελέσματα της PCA ανάλυσης για τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του κελύφους των σαλιγκαριών του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

Factor	Eigenvalue	Percent	Cum Percent
1	1.9493	62.667	62.667
2	0.4778	15.363	78.029
3	0.3596	11.563	89.593

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	Συντελεστής 1	Συντελεστής 2	Συντελεστής 3
ΥΨΟΣ ΚΕΛΥΦΟΥΣ	0.278189	0.31644	0.274513
ΔΙΑΜ/ΡΟΣ ΚΕΛΥΦΟΥΣ	0.092192	-0.96712	-0.11998
ΥΨΟΣ ΠΕΡΙΣΤΟΜΙΟΥ	0.393463	0.344879	-0.17961
ΔΙΑΜ. ΠΕΡΙΣΤΟΜΙΟΥ	-0.35913	0.233716	0.853409
ΜΟΤΙΒΟ ΚΕΛΥΦΟΥΣ	0.037716	0.191702	0.031777

Η διαφοροποιούσα ανάλυση (Discriminant analysis) έδειξε ότι ο καλύτερα διαφοροποιημένος πληθυσμός (86%) ως προς τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του κελύφους είναι αυτός της Μεγαλόπολης (Εικ. 8). Οι υπόλοιποι πληθυσμοί ταξινομούνται σωστά σε ποσοστό 45%.



Number Misclassified	419
Percent Misclassified	55,06
-2LogLikelihood	1167

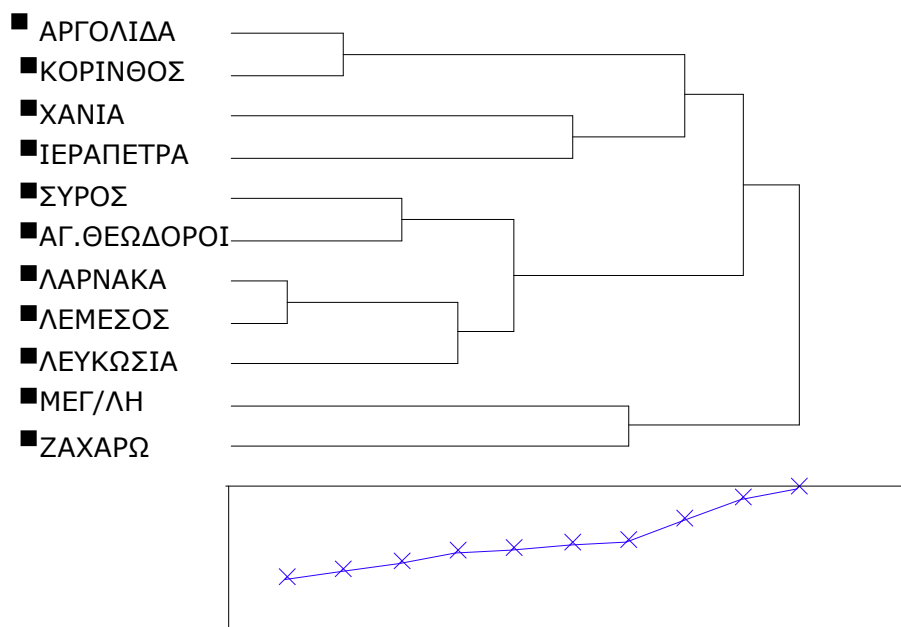
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ΑΡΓΟΛΙΑΑ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΜΕΓΑΛΑ	ΖΑΧΑΡΩ	ΧΑΝΙΑ	ΙΕΡΑΠ	ΣΥΡΟΣ	ΛΑΡΝ	ΑΓ.ΘΕΩΔ.	ΛΕΥΚΩΣ	ΛΕΜΕΣ

**Εικόνα 8.** Stepwise Discriminant analysis για τις ποσοτικές και ποιοτικές μεταβλητές του κελύφους του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

Το δενδρόγραμμα των ποιοτικών χαρακτηριστικών του κελύφους του *H. Aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου (Εικ. 9) ομαδοποιεί τους πληθυσμούς σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες:

1. Α. Πελοπόννησος (Αργολίδα – Κόρινθος)

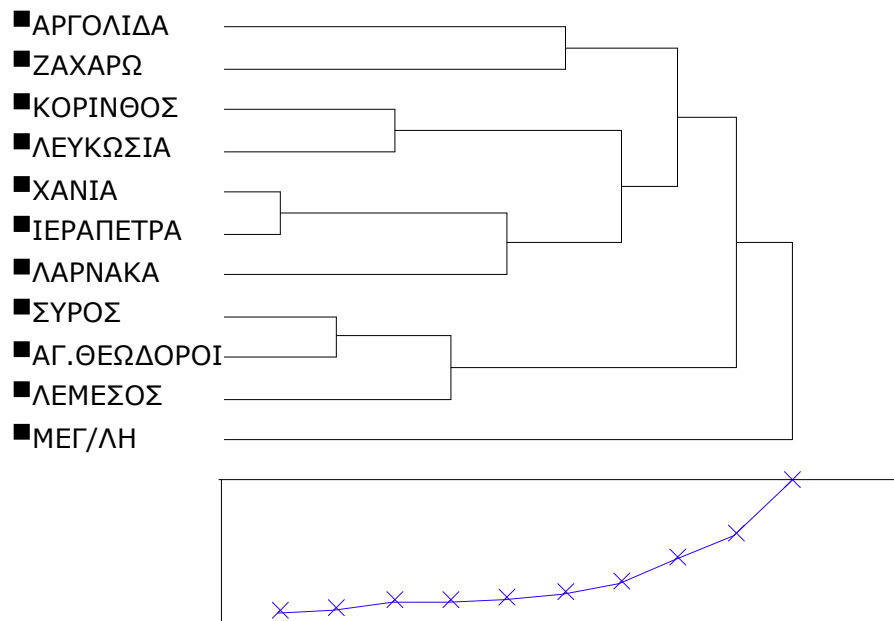
2. Δ. Πελοπόννησος (Μεγαλόπολη – Ζαχάρω)
3. Κρήτη (Χανιά – Ιεράπετρα)
4. Σύρος – Κύπρος (Λάρνακα – Λευκωσία – Αγ. Θεόδωροι – Λεμεσός)



**Εικόνα 9.** Δενδρόγραμμα με τη μέθοδο Average των ποιοτικών χαρακτηριστικών του κελύφους του *H. aspersa* από έντεκα διαφορετικούς πληθυσμούς της Ελλάδας και της Κύπρου.

Το δενδρόγραμμα των ποσοτικών χαρακτηριστικών του κελύφους (Εικ. 10) ομαδοποιεί τους πληθυσμούς του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου. σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες:

1. Αργολίδα – Ζαχάρω
2. Κόρινθος – Λευκωσία – Χανιά – Ιεράπετρα – Λάρνακα
3. Σύρος – Αγ. Θεόδωροι – Λεμεσός
4. Μεγαλόπολη



**Εικόνα 10.** Δενδρόγραμμα με τη μέθοδο Average των ποσοτικών χαρακτηριστικών του κελύφους έντεκα διαφορετικών πληθυσμών του *H. aspersa* από την Ελλάδα και την Κύπρο.

### 3.2. Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης

Οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg εξετάστηκαν για όλα τα ζεύγη των γενετικών τόπων και στους 11 πληθυσμούς, καθώς και οι αναμενόμενες και παρατηρούμενες ετεροζυγωτίες. Οι τιμές που προέκυψαν έδειξαν στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις από την ισορροπία αυτή (Πίν.8 και 9). Ο S5 τόπος για τους πληθυσμούς της Αργολίδας, της Μεγαλόπολης και της Κορίνθου βρέθηκε μονομορφικός.

**Πίνακας 8.** Αναμενόμενη και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία κατά Hardy-Weinberg του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

<b>Πληθυσμός</b>	<b><i>N</i></b>	<b><i>He</i></b>	<b><i>Ho</i></b>
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	22	0,551 ± 0,105	0,520 ± 0,070
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	29	0,551 ± 0,105	0,221 ± 0,070
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	25	0,498 ± 0,094	0,160 ± 0,860
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	24	0,625 ± 0,047	0,300 ± 0,170
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	16	0,547 ± 0,064	0,088 ± 0,089
ΛΑΡΝΑΚΑ	19	0,491 ± 0,104	0,116 ± 0,058
ΛΕΜΕΣΟΣ	28	0,510 ± 0,135	0,286 ± 0,115
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	11	0,428 ± 0,156	0,164 ± 0,212
ΣΥΡΟΣ	36	0,645 ± 0,112	0,278 ± 0,211
ΧΑΝΙΑ	21	0,496 ± 0,127	0,200 ± 0,157
ΖΑΧΑΡΩ	23	0,686 ± 0,092	0,235 ± 0,094

**Πίνακας 9.** Τιμές  $\chi^2$  αλληλομορφικών συχνοτήτων για την επαλήθευση γενετικής ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg ανά γενετικό τόπο σε κάθε πληθυσμό του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

Περιοχή	Locus	DF	$\chi^2$	P
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S2	15	110,000	0,0001
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S5	Monomorphic		
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S3	36	142,573	0,0001
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S6	28	154,000	0,0001
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S10	10	88,000	0,0001
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S2	6	47,866	0,0001
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S5	15	117,160	0,0001
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S3	21	119,279	0,0001
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S6	15	126,352	0,0001
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S10	15	116,010	0,0001
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S2	15	76,212	0,0001
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S5	10	28,472	0,002
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S3	21	125,510	0,0001
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S6	3	50,000	0,0001
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S10	1	0,907	0,341
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S2	6	32,876	0,0001
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S5	21	89,137	0,0001
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S3	10	64,960	0,0001
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S6	21	144,000	0,0001
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S10	21	77,204	0,0001
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S2	6	48,000	0,0001
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S5	Monomorphic		
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S3	15	80,000	0,0001
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S6	21	84,938	0,0001
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S10	28	53,378	0,003
ΛΑΡΝΑΚΑ	S2	10	76,000	0,0001

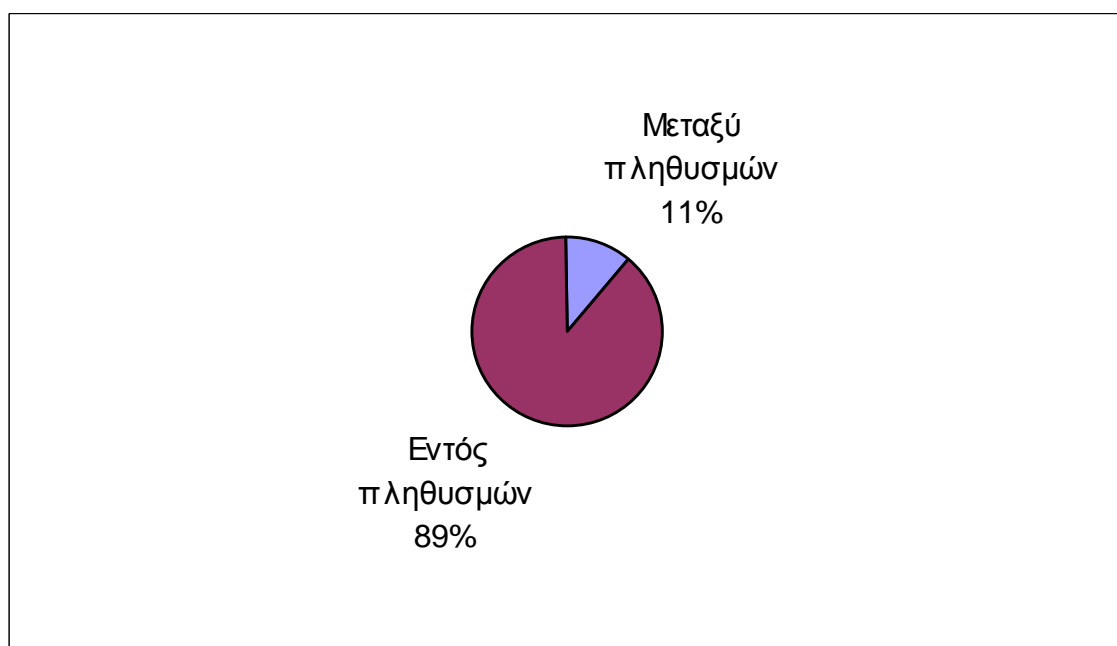


ΛΑΡΝΑΚΑ	S5	6	38,178	0,0001
ΛΑΡΝΑΚΑ	S3	15	95,000	0,0001
ΛΑΡΝΑΚΑ	S6	28	89,273	0,0001
ΛΑΡΝΑΚΑ	S10	6	38,000	0,0001
ΛΕΜΕΣΟΣ	S2	10	112,000	0,0001
ΛΕΜΕΣΟΣ	S5	6	63,000	0,0001
ΛΕΜΕΣΟΣ	S3	21	154,079	0,0001
ΛΕΜΕΣΟΣ	S6	28	137,705	0,0001
ΛΕΜΕΣΟΣ	S10	55	280,000	0,0001
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	S2	6	33,000	0,0001
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	S5	Monomorphic		
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	S3	1	11,000	0,001
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	S6	6	33,000	0,0001
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	S10	55	78,222	0,021
ΣΥΡΟΣ	S2	21	184,000	0,0001
ΣΥΡΟΣ	S5	6	72,640	0,0001
ΣΥΡΟΣ	S3	28	216,024	0,0001
ΣΥΡΟΣ	S6	36	252,029	0,0001
ΣΥΡΟΣ	S10	66	248,533	0,0001
ΧΑΝΙΑ	S2	6	36,919	0,0001
ΧΑΝΙΑ	S5	15	60,335	0,0001
ΧΑΝΙΑ	S3	1	21,000	0,0001
ΧΑΝΙΑ	S6	15	105,000	0,0001
ΧΑΝΙΑ	S10	15	84,017	0,0001
ΖΑΧΑΡΩ	S2	15	115,000	0,0001
ΖΑΧΑΡΩ	S5	15	92,017	0,0001
ΖΑΧΑΡΩ	S3	28	138,019	0,0001
ΖΑΧΑΡΩ	S6	55	148,745	0,0001

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) έδειξαν ότι οι πληθυσμοί διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σε ποσοστό 11% ενώ η παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών κυμάνθηκε σε ποσοστό 89% (Πίν. 10, Εικ. 11). Η συνολική παραλλακτικότητα βρέθηκε στο όριο σημαντικότητας.

**Πίνακας 10.** Ανάλυση μοριακής παραλλακτικότητας μεταξύ των 11 φυσικών πληθυσμών του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	Stat	Value	Prob
Among Pops	10	19464,016	1946,402	36,338	11%			
Within Pops	497	139707,236	281,101	281,101	89%			
Total	507	159171,252	2227,503	317,439		$R_{ST}$	0,114	0,010



**Εικόνα 11.** Ποσοστά μοριακής παραλλακτικότητας μεταξύ και εντός των 11 φυσικών πληθυσμών του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

Ο συντελεστής ενδοπληθυσμιακής παραλλακτικότητας ( $F_{ST}$ ) (Theta), ο δείκτης ενδογαμίας ( $F_{IS}$ ) (smallF) και ο δείκτης ολικής παραλλακτικότητας ( $F_{IT}$ ) (Capf) κατά

Weir & Cockerham (1984) παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Ο δείκτης  $F_{ST}$  (0,141 μέση τιμή). Ο δείκτης  $F_{IS}$  έχει εύρος τιμών 0,164–0,907 με την μικρότερη να παρατηρείται στο τόπο S5 ενώ η μεγαλύτερη στο τόπο S2 που είναι και ο περισσότερο πολυμορφικός. Σύμφωνα με το λογισμικό FSTAT για  $F_{IS}$  μεγαλύτερο του αναμενόμενου παρατηρείται μη στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P_{0,99}$ ) Τέλος, ο δείκτης  $F_{IT}$  έχει εύρος 0,302–0,915 και εμφανίζει παραδόξως ομοίως με τον δείκτη  $F_{IS}$  την μεγαλύτερη τιμή στο S2. Ο δείκτης γονιδιακής ροής  $N_m$  έχει μέση τιμή 1,525, τιμή ιδιαίτερα χαμηλή που υποδηλώνει τη γενετική απομόνωση των πληθυσμών που μελετήθηκαν.

**Πίνακας 11.** Δείκτες  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ , κατά Weir & Cockerham (1984) και  $N_m$  (γονιδιακή ροή) κατά γενετικό τόπο σε όλους τους υπό εξέταση πληθυσμούς του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

Όνομασία Primer	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$N_m$
<b>S2</b>	0,907	0,915	0,086	2,652
<b>S5</b>	0,072	0,195	0,132	1,640
<b>S3</b>	0,893	0,913	0,184	1,107
<b>S6</b>	0,838	0,860	0,137	1,578
<b>S10</b>	0,164	0,302	0,165	1,265
<b>Mean</b>	0,575	0,637	0,141	1,525

Τα αποτελέσματα της PCA ανάλυσης των γενετικών αποστάσεων των έντεκα διαφορετικών πληθυσμών σαλιγκαριών έδειξαν πως εξηγείται συνολικά το 67,25% της διακύμανσης από τους δύο πρώτους παράγοντες (EigenValue), όπως φαίνεται στον Πίνακα 12.

**Πίνακας 12.** PCA ανάλυση των γενετικών αποστάσεων των έντεκα διαφορετικών πληθυσμών του *H. aspersa* από την Ελλάδα και την Κύπρο.

Axis	EigenValue	%	Cum %
1	0,178	48,41	48,41
2	0,069	18,84	67,25
3	0,040	10,79	78,04

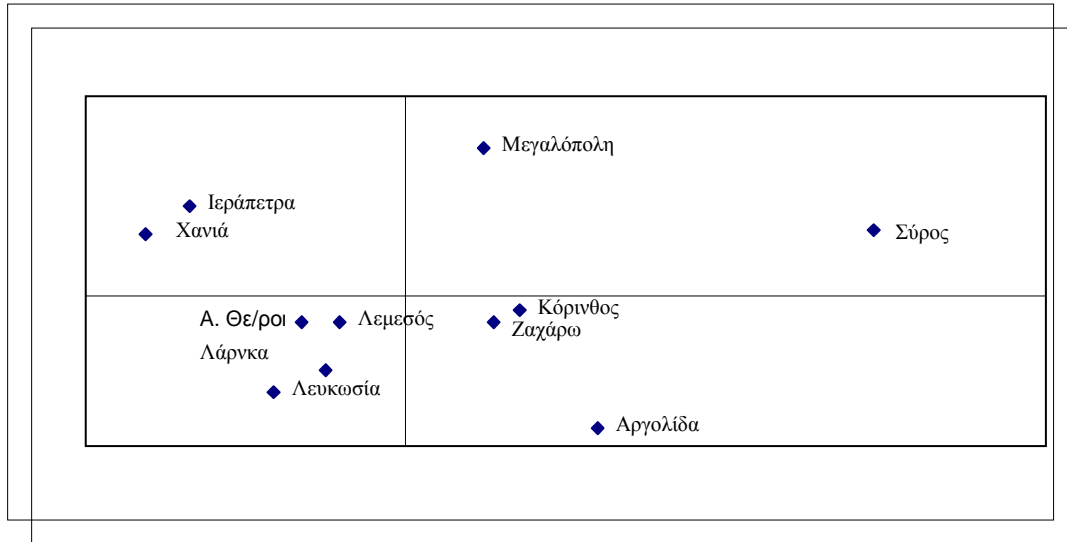
ΠΕΡΙΟΧΗ	1	2	3
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	0,120	-0,131	0,057
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	-0,083	-0,097	-0,066
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	-0,104	-0,026	-0,020
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	-0,135	0,091	-0,079
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	0,072	-0,014	0,087
ΛΑΡΝΑΚΑ	-0,063	-0,040	0,045
ΛΕΜΕΣΟΣ	-0,041	-0,027	-0,042
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,049	0,148	0,061
ΣΥΡΟΣ	0,292	0,067	-0,070
ΧΑΝΙΑ	-0,163	0,063	0,064
ΖΑΧΑΡΩ	0,056	-0,033	-0,038

Οι πληθυσμοί της Μεγαλόπολης και της Σύρου διαφέρουν από τους υπόλοιπους πληθυσμούς σαλιγκαριών. Οι υπόλοιποι πληθυσμοί ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες (Εικ. 12):

-Χανιά – Ιεράπετρα

-Λευκωσία – Άγιοι Θεόδωροι – Λευκωσία – Λεμεσός

-Αργολίδα – Ζαχάρω – Μεγαλόπολη



**Εικόνα 12.** Απεικόνιση των γενετικών αποστάσεων των πληθυσμών του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου με την PCA ανάλυση.

Στον Πίνακα 13 καταγράφονται οι τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας ( $R_{ST}$ ) και οι τιμές των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών κατά Nei (1972). Η μεγαλύτερη τιμή  $R_{ST}$  (0,266) καταγράφεται μεταξύ των πληθυσμών της Ιεράπετρας και της Μεγαλόπολης

Στον Πίνακα 14 καταγράφονται οι τιμές των γενετικών αποστάσεων  $D_s$  άνω της διαγωνίου με την μεγαλύτερη τιμή (0,729) να εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών της Σύρου και των Χανίων και τη μικρότερη τιμή (0,066) μεταξύ των πληθυσμών της Λευκωσίας και των Αγίων Θεοδώρων. Για τις τιμές παραλλακτικότητας  $F_{ST}$  (κάτω της διαγωνίου) η μεγαλύτερη τιμή (0,142) εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών Αργολίδας και Χανίων και η μικρότερη τιμή (0,028) μεταξύ των πληθυσμών της Λευκωσίας και των Αγίων Θεοδώρων.

**Πίνακας 13.** Πίνακας με τις τιμές  $P$ -value (άνω της διαγωνίου) και τιμών  $R_{ST}$  (κάτω της διαγωνίου) του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΛΑΡΝΑΚΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΜΕΓ/ΠΟΛΗ	ΣΥΡΟΣ	ΧΑΝΙΑ	ΖΑΧΑΡΩ	
	0,050	0,090	0,010	0,010	<b>0,420</b>	0,010	0,010	0,010	0,020	0,020	ΑΡΓΟΛΙΔΑ
0,048		0,350	0,290	0,010	0,110	0,040	0,010	0,010	0,030	0,010	ΛΕΥΚΩΣΙΑ
0,030	0,000		0,400	0,010	0,050	0,020	0,010	0,010	0,030	0,010	ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ
0,052	0,004	0,000		0,010	0,030	0,010	0,010	0,010	0,050	0,010	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ
0,108	0,127	0,113	0,138		0,020	0,010	0,010	0,010	0,110	0,010	ΚΟΡΙΝΘΟΣ
0,000	0,040	0,033	0,065	0,096		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	ΛΑΡΝΑΚΑ
0,119	0,041	0,074	0,089	0,231	0,111		0,010	0,010	0,010	0,090	ΛΕΜΕΣΟΣ
0,154	0,205	0,232	0,266	0,198	0,120	0,184		0,330	0,010	0,030	ΜΕΓ/ΠΟΛΗ
0,133	0,192	0,205	0,219	0,155	0,097	0,205	0,000		0,010	0,010	ΣΥΡΟΣ
0,099	0,039	0,045	0,051	0,022	0,086	0,120	0,170	0,171		0,010	ΧΑΝΙΑ
0,076	0,062	0,090	0,106	0,166	0,069	0,019	0,070	0,110	0,101		ΖΑΧΑΡΩ

**Πίνακας 14.** Πίνακας γενετικής απόστασης  $D_s$  (άνω της διαγωνίου) και τιμών  $F_{ST}$  (κάτω της διαγωνίου) του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΛΑΡΝΑΚΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΜΕΓΑ/ΠΟΛΗ	ΣΥΡΟΣ	ΧΑΝΙΑ	ΖΑΧΑΡΩ	
	0,250	0,306	0,430	0,105	0,215	0,248	0,327	0,321	0,406	0,164	ΑΡΓΟΛΙΔΑ
0,085		0,066	0,197	0,200	0,087	0,130	0,318	0,558	0,209	0,181	ΛΕΥΚΩΣΙΑ
0,105	0,028		0,168	0,194	0,070	0,153	0,223	0,581	0,147	0,188	ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ
0,119	0,062	0,061		0,298	0,199	0,206	0,264	0,636	0,106	0,247	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ
0,041	0,079	0,082	0,096		0,106	0,171	0,137	0,277	0,221	0,119	ΚΟΡΙΝΘΟΣ
0,079	0,031	0,033	0,068	0,051		0,128	0,207	0,496	0,116	0,167	ΛΑΡΝΑΚΑ
0,090	0,043	0,056	0,062	0,076	0,049		0,255	0,453	0,172	0,199	ΛΕΜΕΣΟΣ
0,132	0,125	0,101	0,103	0,067	0,090	0,113		0,323	0,246	0,209	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ
0,083	0,115	0,129	0,119	0,080	0,117	0,099	0,113		0,729	0,329	ΣΥΡΟΣ
0,142	0,077	0,066	0,047	0,097	0,052	0,068	0,105	0,170		0,307	ΧΑΝΙΑ
0,053	0,053	0,061	0,056	0,046	0,056	0,057	0,082	0,059	0,095		ΖΑΧΑΡΩ

Στον Πίνακα 16 καταγράφονται τα αποτελέσματα του Wilcoxon κριτηρίου για κάθε πληθυσμό όπως προέκυψαν από το στατιστικό πακέτο Bottleneck. Διαφαίνεται ότι δεν ακολουθείται το step stone Mutation Model για κανένα γενετικό τόπο ή πληθυσμό ( $P > 0,01$ ) ενώ ακολουθείται το IAM (Infinity Allele Model). Αυτό που επιπλέον ελέγχθηκε είναι η ενδιάμεση κατάσταση (TMP) που ταιριάζει σε μικροδορυφορικά δεδομένα και που τελικά επαληθεύει τη μηδενική υπόθεση ότι οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν περνούν από γενετική στενωπό.

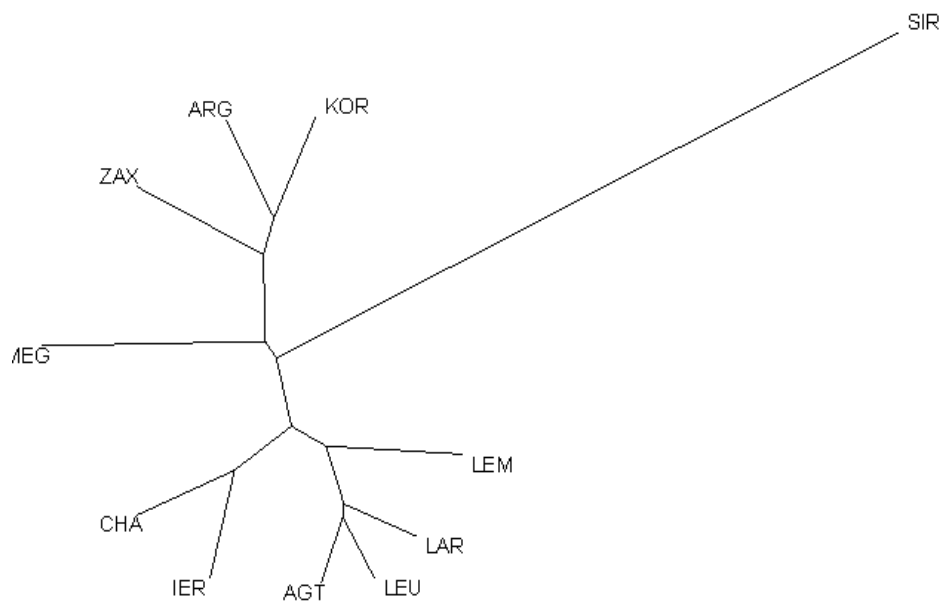
**Πίνακας 16.** Αποτελέσματα του Wilcoxon τεστ για κάθε πληθυσμό του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	<i>P</i>
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	0.12500
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	0.62500
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	0.21875
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	0.62500
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	0.18750
ΛΑΡΝΑΚΑ	0.98438
ΛΕΜΕΣΟΣ	0.09375
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0.31250
ΣΥΡΟΣ	0.62500
ΧΑΝΙΑ	1.00000
ΖΑΧΑΡΩ	0.62500

Τα δενδρογράμματα (Εικ. 13 και 14) με τις μεθόδους Neighbor-Joining και UPGMA απέδωσαν τις γενετικές αποστάσεις ( $D_s$ ) μεταξύ πληθυσμών. Εκείνο που παρατηρήθηκε στα δενδρογράμματα είναι ότι σχηματίζονται τέσσερις διαφορετικές ομάδες:

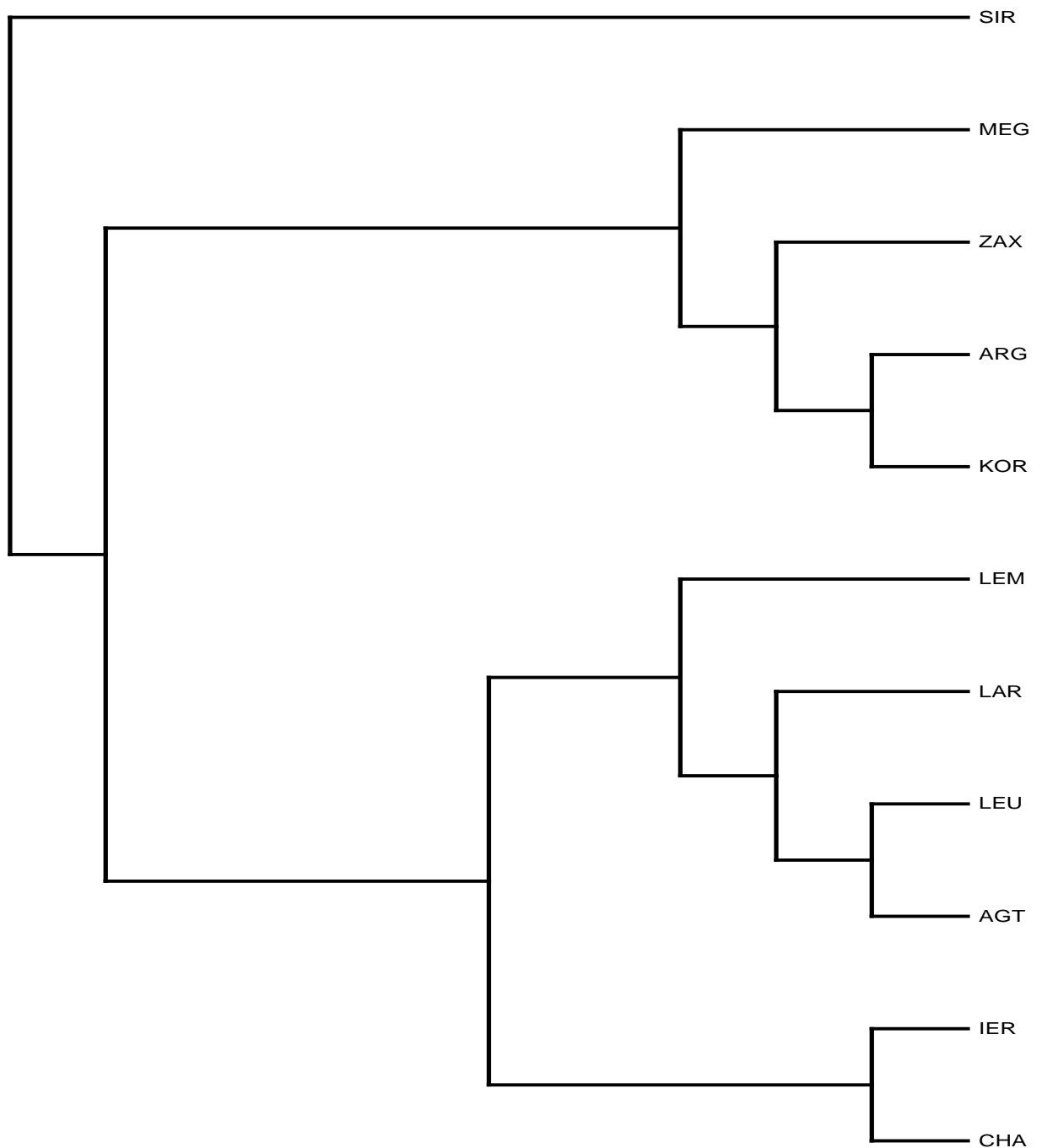


- Κύπρος (Λευκωσία – Λάρνακά – Λεμεσός – Αγ. Θεόδωροι)
- Κρήτη (Χανιά – Ιεράπετρα)
- Σύρος
- Πελοπόννησος (Αργολίδα – Κόρινθος – Ζαχάρω – Μεγαλόπολη)



0.1

**Εικόνα 13.** Δενδρόγραμμα κατά Nei (1972) με τη μέθοδο Neighbor-Joining του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.



**Εικόνα 14.** Δενδρόγραμμα κατά Nei (1972) με τη UPGMA ανάλυση του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των μορφομετρικών χαρακτηριστικών του κελύφους, κατέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Οι πληθυσμοί που διαφοροποιούνται είναι της Μεγαλόπολης και της Ζαχάρως.

Ο δείκτης ποικιλότητας μεταξύ και εντός των πληθυσμών ήταν χαμηλός για κάθε μορφομετρικό χαρακτηριστικό ξεχωριστά. Για αυτά τα χαρακτηριστικά, στατιστικά διαφοροποιούνταν μόνο οι πληθυσμοί των σαλιγκαριών της Δ. Πελοποννήσου, τα οποία ήταν μεγαλύτερου ύψους και διαμέτρου. Το ίδιο αποτέλεσμα έχει καταγραφεί (για την περιοχή της Ζαχάρω) από τους Lazaridou- Dimitriadou et al. (1993). Διαφαίνεται ότι τα σαλιγκάρια μεγάλου μεγέθους δεν μπορούν να επιβιώσουν σε περιοχές με ξηροθερμικές συνθήκες (Cook & O'Donaltan, 1971; Knights, 1979). Η περιοχή της Δ. Πελοποννήσου χαρακτηρίζεται από όχι πολύ υψηλές θερμοκρασίες το καλοκαίρι σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιοχές δειγματοληψίας και από ηπιότερους χειμώνες. Το γεγονός αυτό επηρεάζει βασικά στάδια του βιολογικού κύκλου των σαλιγκαριών όπως τη χρονική διάρκεια της αύξησης των νεαρών σαλιγκαριών, καθώς και την έναρξη αναπαραγωγικής περιόδου.

Επιπρόσθετα η κύρια ανάλυση παραγόντων έδειξε ότι με τον πρώτο παράγοντα συσχετίστηκε το περιεστόμιο του κελύφους από το οποίο το σαλιγκάρι έχει και τις κύριες απώλειες νερού (Gebhardt-Dunkel, 1953; Machin, 1967). Μεγαλύτερο ύψος κελύφους εμφανίζουν τα σαλιγκάρια της Μεγαλόπολης και της Ζαχάρως.

Το δενδρόγραμμα των μορφολογικών χαρακτηριστικών του κελύφους ομαδοποιεί τους πληθυσμούς σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες που συμπίπτουν με τις ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες. Το πρότυπο σχεδιασμού των ζωνώσεων διαμορφώνεται από την επίδραση των

περιβαλλοντικών συνθηκών (κλίμα) στο γονιδιακό δυναμικό. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τις ομαδοποιήσεις με την UPGM ανάλυση.

Το δενδρόγραμμα των μορφομετρικών χαρακτηριστικών του κελύφους ομαδοποιεί τους πληθυσμούς διαφορετικά, ξεχωρίζοντας τον πληθυσμό της Μεγαλόπολης που έχει τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σαλιγκάρια. Οι διαφορές στο μέγεθος του κελύφους μεταξύ των πληθυσμών επηρεάζονται από τις κλιματικές συνθήκες της κάθε περιοχής, δείχνοντας το μεγάλο βαθμό της φαινοτυπικής πλαστικότητας των σαλιγκαριών (Madec and Daguzan, 1993 : Madec et al., 2000). Από πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο σε πληθυσμούς που διέφεραν στο μέγεθος του κελύφους έδειξαν ότι στην F1 γενιά τα μεγάλα μεγέθη κελυφών δεν εμφανίζονται. Το μεγάλο μέγεθος του κελύφους διατηρείται σε διαδοχικές γενιές μόνο στο *Helix aspersa maxima* (Madec and Guiller 1994 : Dupont-Nivet et al., 1998).

Επίσης, το γεγονός ότι τα σαλιγκάρια της Κορίνθου και της Λευκωσίας ομαδοποιούνται μαζί πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός η δειγματοληψία στην Κόρινθο και στη Λευκωσία έγινε σε υψόμετρο 300 m σε πετρώδες έδαφος με χαμηλή βλάστηση. Φαίνεται πως το είδος του βιότοπου και οι κλιματικές συνθήκες παίζουν σημαντικό ρόλο στα τελικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του κελύφους αλλά και του ζώου γενικότερα (Madec et al., 1998)

Τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι το ποσοστό της μοριακής παραλλακτικότητας εντός των πληθυσμών ήταν υψηλότερο (89%) από αυτό μεταξύ των πληθυσμών (11%). Ο πληθυσμός της Μεγαλόπολης απείχε όμως σημαντικά από όλους τους άλλους πληθυσμούς. Επίσης, ο γενετικός τόπος S10 είχε τη μεγαλύτερη αναμενόμενη και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία στον πληθυσμό της Σύρου. Η ανάλυση κυρίων παραγόντων έδειξε ότι η Κύπρος ομαδοποιείται σύμφωνα με τον

παράγοντα 1, μαζί με την Κρήτη βάση των γενετικών αποστάσεων των έντεκα υπό μελέτη πληθυσμών. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Lazaridou-Dimitriadou et al., (1993), οι οποίοι μελέτησαν τη γεωγραφική και γενετική (αλλοενζυμική) παραλλακτικότητα των χαρακτηριστικών του κελύφους από σαλιγκάρια της Ελλάδας και της Κύπρου.

Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές της παρέκκλισης από το νόμο Hardy-Weinberg υποδηλώνουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας. Η πιο πιθανή εξήγηση για αυτή την παρέκκλιση είναι:

- η δομή των πληθυσμών των σαλιγκαριών (τα άτομα δεν είναι ομοιογενώς κατανεμημένα)
- η αναπαραγωγική του στρατηγική που χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες ωαποθεσεις (interparous animal) (Lazaridou-Dimitriadou & Katoulas, 1981 : Lazaridou-Dimitriadou & Bailey, 1991)
- η μικρή δυνατότητα μετακίνησης του με αποτέλεσμα να παρατηρούνται φαινόμενα ενδογαμίας.
- η ύπαρξη υποπληθυσμών (φαινόμενο Wahlund)

Όσον αφορά τη γενετική παρέκκλιση, πρόκειται για ένα στοχαστικό φαινόμενο, το οποίο όπως και η επιλογή, είναι δυνατόν να μεταβάλλει τη γονιδιακή συχνότητα και την κυριαρχία των χαρακτηριστικών, ανάμεσα στα άτομα ενός πληθυσμού, μεταβάλλοντας την ποικιλότητα του πληθυσμού. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως σε μικρούς πληθυσμούς και τα αποτελέσματα της επίδρασης του γίνονται πιο άμεσα αντιληπτά.

Η απόκλιση των πληθυσμών των σαλιγκαριών από την ισορροπία Hardy-Weinberg, έχει καταδειχθεί και σε άλλες μελέτες του είδους *Helix aspersa* (Guiller et al., 2000). Διαπιστώθηκε ότι οι πληθυσμοί των σαλιγκαριών τείνουν να σχηματίζουν

μικρότερες ομάδες και κυρίως υποπληθυσμούς, ενώ η μετανάστευση είναι σπάνια μεταξύ τους (Selander & Ochman 1983 : Schilthuizen & Lombaerts 1994 : Pfenninger et al., 1996). Όσον αφορά ελληνικούς πληθυσμούς του σαλιγκαριού *Helix aspersa* αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg έχουν καταδειχθεί μετά από μελέτες με τη χρήση ισοενζύμων (Lazaridou-Dimitriadou et al., 1993)

Η ανάλυση του  $\chi^2$  (Fischer exact test) των συχνοτήτων των αλληλομόρφων έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο ετεροζυγωτίας μεταξύ των πληθυσμών ( $P < 0.001$ ) υποδηλώνοντας το βαθμό γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών στις ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές .

Δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας και των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Φαίνεται πως περιβαλλοντικοί και κλιματικοί παράγοντες επηρεάζουν το φαινότυπο των σαλιγκαριών. Συσχέτιση των μορφολογικών και γενετικών παραμέτρων δεν έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμούς σαλιγκαριών (Booth et al., 1990).

Η παρατηρούμενη γενετική διαφοροποίηση δείχνει σχετικά χαμηλές τιμές γενετικής παραλλακτικότητας ( $F_{ST} = 0,141$ ,  $P < 0.001$ ) ατόμων. Οι πληθυσμοί σαλιγκαριών στη Δ. Μεσόγειο παρουσιάζουν ακόμη μικρότερο βαθμό γενετικής διαφοροποίησης ( $F_{ST} = 0.089$ ,  $P < 0.001$ ) (Arnaud et al., 2003). Οι μέσες τιμές  $F_{IS}$  και  $F_{IT}$  είναι υψηλές και δείχνουν τη μεγάλη ενδοπληθυσμιακή παραλλακτικότητα.

Τα αποτελέσματα του Wilcoxon κριτηρίου δείχνουν ότι όλοι οι πληθυσμοί στους συγκεκριμένους γενετικούς τόπους πέρασαν ή περνούν από στενωπό με μείωση της αναμενόμενης παραλλακτικότητας. Η έλλειψη τέτοιας γενετικής ισορροπίας δείχνει πως οι πληθυσμοί των σαλιγκαριών μάλλον βρίσκονται κάτω από συνεχείς πιέσεις κύρια λόγω της αλληλεπίδρασης τους με το ανθρωπογενές περιβάλλον και της συστηματικής και συνεχόμενης θήρευσης τους για κατανάλωση και εμπορικούς

λόγους. Για την καλύτερη εκτίμηση της μείωσης του δραστικού πληθυσμιακού τους μεγέθους θα πρέπει να ακολουθήσει δειγματοληψία όχι μόνο διατοπικά αλλά και διαχρονικά σε διαφορετικές γενιές φυσικών πληθυσμών σαλιγκαριών.

Οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei (1972) απεικονιζόμενες με τα δενδρογράμματα Neighbor-Joining και UPGMA φανερώνουν τις εξελικτικές σχέσεις των πληθυσμών. Όπως φαίνεται προκύπτει μια συσχέτιση των γενετικών αποστάσεων με τις ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές που διαβιούν οι πληθυσμοί. Οι πληθυσμοί της Πελοποννήσου ομαδοποιούνται μαζί, καθώς και πληθυσμοί της Κύπρου και της Κρήτης. Τα σαλιγκάρια από τη Σύρο δεν ομαδοποιούνται με κάποιον άλλο πληθυσμό. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των γενετικών αποστάσεων με τις γεωγραφικές περιοχές.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν πως:

- τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του κελύφους εξαρτώνται από τις κλιματικές συνθήκες.
- τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κελύφους δεν σχετίζονται με τις κλιματικές συνθήκες,
- τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης αναδεικνύουν το μέγεθος των ενδοπληθυσμιακών διαφορών, για αυτό και δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των γενετικών αποστάσεων και των γεωγραφικών περιοχών.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **ANSART A. (2002).** Hibernation and cold hardiness in the land snail *Cornu aspersum* (Gastropoda, Pulmonata). Bulletin de la Société zoologique de France. vol.127,n 4, pp.375-380
- **ARNAUD J-F, MADEC L, DAGUZAN J. (1999).** Spatial differentiation of allozyme frequencies in a subdivided population of the land snail *Helix aspersa*. *J. Moll. Stud*, **65**: 267-271.
- **BASINGER A.J. (1931).** The European brown snail in California. University of California Agricultural Experiment Station Bulletin, 151: 1-22.
- **BOOKSTEIN FL. (1989).** 'Size and shape': a comment on semantics. *Syst. Zool.*, 38: 173-180.
- **BOOTH, CAREY L., DAVID S. WOODRUFF, AND STEPHEN JAY GOULD. (1990):** Lack of significant associations between allozyme heterozygosity and phenotypic traits In the land snail *Cerion*. *Evolution*, 210-213
- **BORN A. (1780).** Testacea Museiu Caesarei Vindobonensis, quae jussu Mariae Theresiae Augustae. J. P. Kraus, Vienna
- **BURCH JB. (1960).** Some snails and slugs of quarantine significance to the United States. U.S. Department of Agriculture Research Service, 82: 1-70.
- **CAIN AJ. (1981).** Variation in shell shape and size of helicid snails in relation to other Pulmonates in faunas of the Palaearctic region. *Malacologia*, 21: 149-176.
- **CAPINERA JL. (2001).** Handbook of Vegetable Pests. Academic Press, San Diego. 729 pp.
- **CLECOM Project T. v. (2001).** Bank, R.A., Falkner G., Proschwitz, Checklist of the non-marine Molluscan Species-group taxa of the States of Northern, Atlantic and Central Europe (CLECOM I): *Heldia*, 4 (1/2) (2001).
- **COOK J., O'DONALDAN K. (1971).** Size- and shape-related principal component analysis. *Biometrics*, 52: 710-716.



- **DUPONT-NIVET M., MALLARD J., BONNET J.C., BLANC J. M., (1998).** Quantitative Genetics of reproductive traits in the edible snail *Helix aspersa* Muller. *The Journal of Experimental Zoology*, 281:220-227.
- **EXADACTYLOS A., (1997).** Population genetics of the Dover sole, *Solea solea* Linnaeus, 1758. Teleostei: Soleidae. Ph.D. Thesis. University of Liverpool, School of Biological Sciences, Port Erin Marine Lab., U.K
- **FELSENSTEIN (1989).** *Sexual Selection, Dispersal and Reproductive Behaviour in Hermaphrodite Land Snails, with Particular Reference to Helix aspersa Müller (Pulmonata: Gastropoda)*. Ph.D. Thesis, University of Manchester.
- **GEBHARDT-DUNKEL, E. (1953).** Die trocken resistenz Gehäuseschneectier. *Zool. Jb (Zool)*, 64. 235-256
- **GIUSTI F, MANGANELLI G (1984).** Relationships between geological land evolution and present distribution of terrestrial gastropods in the western mediterranean area. In: Solem A, Van Bruggen AC (eds) *World-Wide Snails*, E.J. Brill: Leiden. pp 70-92.
- **GIUSTI, F., MANGANELLI, G., SCHEMBRI, P. (1996):** The non-marine molluscs of the Maltese Islands.
- **GOUDET J. (1995).** Fstat (Version 1.2). A computer program to calculate *F*-statistics. *J. Hered.*, 86: 485-486.
- **GUILLER A., BELLIDO A., MADEC L., (1994).** Genetic distances and ordination: the land snail *Helix aspersa* in North Africa as a test case. *Syst. Biol.*, 47(2):208-227.
- **GUILLER A, MADEC L, DAGUZAN J. (1994).** Geographical patterns of genetic differentiation in the landsnail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata). *J Molluscan Stud* 60: 205-221.
- **GUILLER A., ARNAUD J.F., VAUTRIN D., SOLIGNAC M., (2000).** Highly polymorphic microsatellite markers in the landsnail *Helix aspersa* (Mollusca Gastropoda). *Molecular Ecology*, 9:1191-1193.
- **GUILLER A, COUTELLE MA, MADEC L., DEUNFF J. (2001).** Molecular support for evolutionary history of the land snail *Helix aspersa* in Western Mediterranean. *Mol Ecol* 10: 81-89.

- **GUO S., THOMPSON E. (1992).** Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles *Biometrics*, Vol. 48, No. 2 (Jun., 1992), pp. 361-372
- **LAZARIDOU-DIMITRIADOU M, KARAKOUSIS Y, STAIKOU A. (1993).** Geographic variation in shell morphology and isoenzymes of *Helix aspersa* Müller, 1774 (Gastropoda, Pulmonata), the edible land snail, from Greece and Cyprus. *Heredity* **71**: 1□14.
- **LAZARIDOU-DIMITRIADOU M., & KATTOULAS M.E., (1981).** Contribution a l' etude de la biologie et de la croissance des escargots commercialises en Crece: *Eobania vermiculata* (Muller) et *Helix aspersa* Muller. *Haliotis*, 11:129- 137.
- **LAZARIDOU-DIMITRIADOU, M. AND BAILEY, S.E.R. (1991).** Growth, reproduction and activity rhythms of two species of edible snails, *Helix aspersa* and *Helix lucorum*, in non-24 hour light cycles. *J. Zool.* **225**, 381-391
- **MACHIN, J. (1967).** Structural adaptation for reducing water-loss in three species of terrestrial snails. *J. Zool. Lond.*, 152. 55-65
- **MADEC L., (1989).** Etude de la differenciation de quelques populations geographiquement separees de l'escargot petit-gris *Helix aspersa* Muller: aspects morphologiques, ecophysiologiques et biochimiques. Unpublished D.Phil. Thesis, Rennes University.
- **MADEC L (1991a).** Enzymatic variation in natural populations of *Helix aspersa* Müller. *CR Acad. Sci. Paris*, 313(3): 339–344.
- **MADEC L (1991b).** Genetic divergence in natural populations of the landsnail *Helix aspersa* Müller, 1774. *J Molluscan Stud*, 57: 483□487.
- **MADEC L, DAGUZAN J (1993).** Geographic variation in reproductive traits of *Helix aspersa* Müller studied under laboratory conditions. *Malacologia*, 35: 99–117.
- **MADEC L, GUILLER A (1994).** Geographic variation of distal genitalia in the landsnail *Helix aspersa* (Mollusca: Gastropoda). *J Zool* **233**: 215□231.
- **MADEC L, GUILLER A, COUTELLEC-VRETO MA, DESBUQUOIS C (1998).** Size-fecundity relationships in the land snail *Helix aspersa*: preliminary results on a form outside the norm. *Invert ReprodDev* **34**: 83–90.

- **MADEC L, DESBUQUOIS C, COUTELLEC-VRETO MA. (2000).** Phenotypic plasticity in reproductive traits: importance in the life history of the land snail *Helix aspersa* in a recently colonized habitat. *Biol J Linn Soc* **69**: 25-39.
- **MÜLLER, O.F. (1774):** Vermium Terrestrium et Fluviatilium seu animalium infusorium, helminthicorum, et testaceorum non marinorum succincta historia.
- **NEI M (1972).** Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106, 283-392.28.
- **ODILE LECOMPTE, LUC MADEC, JACQUES DAGUZAN (1998).** Temperature and phenotypic plasticity in the shell colour and banding of the land snail *Helix aspersa*. UMR CNRS 6553, service de zoologie générale et d'écophysiologie, université de Rennes-I, avenue du G<sup>al</sup>-Leclerc, 35042 Rennes cedex, France
- **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. B.*, **263**: 1211-1217.
- **RAYMOND M, ROUSSET F. (1995).** Genepop (Version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, **86**: 248-249.
- **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.
- **SELANDER RK, KAUFMAN DW. (1975).** Genetic structure of populations of the brown snail *Helix aspersa* I. Microgeographic variation. *Evolution*, **29**: 385-401.
- **SLATKIN M. (1993).** Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, **47**: 264-279.
- **SOKAL R.R. AND MICHENER, C.D. (1958),** "A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships," *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409-1438.
- **SOLEM A., (1977).** Classification of the land Mollusca. In eds. Fretter V. & J. Peale, 1978. Pulmonates. Academic Press, London.
- **WEIR BS, COCKERHAM CC. (1984).** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.

- **WILKINS N.P., GOSLING E., CURATOLO A., LINNANE A., JORDAN C., COURTNEY H.P., (1995).** Fluctuating asymmetry in Atlantic salmon, European trout and their hybrids, including triploids. *Aquaculture*, 137:77-85.

#### **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- **ΛΑΖΑΡΙΔΟΥ-ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΟΥ Μ. & ΚΑΤΤΟΥΛΑΣ Μ.Ε., 1985.** Τα εδώδιμα και εμπορεύσιμα σαλιγκάρια της Ελλάδας – Σαλιγκαροτροφία. Γιαχούδη-Γιαπούλη Ο.Ε., Θεσσαλονίκη.
- **GALLO G., 1986.** Σαλιγκαροτροφία. Εκδόσεις Ψιγάλου, Αθήνα

## 6. ABSTRACT

Genetic diversity and shell morphological variation of the edible snail *Helix aspersa* Muller (1758) was studied in 11 different regions in Hellas and Cyprus. The population from Megalopolis was statistically different from all the other populations concerning all morphological characteristics. Principal component analysis of these characteristics explained 90% of the observed variance. Cluster analysis of shell quality characteristics grouped the populations relative to their origin. Cluster analysis of shell shape components grouped the populations relative to their habitats.

Five microsatellite loci were also examined for all populations by genotyping 254 individuals in total. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were detected in all loci and all populations. Values of genetic differentiation ( $R_{ST}$ ,  $F_{ST}$ ) were significantly higher than those observed in previous studies. Values of gene flow ( $N_m$ ) were relatively low, implying a strong geographical and reproductive diversity pattern; a fact which is also explained by the fact that the animal is considered as interparous and its dispersal ability is relatively low; the observed high values of inbreeding between relatives could be possible in nature.

In all cases genetic distance matrices and PCA analysis of these and other indices revealed a potential subgrouping of a western to eastern pattern of overall differentiation in all sampled populations.

Key words: *Helix aspersa*, Genetic diversity, microsatellites

## 7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας Ι.** Αναμενόμενη και παρατηρούμενη ετεροζυγωτία ανά γεννητικό τόπο σε κάθε πληθυσμό του *H. aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου

ΠΕΡΙΟΧΗ	Locus	N	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S2	22	0,000	0,566	1,000
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S5	22	0,000	0,000	0,000
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S3	22	0,091	0,758	0,880
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S6	22	0,045	0,770	0,941
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	S10	22	0,318	0,505	0,370
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S2	29	0,172	0,674	0,744
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S5	29	0,448	0,498	0,099
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S3	29	0,138	0,747	0,815
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S6	29	0,241	0,673	0,641
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	S10	29	0,103	0,163	0,367
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S2	25	0,120	0,723	0,834
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S5	25	0,320	0,455	0,297
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S3	25	0,040	0,710	0,944
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S6	25	0,000	0,333	1,000
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	S10	25	0,320	0,269	-0,190
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S2	24	0,167	0,608	0,726
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S5	24	0,667	0,722	0,077
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S3	24	0,083	0,523	0,841
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S6	24	0,000	0,743	1,000
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	S10	24	0,583	0,527	-0,107
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S2	16	0,000	0,555	1,000
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S5	16	0,000	0,000	0,000
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S3	16	0,000	0,578	1,000
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S6	16	0,063	0,803	0,922
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	S10	16	0,375	0,615	0,390
ΛΑΡΝΑΚΑ	S2	19	0,000	0,726	1,000
ΛΑΡΝΑΚΑ	S5	19	0,263	0,323	0,185
ΛΑΡΝΑΚΑ	S3	19	0,000	0,510	1,000
ΛΑΡΝΑΚΑ	S6	19	0,211	0,702	0,700
ΛΑΡΝΑΚΑ	S10	19	0,105	0,195	0,461

ΛΕΜΕΣΟΣ	<b>S2</b>	28	0,000	0,462	1,000
ΛΕΜΕΣΟΣ	<b>S5</b>	28	0,679	0,483	-0,406
ΛΕΜΕΣΟΣ	<b>S3</b>	28	0,143	0,577	0,752
ΛΕΜΕΣΟΣ	<b>S6</b>	28	0,357	0,783	0,544
ΛΕΜΕΣΟΣ	<b>S10</b>	28	0,250	0,429	0,418
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	<b>S2</b>	11	0,000	0,545	1,000
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	<b>S5</b>	11	0,000	0,000	0,000
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	<b>S3</b>	11	0,000	0,165	1,000
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	<b>S6</b>	11	0,000	0,545	1,000
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	<b>S10</b>	11	0,818	0,884	0,075
ΣΥΡΟΣ	<b>S2</b>	36	0,028	0,528	0,947
ΣΥΡΟΣ	<b>S5</b>	36	0,278	0,292	0,048
ΣΥΡΟΣ	<b>S3</b>	36	0,028	0,642	0,957
ΣΥΡΟΣ	<b>S6</b>	36	0,083	0,861	0,903
ΣΥΡΟΣ	<b>S10</b>	36	0,972	0,902	-0,078
ΧΑΝΙΑ	<b>S2</b>	21	0,143	0,686	0,792
ΧΑΝΙΑ	<b>S5</b>	21	0,667	0,698	0,045
ΧΑΝΙΑ	<b>S3</b>	21	0,000	0,091	1,000
ΧΑΝΙΑ	<b>S6</b>	21	0,000	0,707	1,000
ΧΑΝΙΑ	<b>S10</b>	21	0,190	0,299	0,364
ΖΑΧΑΡΩ	<b>S2</b>	23	0,000	0,684	1,000
ΖΑΧΑΡΩ	<b>S5</b>	23	0,217	0,343	0,366
ΖΑΧΑΡΩ	<b>S3</b>	23	0,130	0,827	0,842
ΖΑΧΑΡΩ	<b>S6</b>	23	0,261	0,861	0,697
ΖΑΧΑΡΩ	<b>S10</b>	23	0,565	0,715	0,209

**Πίνακας II.** Συχνότητες αλληλουχιών ανά γενετικό τόπο σε κάθε πληθυσμό

Locus	Allele	ΑΡΓΟΛΙΑΔΑ	ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΑΓ. ΘΕ/ΡΟΙ	ΙΕΡ/ΤΡΑ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΛΑΡΝΑΚΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΜΕΓ/ΠΟΛΗ	ΣΥΡΟΣ	ΧΑΝΙΑ	ΖΑΧΑΡΩ
<b>S2</b>	<b>183</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,091	0,042	0,000	0,087
	<b>185</b>	0,091	0,000	0,020	0,083	0,000	0,000	0,036	0,000	0,056	0,000	0,000
	<b>187</b>	0,091	0,276	0,260	0,542	0,000	0,053	0,143	0,182	0,042	0,190	0,261
	<b>189</b>	0,636	0,466	0,420	0,292	0,625	0,421	0,714	0,636	0,667	0,381	0,478
	<b>191</b>	0,045	0,000	0,120	0,083	0,188	0,158	0,000	0,091	0,028	0,357	0,043
	<b>193</b>	0,091	0,121	0,120	0,000	0,000	0,211	0,071	0,000	0,139	0,071	0,043
	<b>195</b>	0,045	0,138	0,060	0,000	0,125	0,158	0,036	0,000	0,028	0,000	0,087
<b>S5</b>	<b>143</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,065
	<b>145</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000
	<b>147</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048	0,065
	<b>149</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000
	<b>155</b>	0,000	0,000	0,020	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022
	<b>157</b>	0,000	0,034	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022
	<b>159</b>	1,000	0,690	0,720	0,458	1,000	0,816	0,643	1,000	0,833	0,452	0,804
	<b>161</b>	0,000	0,034	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,022
	<b>163</b>	0,000	0,138	0,100	0,208	0,000	0,079	0,321	0,000	0,111	0,262	0,000
	<b>165</b>	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000
<b>167</b>	0,000	0,052	0,120	0,083	0,000	0,053	0,018	0,000	0,000	0,143	0,000	
<b>171</b>	0,000	0,052	0,040	0,000	0,000	0,053	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>S3</b>	<b>160</b>	0,068	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>164</b>	0,023	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000
	<b>166</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,109
	<b>168</b>	0,000	0,207	0,160	0,000	0,000	0,053	0,268	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>170</b>	0,000	0,000	0,080	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>172</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,087	



	<b>174</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,152
	<b>176</b>	0,273	0,328	0,480	0,667	0,625	0,684	0,589	0,909	0,222	0,952	0,304
	<b>178</b>	0,000	0,052	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000
	<b>180</b>	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,000
	<b>182</b>	0,000	0,000	0,000	0,104	0,000	0,000	0,000	0,000	0,542	0,000	0,000
	<b>184</b>	0,045	0,310	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>186</b>	0,068	0,034	0,000	0,125	0,000	0,053	0,000	0,091	0,000	0,000	0,130
	<b>188</b>	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000
	<b>190</b>	0,000	0,034	0,140	0,000	0,000	0,053	0,036	0,000	0,028	0,000	0,130
	<b>192</b>	0,386	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>196</b>	0,000	0,000	0,020	0,063	0,063	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,043
	<b>198</b>	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>200</b>	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,043
	<b>210</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000
	<b>214</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>216</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>218</b>	0,000	0,034	0,080	0,000	0,000	0,105	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>S6</b>	<b>150</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,139	0,000	0,000
	<b>158</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,182	0,000	0,000	0,000
	<b>162</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>164</b>	0,000	0,086	0,000	0,208	0,000	0,026	0,018	0,091	0,139	0,143	0,043
	<b>166</b>	0,227	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,087
	<b>168</b>	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>170</b>	0,023	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>172</b>	0,364	0,000	0,000	0,000	0,250	0,079	0,000	0,000	0,167	0,000	0,043
	<b>174</b>	0,023	0,034	0,000	0,000	0,188	0,053	0,000	0,000	0,194	0,000	0,109
	<b>176</b>	0,045	0,000	0,000	0,000	0,094	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,065
	<b>178</b>	0,000	0,190	0,160	0,000	0,000	0,289	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>180</b>	0,091	0,517	0,800	0,417	0,281	0,447	0,268	0,636	0,139	0,476	0,239

	<b>182</b>	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000
	<b>184</b>	0,000	0,000	0,040	0,042	0,000	0,000	0,321	0,000	0,000	0,000	0,022
	<b>186</b>	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,143	0,022
	<b>188</b>	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,048	0,000
	<b>190</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,087
	<b>192</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000
	<b>194</b>	0,000	0,086	0,000	0,000	0,000	0,026	0,161	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>198</b>	0,000	0,086	0,000	0,000	0,000	0,026	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>200</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,069	0,000	0,087
	<b>202</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,196
	<b>204</b>	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>206</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000	0,000
	<b>210</b>	0,182	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,097	0,000	0,000
<b>S10</b>	<b>101</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,069	0,000	0,000
	<b>103</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,045	0,000	0,024	0,000
	<b>105</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,069	0,000	0,087
	<b>107</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	0,045	0,000	0,024	0,022
	<b>109</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,054	0,091	0,000	0,000	0,087
	<b>111</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,069	0,000	0,043
	<b>113</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,091	0,097	0,000	0,000
	<b>115</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,054	0,000	0,000	0,000	0,022
	<b>117</b>	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,167	0,000	0,000
	<b>121</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,045	0,083	0,000	0,000
	<b>123</b>	0,045	0,017	0,000	0,021	0,031	0,000	0,000	0,136	0,042	0,000	0,000
	<b>125</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000
	<b>127</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,136	0,069	0,000	0,022
	<b>129</b>	0,114	0,000	0,000	0,042	0,094	0,000	0,000	0,136	0,125	0,000	0,000
	<b>131</b>	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>133</b>	0,682	0,914	0,840	0,646	0,594	0,895	0,750	0,182	0,042	0,833	0,500

	<b>135</b>	0,114	0,017	0,000	0,021	0,125	0,000	0,018	0,045	0,111	0,000	0,065
	<b>137</b>	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,048	0,000
	<b>139</b>	0,000	0,000	0,000	0,229	0,031	0,000	0,018	0,000	0,000	0,024	0,109
	<b>141</b>	0,000	0,017	0,160	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,022
	<b>143</b>	0,000	0,017	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000
	<b>145</b>	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,048	0,000
	<b>147</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,022

**Πίνακας III.** Τιμές  $R_{ST}$ ,  $N_m$  και  $P$  ανά ζεύγη πληθυσμών του *H. Aspersa* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ	$R_{ST}$	$N_m$	$P$
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΛΕΥΚΩΣΙΑ	0,048	5,004	0,050
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	0,030	7,996	0,090
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	0,000	0,000	0,350
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	0,052	4,518	0,010
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	0,004	69,509	0,290
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	0,000	0,000	0,400
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	0,108	2,066	0,010
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	0,127	1,718	0,010
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	0,113	1,955	0,010
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	0,138	1,563	0,010
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΛΑΡΝΑΚΑ	0,000	0,000	0,420
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΛΑΡΝΑΚΑ	0,040	6,048	0,110
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΛΑΡΝΑΚΑ	0,033	7,413	0,050
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΛΑΡΝΑΚΑ	0,065	3,582	0,030
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΛΑΡΝΑΚΑ	0,096	2,351	0,020
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	0,119	1,847	0,010
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	0,041	5,887	0,040
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΛΕΜΕΣΟΣ	0,074	3,147	0,020
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	0,089	2,573	0,010
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΛΕΜΕΣΟΣ	0,231	0,831	0,010
ΛΑΡΝΑΚΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	0,111	2,009	0,010
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,154	1,370	0,010
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,205	0,967	0,010
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,232	0,825	0,010
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,266	0,690	0,010
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,198	1,016	0,010
ΛΑΡΝΑΚΑ	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,120	1,826	0,010
ΛΕΜΕΣΟΣ	ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	0,184	1,112	0,010
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΣΥΡΟΣ	0,133	1,626	0,010

ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΣΥΡΟΣ	0,192	1,055	0,010
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΣΥΡΟΣ	0,205	0,970	0,010
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΣΥΡΟΣ	0,219	0,890	0,010
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΣΥΡΟΣ	0,155	1,358	0,010
ΛΑΡΝΑΚΑ	ΣΥΡΟΣ	0,097	2,322	0,010
ΛΕΜΕΣΟΣ	ΣΥΡΟΣ	0,205	0,972	0,010
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	ΣΥΡΟΣ	0,000	0,000	0,330
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΧΑΝΙΑ	0,099	2,276	0,020
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΧΑΝΙΑ	0,039	6,194	0,030
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΧΑΝΙΑ	0,045	5,278	0,030
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΧΑΝΙΑ	0,051	4,638	0,050
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΧΑΝΙΑ	0,022	11,238	0,110
ΛΑΡΝΑΚΑ	ΧΑΝΙΑ	0,086	2,668	0,010
ΛΕΜΕΣΟΣ	ΧΑΝΙΑ	0,120	1,827	0,010
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	ΧΑΝΙΑ	0,170	1,222	0,010
ΣΥΡΟΣ	ΧΑΝΙΑ	0,171	1,211	0,010
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	ΖΑΧΑΡΩ	0,076	3,026	0,020
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΖΑΧΑΡΩ	0,062	3,811	0,010
ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΙ	ΖΑΧΑΡΩ	0,090	2,514	0,010
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	ΖΑΧΑΡΩ	0,106	2,109	0,010
ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΖΑΧΑΡΩ	0,166	1,257	0,010
ΛΑΡΝΑΚΑ	ΖΑΧΑΡΩ	0,069	3,360	0,010
ΛΕΜΕΣΟΣ	ΖΑΧΑΡΩ	0,019	12,811	0,090
ΜΕΓΑΛΟΥΠΟΛΗ	ΖΑΧΑΡΩ	0,070	3,338	0,030
ΣΥΡΟΣ	ΖΑΧΑΡΩ	0,110	2,022	0,010
ΧΑΝΙΑ	ΖΑΧΑΡΩ	0,101	2,218	0,010