

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

**Η γενετική εξάπλωση του *Cornu aspersum* στην Ανατολική
Μεσόγειο**

Κοπανάκης Αλέξανδρος

ΒΟΛΟΣ 2022

<< Η γενετική εξάπλωση του *Cornu aspersum* στην Ανατολική Μεσόγειο >>

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

1. **Μαριάνθη Χατζηϊωάννου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Εκτροφή Σαλιγκαριών και Βατράχων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**.

2. **Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**, Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

3. **Γκάφας Γεώργιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα άτομα που με συνόδεψαν σε αυτό το ταξίδι που λαμβάνει ένα τέλος με αυτή την προπτυχιακή εργασία. Πρώτιστος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα Μαριάνθη Χατζηϊωάννου για την βοήθεια της, την επιμονή της και την συμπαράσταση για να βγει αυτή η εργασία μέσω των συνθηκών που ζήσαμε. Επιπλέον ,ένα μεγάλο ευχαριστώ στου δύο διδάκτορες τον κ. Κωνσταντίνο Αποστόλου και την κα Κουγιαγκά Ευκαρπία για την στήριξη τους και την απεριόριστη βοήθεια που παρείχαν οποιαδήποτε ώρα και μέρα.

Ένα θερμό ευχαριστώ στους γονείς μου που χωρίς την ηθική τους υποστήριξη δεν θα έφτανα εδώ που είμαι τώρα. Επίσης στους φίλους μου και στα άτομα που γνώρισα στον Βόλο που με συνόδεψαν σε αυτό το ταξίδι των 7 ετών.

Θα το αφήσω αυτό το μήνυμα εδώ μπορεί να μην το δείτε πότε αλλά, χωρίς όλους εσάς δεν θα έκανα το επιπλέον βήμα να συνεχίσω και να βάλω μια τελεία σε αυτό το κομμάτι της ζωής μου. Ευχαριστώ.

Περίληψη

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετάται η γενετική παραλλακτικότητα, η μορφολογία και ο πολυμορφισμός του εδώδιμου σαλιγκαριού *Cornu aspersum* από δύο διαφορετικούς πληθυσμούς της Ελλάδας, Αγρίνιο και Άρτα. Η γενετική παραλλακτικότητα ερευνάται με τη χρήση μικροδορυφορικού DNA και η έρευνα αφορά άγριους πληθυσμούς.

Η γενετική παραλλακτικότητα, ο δείκτης ομομιξίας, η ετεροζυγωτία και η ενδοειδική ροή γονιδίων μελετήθηκε σε συνολικά 53 άτομα από 2 πειραματικές σειρές (Αγρίνιο και Άρτα), με χρήση μικροδορυφορικού DNA.

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. Όλοι οι πληθυσμοί περνούν από στενωπό με αποτέλεσμα τη μείωση της αναμενόμενης παραλλακτικότητας

Λέξεις Κλειδιά: *Cornu aspersum*, γενετική παραλλακτικότητα, μικροδορυφορικό DNA

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Το είδος <i>Cornu aspersum</i>.....	1
1.1.1. Ταξινόμηση του είδους <i>Cornu aspersum</i>	6
1.2. Φυλογεωγραφία.....	8
1.3. Πολυμορφισμός.....	14
1.4. Εξάπλωση.....	14
1.5. Μοριακοί Δείκτες.....	16
1.6. Ο σκοπός της διατριβής.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1. Περιοχές δειγματοληψίας και συλλογής.....	19
2.2. Μορφολογική Ανάλυση.....	20
2.3. Απομόνωση DNA.....	22
2.4. Ηλεκτροφόρηση.....	23
2.4.1. Παρασκευή πηκτής αγαρόζης.....	23
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
3.1. Μορφομετρικά Χαρακτηριστικά.....	25
3.2. Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το είδος *Cornu aspersum*

Το σαλιγκάρι απολαμβάνεται ως τρόφιμο σε ορισμένες περιοχές, αλλά θεωρείται επίσης ευρέως ως παράσιτο στους κήπους και στη γεωργία, ειδικά σε περιοχές όπου εισήχθη κατά λάθος και όπου τα σαλιγκάρια δεν θεωρούνται συνήθως ως είδος τροφής (Ansart, A 2002).



Εικόνα 1. *Cornu aspersum*(https://en.wikipedia.org/wiki/Cornu_aspersum)

Το *Cornu aspersum* (Εικόνα 1) (συν. *Cryptomphalus aspersus*), γνωστό με την κοινή ονομασία σαλιγκάρι κήπου, είναι ένα είδος χερσαίου σαλιγκαριού της οικογένειας

Helicidae, που περιλαμβάνει μερικά από τα πιο γνωστά χερσαία σαλιγκάρια. Από όλα τα χερσαία μαλάκια, αυτό το είδος μπορεί να είναι το πιο ευρέως γνωστό. Ταξινομήθηκε με το όνομα *Helix aspersa* για πάνω από δύο αιώνες, αλλά η επικρατούσα ταξινόμηση το τοποθετεί τώρα στο γένος *Cornu* (Neubert, E. 2011).

Το ενήλικο φέρει ένα σκληρό (Εικόνα 2), ασβεστούχο κέλυφος διαμέτρου 25–40 χιλιοστών (1–1+5/8 ίντσες) και ύψους 25–35 χιλιοστών (1–1+3/8 ίντσες), με τέσσερις ή πέντε σπείρες. Το κέλυφος είναι μεταβλητό ως προς το χρώμα και την απόχρωση του χρώματος, αλλά γενικά έχει ένα δικτυωτό σχέδιο σκούρου καφέ, καφέ-χρυσού ή καστανού με κίτρινες ρίγες, κηλίδες ή ραβδώσεις (χαρακτηριστικά διακοπτόμενες καφέ λωρίδες χρώματος)(Εικόνα 3). Το άνοιγμα είναι μεγάλο και χαρακτηριστικά λοξό, το περιθώριο του στους ενήλικες είναι υπόλευκο και αντανακλάται (Welter-Schultes, 2011).



Εικόνα 2. Ενήλικο *Cornu Aspersum* (Photo: © Dfruzzeiti, Wikipedia)



Εικόνα 3. *Cornu aspersum* που είναι εμφανές το δικτυωτό σχέδιο στο κέλυφος (Photo: © Wikipedia).

Το σώμα είναι μαλακό, καφέ-γκρι και μπορεί να ανασυρθεί εξολοκλήρου μέσα στο κέλυφος, κάτι που κάνει το ζώο όταν είναι ανενεργό ή απειλούμενο. Όταν τραυματιστεί ή ερεθιστεί πολύ το σαλιγκάρι παράγει έναν αμυντικό αφρό βλέννας που μπορεί να απωθήσει ορισμένους εχθρούς ή να κατακλύσει επιθετικά μικρά μυρμήγκια (Εικόνα 4). Κατά τη διάρκεια ξηρού ή κρύου καιρού σφραγίζει το άνοιγμα του κελύφους με μια λεπτή μεμβράνη αποξηραμένης βλέννας. ο όρος για μια τέτοια μεμβράνη είναι επιφράγμα. Το επίφραγμα βοηθά το σαλιγκάρι να συγκρατεί την υγρασία και το προστατεύει από μικρά αρπακτικά όπως μερικά μυρμήγκια.



Εικόνα 4. *Cornu aspersum* και φαίνεται η επιδιόρθωση τραυματισμού στο μέσο του κελύφους, η οποία έχει γίνει με απόθεση άμορφου υλικού. (Βιολογία και Εκτροφή Γαστεροπόδων σελ.15)

Οι περίοδοι ηρεμίας του σαλιγκαριού είναι κατά τη διάρκεια της ζέστης και της ξηρασίας(Εικόνα 5). Η ηρεμία του κατά τη διάρκεια του χειμώνα είναι γνωστή ως διαχειμάση. Όταν διαχειμάζει, το *Cornu aspersum* αποφεύγει το σχηματισμό πάγου στους ιστούς του αλλάζοντας τα ωσμωτικά συστατικά του αίματός του (ή της αιμολέμφου). Αυτό του επιτρέπει να επιβιώνει σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($23\text{ }^{\circ}\text{F}$) (Ansart 2002). Κατά τη διάρκεια του αερισμού, ο γιακάς του μανδύα έχει την ικανότητα να αλλάζει τη διαπερατότητά του στο νερό (Welter-Schultes 2011). Το σαλιγκάρι έχει επίσης ωσμωρρυθμιστικό μηχανισμό που αποτρέπει την υπερβολική απορρόφηση νερού κατά τη διάρκεια της χειμέριας νάρκης. Αυτοί οι μηχανισμοί επιτρέπουν στο *Cornu aspersum* να

αποφεύγει είτε τη θανατηφόρα αποξήρανση είτε την ενυδάτωση κατά τη διάρκεια μηνών οποιουδήποτε είδους ηρεμίας.



Εικόνα 5. Ανήλικο και ενήλικα άτομα του είδους *Cornu aspersum* σε θερινή νάρκη. (Βιολογία και Εκτροφή Γαστεροπόδων σελ.65)

Σε περιόδους δραστηριότητας αναδύεται το κεφάλι και το «πόδι» του σαλιγκαριού(Εικόνα 6). Στο πρόσθιο τμήμα τού ποδιού βρίσκεται η κεφαλική περιοχή, που φέρει τα κύρια αισθητήρια όργανα. Τα χερσαία πνευμονοφόρα σαλιγκάρια φέρουν στο κεφάλι ένα ζεύγος κοντών κεραιών και ένα δεύτερο ζεύγος μακρύτερων κεραιών, που στην άκρη τους φέρουν από ένα οφθαλμό. Τα δύο ζεύγη κεραιών είναι συσταλτά και μπορούν να αποσύρονται στο εσωτερικό τού σώματος. Μέσα στη στοματική κοιλότητα βρίσκονται η γνάθος (jaw) και το ξύστρο (radula), δομές που χρησιμοποιούνται για τον τεμαχισμό και την απόξεση της τροφής αντίστοιχα (Χατζιωάννου 2015).



Εικόνα 6. *Cornu aspersum* σε περίοδο δραστηριότητας. (Photo: © Dr. Roy Anderson, MolluscIreland)

1.1.1. Ταξινόμηση του είδους *Cornu aspersum*

Το αποδεκτό όνομα του είδους θεωρούνταν από καιρό ως *Helix aspersa*, μέλος του γένους *Helix*. Ωστόσο, σε έναν αριθμό δημοσιεύσεων από το 1990,(Falkner 2001) έχει τοποθετηθεί σε διάφορα γένη που προηγουμένως θεωρούνταν υπο-γένους του *Helix*. Ένα τέτοιο γένος είναι το *Cornu*, το οποίο είναι κατάλληλο εάν το είδος θεωρείται συγγενές με το είδος που προηγουμένως ήταν γνωστό ως *Helix aperta* (Falkner 2002). Τότε το όνομα

θα ήταν *Cornu aspersum* (Bank 2007). Προηγουμένως υπήρχε συζήτηση για το εάν το *Cornu* ήταν έγκυρο γενικό όνομα, αλλά μια απόφαση του 2015 επιβεβαίωσε ότι είναι έτσι (ICZN 2015). Μέχρι να καθιερωθεί αυτό, οι ιταλικές ερευνητικές ομάδες και άλλες χρησιμοποίησαν το γενικό όνομα *Cantareus* (ICZN 2015). Άλλοι εργαζόμενοι, συμπεριλαμβανομένων ουκρανικών και ρωσικών ερευνητικών ομάδων, που θεωρούν τα *H. aspersa* και *H. aperta* ως διαφορετικά γένη, αποκαλούν τον πρώην *Cryptomphalus aspersus* (Manganelli 2005). Παραμένει επίσης μια αμφισβητήσιμη θέση η διατήρηση της *Helix* ως ονομασία γένους.

Η συστηματική κατάταξη του σαλιγκαριού *C. aspersum* 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: *Cornu*
- Είδος: *C. aspersum*

Πολλές υποειδικές ποικιλίες έχουν περιγράψει με βάση τα χαρακτηριστικά του κελύφους (π.χ. Sverlova 2006). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα στις μέρες μας είναι το υποείδος *Cornu aspersum maxima* (Taylor, 1883)(Εικόνα 7). Στην πρόσφατη επιστημονική βιβλιογραφία το όνομα έχει εφαρμοστεί τόσο σε μεγάλα αλγερινά

σαλιγκάρια (Madec 1993) όσο και σε μια μεγάλη μορφή που συναντάται σε φάρμες σαλιγκαριών (Guiller 2012) Ορισμένες αλγερινές μορφές είναι όντως γενετικά αρκετά απομακρυσμένες από τη συνηθισμένη, πιο διαδεδομένη μορφή, αλλά η μεγάλη μορφή στις εκμεταλλεύσεις σαλιγκαριών είναι και πάλι διαφορετική (Guiller 2012, Guiller 2001). Είναι επίσης προβληματικό ότι υπήρχε προηγούμενη χρήση του ονόματος *Cornu aspersa maxima* που δεν είχε σχέση με την Αλγερία (Bezemer 2001).



Εικόνα 7. *Cornu aspersum maximum* (Paul Starosta photographe naturaliste | Terrestres)

1.2. Φυλογεωγραφία

Ο στόχος της φυλογεωγραφίας είναι να εξηγήσει τη χωρική κατανομή των γενετικών γραμμών εντός των ειδών και να αναδείξει τους πιο σημαντικούς ιστορικούς παράγοντες που εξηγούν την κατανομή τους (Avisé 1987). Οι υποθέσεις που προωθούνται

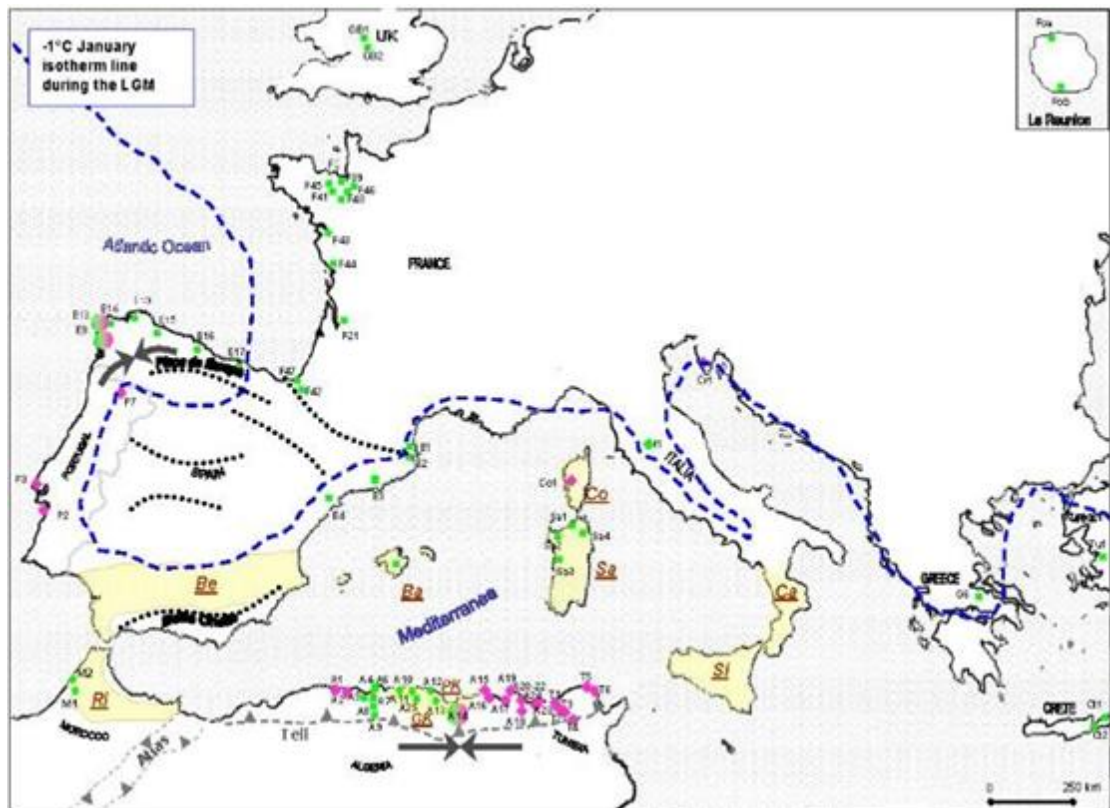
συνήθως στη φυλογεωγραφία είναι εγγενείς σε συμβάντα διασποράς και αντικαταστάσεως, συμπεράσματα για τα οποία συνήθως βασίζονται σε εκτιμήσεις της γενετικής ποικιλότητας, του χρόνου απόκλισης και του δημογραφικού ιστορικού (Dawson 2004). Τα συμπεράσματα σχετικά με τις δημογραφικές διαδικασίες έχουν γίνει ιδιαίτερα μια κεντρική πρόκληση στη φυλογεωγραφία και η πρόσφατη ανάπτυξη αναλυτικών εργαλείων που βασίζονται στη θεωρία συγχώνευσης είναι πολύ χρήσιμη για τη διερεύνηση της δημογραφικής ιστορίας των πληθυσμών. Από τις πληροφορίες που παρέχονται από τα φυλογενετικά δέντρα, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η δημογραφική διαδικασία που έχει συμβεί και να εκτιμηθούν οι σχετικές παράμετροι (Emerson 2001).

Η ενασχόληση με τη φυλογεωγραφία και τη δημογραφία σε πολλά είδη ασπόνδυλων και σπονδυλωτών υπογραμμίζει τη σημασία του συνδυασμού των στοιχείων της γενεαλογίας και του πληθυσμού για την αποκάλυψη βιογεωγραφικών ιστοριών. Επιπλέον, η σύγκριση των φυλογεωγραφικών δομών μεταξύ των συν-κατανεμημένων ταξινομικών κατηγοριών επιτρέπει την εύρεση συμβατών καταταμίσεων και την εξαγωγή κοινού ιστορικού παραγόντων απόκλισης και αποικισμού. Στη συνέχεια, στη Βόρεια Αμερική (για ανασκόπηση Avise 1994) όπως και στην Ευρώπη (Taberlet 1998), διάφορα είδη έχουν μελετηθεί για τον προσδιορισμό των κλιματικών και γεωλογικών επιπτώσεων στα φυλογεωγραφικά πρότυπα και τις δομές του πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα στην Ευρώπη, η λεκάνη της Μεσογείου που χαρακτηρίζεται από εξαιρετικό επίπεδο βιοποικιλότητας και σύνθετη γεωλογική ιστορία (Blondel 1999), έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικών μελετών που διεξάγονται για τη γενετική ποικιλότητα και τη φυλογεωγραφία. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες παρέχουν πληροφορίες για την εξελικτική ιστορία των ειδών της Νότιας Ευρώπης. Παρά τη βασική του θέση μεταξύ της υπόλοιπης ηπείρου και της Ευρώπης, μόνο λίγες περιπτώσεις αφορούν το

έδαφος της Βόρειας Αφρικής. Επιπλέον, οι έρευνες συμπεριλαμβανομένων των συνόλων δεδομένων της Αλγερίας είναι σχετικά σπάνιες και η κύρια ιστορική διαδικασία που επηρεάζει τη διαφοροποίηση βρίσκεται γενικά στις κλιματικές ταλαντώσεις του Τεταρτογενούς, πράγμα που σημαίνει ότι λίγες μελέτες υποδηλώνουν γεγονότα που συνέβησαν σε χρόνους πολύ μεγαλύτερους από την τελευταία παγετώδη περίοδο.

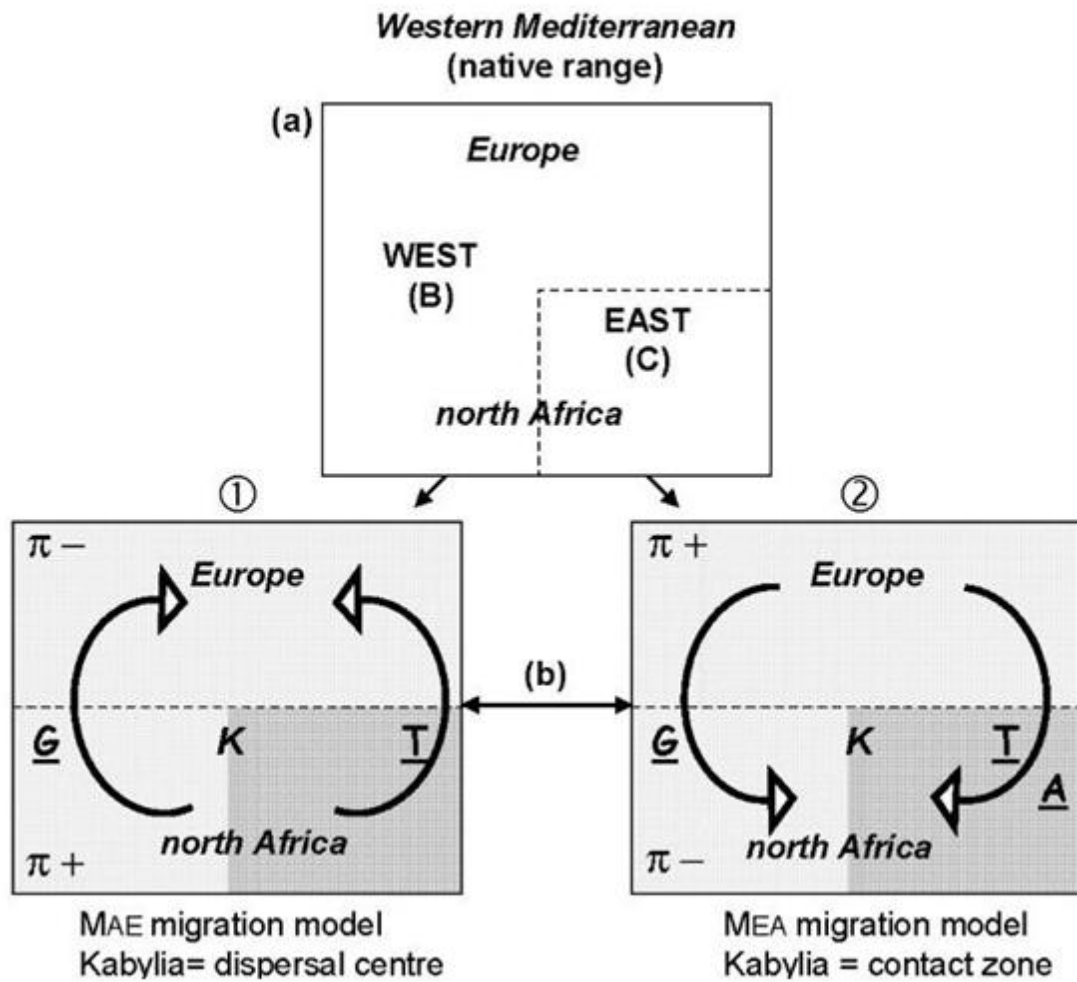
Ανάμεσα στα λίγα είδη που ελήφθησαν ευρέως δείγματα στη βόρεια Αφρική (δηλαδή σε όλη τη βόρεια επικράτεια από το δυτικό Μαρόκο έως την ανατολική Τυνησία) για τη μελέτη ιστορικών διεργασιών που επηρεάζουν την τρέχουσα κατανομή τους, το μαλάκιο *Cornu aspersum* (=συν. *Helix aspersa*) παρέχει ένα εξαιρετικό βιολογικό μοντέλο για κατανόηση στα φυλογεωγραφικά μοτίβα σε όλη τη βόρεια Αφρική και τις γύρω περιοχές της λεκάνης της Δυτικής Μεσογείου και αξιολογούν υποθέσεις που οδηγούν σε διαφοροποίηση του πληθυσμού. Αυτό το χερσαίο σαλιγκάρι, παλαιότερα γνωστό ως *Helix aspersa Müller, 1774*, προέρχεται από χώρες της Μεσογείου. Περιλαμβάνει ένα σύνολο βορειοαφρικανικών ενδημικών μορφών και υποειδών που περιεγράφηκαν στις αρχές του 20ου αιώνα με βάση τα χαρακτηριστικά του κελύφους (Guiller 1994). Το πιο συνηθισμένο, *C. a. aspersum* (συν. *H. a. aspersa*), έχει γίνει πολύ άφθονο λόγω της ανθρώπινης παρέμβασης και δραστηριότητας σε περιοχές με μεσογειακό, εύκρατο και ακόμη και υποτροπικό κλίμα. Για την αναδόμηση της βιογεωγραφικής ιστορίας αυτής της επεμβατικής μορφής στη δυτική Μεσόγειο, η διακύμανση των χωρικών μοτίβων του κελύφους, των γεννητικών οργάνων και των μοριακών χαρακτήρων είχε εκτιμηθεί προηγουμένως με τη διερεύνηση περισσότερων από εκατοντάδων πληθυσμών αντιπροσωπευτικών της περιοχής στην δυτική Μεσόγειο και Ευρωπαϊκή ακτογραμμή (Εικόνα 8). Σχεδόν όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για γενετικά, μορφολογικά και μορφομετρικά χαρακτηριστικά (Guiller 1994), ενώ μόνο οι πληθυσμοί της Βόρειας

Αφρικής αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας μέρος του DNA της μεγάλης υπομονάδας των μιτοχονδρίων (16S rRNA) (Guiller 2001). Όποιο κι αν είναι το σύνολο των πληθυσμών και/ή των δεικτών που χρησιμοποιούνται, ο συνδυασμός όλων των διαφορετικών τύπων δεδομένων οδηγεί σε ένα σαφές μοτίβο στη γεωγραφική δομή. Πράγματι, (i) δύο ανατομικά και βιοχημικά αποκλίνουσες ομάδες πληθυσμών (Δύση έναντι Ανατολής) μεταξύ των οποίων ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα στην Καβυλία (Αλγερία) παρατηρείται πάντα σε όλη την παράκτια περιοχή της Βόρειας Αφρικής. (ii) σχεδόν όλοι οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί συγκεντρώθηκαν με πληθυσμούς της δυτικής βόρειας Αφρικής, με μικρότερες γενετικές αποστάσεις από αυτές μεταξύ της δυτικής και της ανατολικής βόρειας Αφρικής (Εικόνα 9), (Guiller 2006, Madec 2003).



Εικόνα 8. Τοποθεσίες δειγματοληψίας του *C. aspersum* σε όλη τη λεκάνη της δυτικής Μεσογείου. Οι αριθμοί πληθυσμού είναι αυτοί που δίνονται στο πρόσθετο αρχείο

1. Τα σύμβολα και τα χρώματα δειγμάτων τοποθεσίας υποδεικνύουν τη γενεαλογία mtDNA του πληθυσμού: ροζ για τον ανατολικό τύπο, πράσινο για τον δυτικό τύπο (συμπεριλαμβανομένου του Z). Οι γκρίζες περιοχές αντιπροσωπεύουν μικροπλάκες που παρασύρονται από το Ολιγόκαινο: GK: Great Kabylia, PK: Lesser Kabylia, Ri: Rif Cordillera, Be: Betic range, Ba: Balearic Islands, Sa: Sardinia, Co: Corsica, Si: Sicilia, Ca: Calabria. Η διακεκομμένη γραμμή σε όλη την Ευρώπη δείχνει την ισοθερμική γραμμή του Ιανουαρίου -1°C κατά τη διάρκεια του LGM (Jakob SS, 2007). Οι διακεκομμένες καμπύλες στην Ιβηρία αντιπροσωπεύουν επτά υποτιθέμενες επίγειες καταφύγιες (Gómez A, 2007). Αναφέρονται επίσης πιθανά γεωγραφικά εμπόδια (λεκάνη του ποταμού Moulouya, χερσόνησος Edough, σύστημα Atlas and Tell) και ζώνες επαφής (μαύρα βέλη σε αντίθετη κατεύθυνση στην Καβυλία, τη Γαλικία και την Ιταλία).



Εικόνα 9. Εναλλακτικές βιογεωγραφικές υποθέσεις για την τρέχουσα κατανομή του *C. aspersum* στη Δυτική Μεσόγειο και συνέπειες όσον αφορά τη χωρική διαφοροποίηση και τη γενετική ποικιλότητα. (α) σχηματική αναπαράσταση των γενεαλογιών Δυτικής (B) και Ανατολής (C) που ορίζονται στην εγγενή περιοχή του είδους, (β) διαδρομές αποικισμού που ακολουθούν τα δύο μοντέλα μετανάστευσης που δοκιμάστηκαν (μοντέλο 1 ή MAE: μετανάστευση από τη βόρεια Αφρική στην Ευρώπη, μοντέλο 2 ή MEA: μετανάστευση από την Ευρώπη στη βόρεια Αφρική) (K: Καβύλια, A: οδός του Αιγαίου, Z: Στενό του Γιβραλτάρ, T: Τυρρηνική οδός, π: γενετική ποικιλότητα).

1.3. Πολυμορφισμός

Το είδος αυτό εμφανίζει χαρακτηριστικό πολυμορφισμό. Συνήθως, είναι κιτρινοκαστανό και παρεμβάλλονται σκούρες ζωνώσεις που ποικίλουν σε αριθμό και πλάτος (Madec et al. 2003, Malandrakis et al. 2007). Επίσης, το χρώμα, το μέγεθος και το πάχος του κελύφους ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία του ζώου και το περιβάλλον.

Η βασική λειτουργία του κελύφους είναι η προστασία του ζώου από περιβαλλοντικές αλλαγές, ιδιαίτερα από την απώλεια νερού ενώ συμμετέχει και στον μεταβολισμό του ασβεστίου. Είναι σχετικά εύθραυστο αλλά διαθέτει την πολύ σημαντική ικανότητα της αναγέννησης, η οποία πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ταχύτητα στην περιφέρεια παρά στο εσωτερικό του κελύφους και εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, συγκέντρωση ασβεστίου κ.ά.) (Durning 1957). Το σώμα του είναι, συνήθως, γκρι αλλά ποικίλει ανάλογα με τη τροφή του που μπορεί να το κάνει άσπρο αν έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε ασβέστιο ή γκριζό κόκκινο αν περιέχει καροτενοειδή.

1.4. Εξάπλωση

Οι περιοχές εξάπλωσης των φυσικών πληθυσμών του *Cornu aspersum* στη χώρα μας εκτείνεται 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 της θερινής νάρκης, της χειμερινής νάρκης 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.

Το *Cornu aspersum* 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, (LazaridouDimitriadou et al., 1993) .

Θεωρείται είδος μεσογειακής καταγωγής το οποίο, με τη βοήθεια του ανθρώπου, έχει διασπαρθεί 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).

1.5. Μοριακοί Δείκτες

Με την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας των τελευταίων ετών και κυρίως έπειτα από τη μελέτη και τις περιγραφές των Watson και Crick (1953) για την ελικοειδή μορφή του μορίου του DNA, η οποία οριοθέτησε μια νέα εποχή στην κατανόηση και μελέτη των βιολογικών επιστημών και καθόρισε μια νέα οδό ανάπτυξης και εφαρμογής βιολογικών και μοριακών ανακαλύψεων και επιτευγμάτων. Οι επιστήμονες γνωρίζοντας τη μοριακή δομή του κληρονομικού μορίου μπορούν πλέον να διαχειριστούν και να αποσαφηνίσουν τις λειτουργίες και τις διεργασίες του DNA.

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες.

1. Δείκτες DNA που βασίζονται σε υβριδισμό: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) και το αποτύπωμα ολιγονουκλεοτιδίων (oligonucleotide fingerprinting).

2. Δείκτες DNA που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι δείκτες RAPDs (random amplified polymorphic DNAs), οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν σε SCAPs (sequence characterized amplified regions), σε SSRs (simple sequence repeats), ή σε μικροδορυφόρους (microsatellites), σε SST (sequence-tagged sites), σε AFLPs (amplified fragment length polymorphisms), σε ISA (inter-simple sequence repeat amplification), σε CAPs (cleaved amplified polymorphic sequences) και σε ALPs (amplicon length polymorphisms).

3. Δείκτες DNA που βασίζονται σε μικρά αλληλουχημένα τμήματα: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι δείκτες πολυμορφισμού απλού νουκλεοτιδίου (SNPs, single nucleotide polymorphisms).

Γενετικοί δείκτες

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες γενετικών δεικτών:

- (a) Μορφολογικοί δείκτες (φαινοτυπικά γνωρίσματα)
- (b) Δείκτες βασισμένοι σε πρωτεΐνες (Ισοένζυμα-αλλοένζυμα)
- (c) DNA δείκτες

Για να χαρακτηριστεί ένας δείκτης ως γενετικός δείκτης (genetic marker), θα πρέπει να δείχνει πολυμορφισμό μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Ο γενετικός δείκτης είναι οποιοδήποτε ζεύγος αλληλομόρφων που η κληρονομικότητα τους καθορίζεται από το είδος της διασταύρωσης. Ένας DNA δείκτης είναι τυπικά μια μικρή περιοχή του DNA

που δείχνει μια πολυμορφική αλληλουχία διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους. Οι τεχνικές του υβριδισμού και της ενίσχυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώρισή τους. Η χρήση των ενζύμων και των πρωτεϊνών παραμένει ο κυρίαρχος τρόπος μελέτης γενετικής ποικιλομορφίας και γενετικής δομής πληθυσμών. Συνιστά, επίσης, παραμέτρους όπως ο βαθμός ετεροζυγωτίας, ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θώκων και μέσο αριθμό αλληλομόρφων ανά γονιδιακό θώκο. Τα βασικά χαρακτηριστικά της μεθοδολογίας με τη χρήση ενζύμων και πρωτεϊνών είναι:

- Γρήγορη ανάλυση δειγμάτων και χαμηλό κόστος των χημικών ουσιών που απαιτούνται.
- Δεδομένα εκατοντάδων ατόμων αναλύονται σε μικρό χρονικό διάστημα.
- Ο απαιτούμενος εξοπλισμός είναι απλός και η μεθοδολογία απλή και εύκολη στη χρήση.

1.6. Ο σκοπός της διατριβής

Με την μελέτη των μορφομετρικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων και με γενετικές αναλύσεις στο εργαστήριο αποσκοπούμε να κρίνουμε πως εξαπλώθηκε το άγριο είδος *Cornu aspersum* στην λεκάνη της ανατολικής μεσογείου συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας και διατριβές άλλων παρόμοιων ερευνών.

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).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Περιοχές δειγματοληψίας και συλλογής

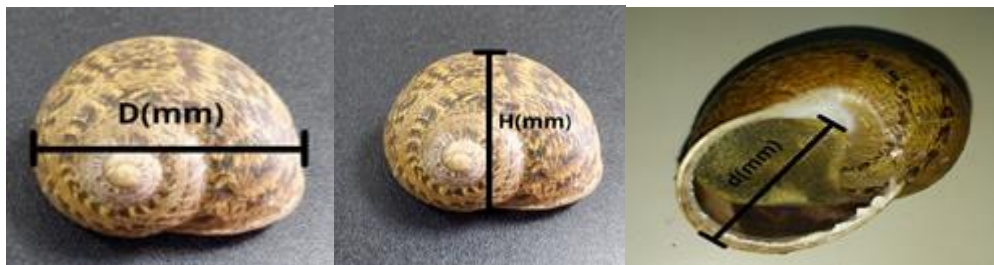
Στην δειγματοληψία συλλέχθηκαν άγριοι πληθυσμοί *Cornu aspersum* από την Δυτική Ελλάδα την περίοδο του καλοκαιριού του 2018. Αναλυτικότερα συλλέχθηκαν 30 δείγματα από την Άρτα με ονομασία WR (West aRta) και 36 δείγματα από το Αγρίνιο με ονομασία WG (West aGrinio)(Εικόνα 10). Έπειτα μεταφέρθηκαν στο πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Γεωπονίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος και διατηρήθηκαν στο εργαστήριο Ζωολογίας.



Εικόνα 10. Τόποι συλλογής δειγμάτων

2.2. Μορφολογική Ανάλυση

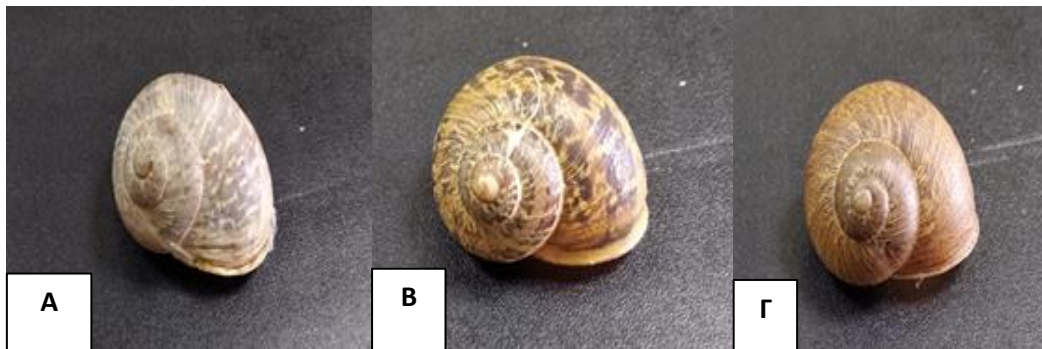
Τα δείγματα πρώτα μελετήθηκαν μορφολογικά στο εργαστήριο ζωολογίας. Υπολογίστηκαν με την χρήση ψηφιακού παχύμετρου τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και με ζυγαριά ακριβείας το ολικό βάρος και τα σπλάχνα του σαλιγκαριού. Καταγράφηκαν το ολικό βάρος σε g ($W_{ολ}$), το βάρος των σπλάχνων σε g ($W_{σπλ}$), η διάμετρος του κελύφους σε mm (D), το ύψος του κελύφους σε mm (H) και η διάμετρος του στόμιού σε mm (d). Ο τρόπος που διεξάχθηκαν οι μετρήσεις απεικονίζονται στην (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Απεικονίσεις μεθοδολογίας μετρήσεων. Εικόνα Α. διάμετρος κελύφους $D(\text{mm})$, Εικόνα Β. ύψος κελύφους $H(\text{mm})$, Εικόνα Γ. διάμετρος στομίου $d(\text{mm})$.

Για την καταγραφή των δεδομένων για μεγαλύτερη ακρίβεια βγάλαμε διάφορες κατηγορίες μορφομετρικών χαρακτηριστικών από προηγούμενες παρατηρήσεις. Για το υπόβαθρο, αναλόγως την εντονότητα του χρώματος, είναι Brown(B), Red(R), Yellow(Y) και White(W)(Εικόνα 12). Αν ήταν Ενήλικο ή Ανήλικο (E ή A αντίστοιχα), παρατηρώντας αν το στόμιο έχει αρχίσει να γυρνάει εξωτερικά. Για τον καλύτερο διαχωρισμό του κελύφους, σημειώθηκαν το χρώμα των ζωνών (αν ήταν ανοιχτόχρωμες light (L) και σκουρόχρωμες dark (D) και ο αριθμός των ζωνών που απαριθμούσαν από 0-5. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και το διάστικτο στο κέλυφος και καταγράφηκε υπόψη σε τρεις κατηγορίες

από 0-Σχεδόν ανύπαρκτο, 1- Λίγο διάσπαρτο και 2- Συνεχές. Για τον μανδύα, ανάλογα την εντονότητα του χρώματος καταγράφηκε σε ανοιχτό/light(L) και σκουρόχρωμο/dark(D) και το χρώμα του ποδιού σε τρεις κατηγορίες σε μαύρο/dark(D), σε γκρι/grey(G) και σε ανοιχτόχρωμο/light(L). Τέλος, καταγράφηκε αν το σαλιγκάρι υπέστη ανάπλαση και αποχρωματισμός.



Εικόνα 12. Απεικόνιση δειγμάτων για την λήψη του Υπόβαθρου: Α. Κενό (Για δείγματα που δεν μπορούσαν να διακριθεί το υπόβαθρο), Β. Yellow (Για δείγματα που το υπόβαθρο τους ήτανε πιο ανοικτό από το καφέ), Γ. Brown (Για δείγματα που το υπόβαθρο τους ήτανε καφέ.)

Στην πορεία, ανοίχτηκε το κέλυφος και διαχωρίστηκε το πόδι από τα σπλάχνα, που αποθηκεύτηκαν σε σακουλάκια. Όλοι η διαδικασία έγινε εντός του εργαστηρίου της Ζωολογίας, με τη χρήση ψαλίδιου και λαβίδας για την αποκελύφωση και με νυστέρι για να αποκοπεί το πόδι από το σπλάχνα. Κάθε φορά πριν την χρήση των οργάνων, η αποστείρωση γινόταν με 70% αιθανόλη. Για την ανάλυση του ιστού, αποκοπτόταν ένα μικρό κομμάτι από το πόδι, μέγεθος περίπου 1-2 mm, και τοποθετήθηκε σε erpendorf, γεμισμένο με αιθανόλη και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη.

2.3. Απομόνωση DNA

Ακολούθησε μελέτη του πολυμορφισμού με μοριακούς δείκτες εξετάζοντας έξι μικροδορυφορικούς τόπους (Ha5, Ha6, Ha8, Ha9, Ha10 και Ha11) τους οποίους μελέτησαν και οι Guiller *et al.* (1994) στο είδος *C. aspersum*.

Η ληφθείσα ποσότητα μυικού ιστού τεμαχίστηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού σε μικρότερα κομμάτια και τοποθετήθηκε σε πλαστικό φιαλίδιο erpendorf 1,5 ml. Στο erpendorf με το κάθε δείγμα προστέθηκαν περίπου 500μL αλκοόλη και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον καταψύκτη στους -25°C μέχρι την εξαγωγή DNA.

Ο πολλαπλασιασμός του τμήματος αυτού πραγματοποιήθηκε σε αντιδράσεις τελικού όγκου 15 μl, σε καθεμιά από τις οποίες περιέχονταν περίπου 20-30 ng DNA, 1 μονάδα Taq DNA Πολυμεράσης (KAPA2G Multiplex Mastermix, KAPA BIOSYSTEMS), 1,5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης (Taq DNA polymerase buffer), 1 μl MgCl₂ αρχικής συγκέντρωσης 25 mM, 0.2 mM από το κάθε dNTP και 3 pmol από τον κάθε εκκινητή. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή TaKaRa και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν είχαν ως εξής:

- α) μετά από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 3 λεπτά
- β) ακολούθησαν 30 κύκλοι από:
 - i) 1 λεπτό στους 94°C,
 - ii) 50'' στους 54°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και
 - iii) 50'' στους 72°C για τη βέλτιστη λειτουργία του ενζύμου και την επιμήκυνση των προϊόντων
- γ) 8 λεπτά στους 72°C ως ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης.

2.4.Ηλεκτροφόρηση

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και παρατήρηση σε υπεριώδες φως. Για την ανίχνευση της ποιότητας και της ποσότητας του απομονωμένου DNA των δειγμάτων εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 1,2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1%. Το διάλυμα του TAE 1% αραιωνόταν από ένα stock buffer TAE 50% (242 g Tris-HCl, 57 ml Acetic Acid, 0,05 M EDTA pH 8).

2.4.1.Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Για την πηκτή της αγαρόζης χρησιμοποιούνταν 0,72 g στερεής αγαρόζης, προστέθηκαν 60 ml διαλύματος TAE 1% και έπειτα ακολουθούσε η διάλυση της αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά στους 90° C. Αμέσως μετά, και αφού η κωνική φιάλη διαβρέχονταν με κρύο νερό έτσι ώστε η θερμοκρασία του διαλύματος να κατέβει περίπου στους 40-50° C, προθέτονταν 2,5 ml Midori green και ανακινούνταν ελαφρά για την καλύτερη κατανομή του σε όλο το μίγμα. Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετούνταν σε τετράγωνο Plexiglas (tray) 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). Το κάθε «χτενάκι» δημιουργούσε 12 πηγάδια. Μετά την πάροδο 20 λεπτών, η πηκτή είχε δημιουργηθεί και μετά την αφαίρεση των χτενιών υπήρχαν και οι μορφοποιημένες θέσεις.

Η γονοτύπηση των μικροδορυφορικών τόπων και αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση πολυμορφισμού μήκους (fragment analysis) με τη χρήση αυτόματου αναλυτή αλληλουχιών ABI3500 Genetic Analyzer.

Η γονοτύπηση των μικροδορυφορικών τόπων και αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση πολυμορφισμού μήκους (fragment analysis) με τη χρήση αυτόματου αναλυτή αλληλουχιών ABI3500 Genetic Analyzer.

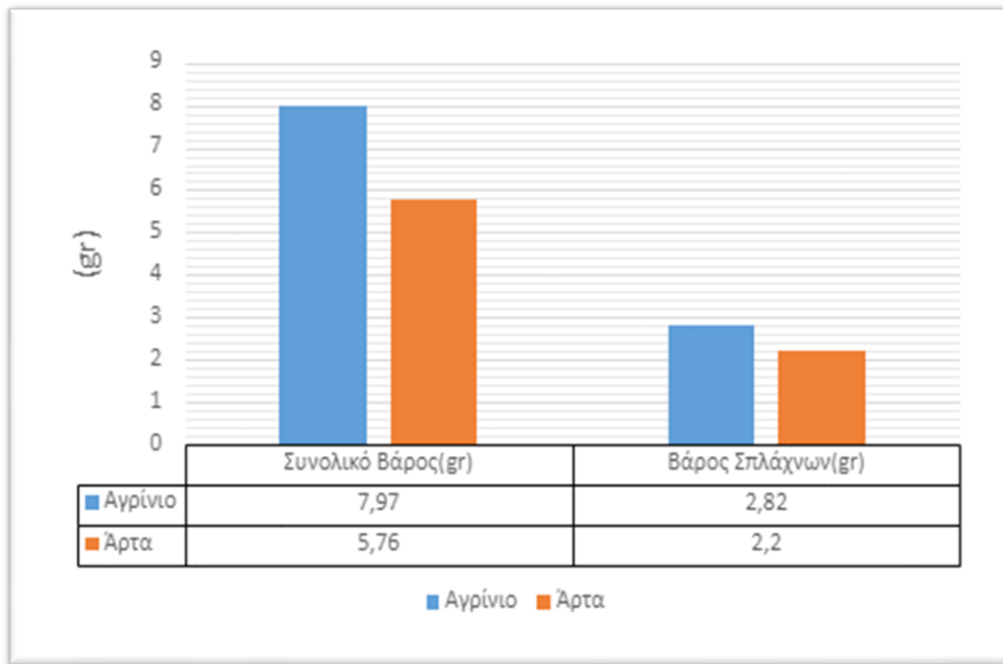
2.5 Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Genetix 4.0.5.2. με το οποίο υπολογίστηκε ο δείκτης ομομιξίας (F_{IS}) και έγινε μετατροπή των δεδομένων σε κατάλληλη μορφή για το GENEPOP. Η αναμενόμενη (H_{EXP}) και παρατηρούμενη (H_{OBS}) ετεροζυγωτία κατά Hardy Weinberg, υπολογίστηκαν με το λογισμικό πακέτο GenePop 3.4 (Raymond and Rousset, 1995). Χρησιμοποιώντας το λογισμικό IR-macro, εκτιμήθηκαν η εσωτερική συγγένεια (IR) και η ομοζυγωτία ανά τόπο (HL) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους για 24 δείγματα από τον πληθυσμό «Άρτα» και για 29 δείγματα από τον πληθυσμό «Αγρίνιο».

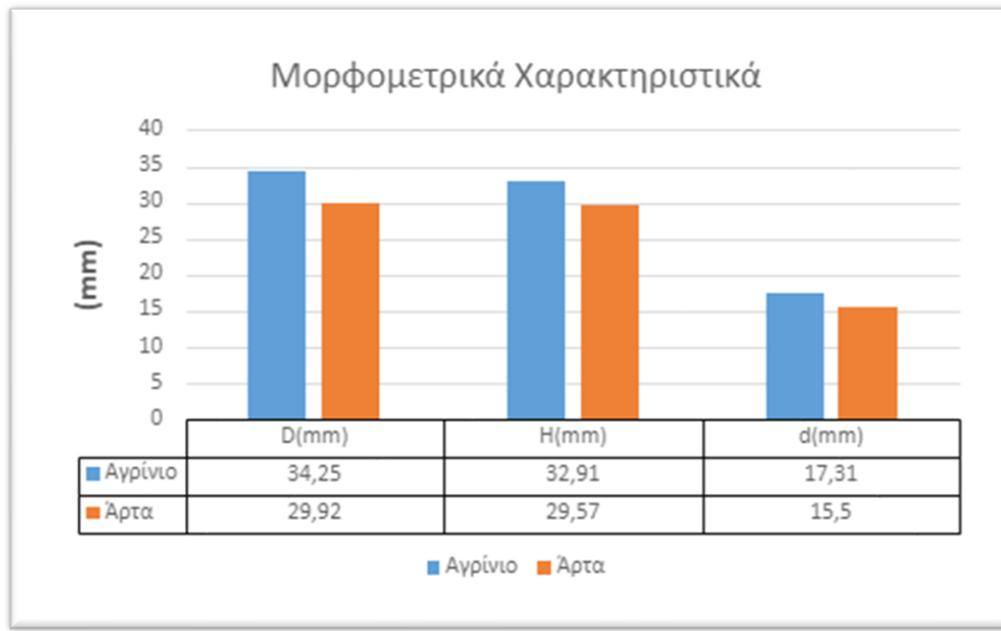
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μορφομετρικά Χαρακτηριστικά

Ο πληθυσμός του Αγρινίου με 36 δείγματα δείχνει, τον μέσο όρο του ολικού βάρους είναι 7,97 gr και το μέσο βάρος των σπλάχνων είναι 2,82gr. Αντίστοιχα στον πληθυσμό της Άρτας με 30 δείγματα βλέπουμε ότι ο μέσος όρος του ολικού βάρους είναι 5,76gr και των σπλάχνων 2,20gr (Εικόνα 13). Επιπλέον υπολογίστηκε η διάμετρος (D), το ύψος (H) και η διάμετρος του στόμιού (d) των δειγμάτων. Η μέση διάμετρος για το Αγρίνιο βρέθηκε στα 34,25mm, μέσο ύψος 32,91mm και μέση διάμετρος του στόμιού 17,31mm. Η μέση διάμετρος για την Άρτα βρέθηκε στα 29,92mm, μέσο ύψος 29,57mm και μέση διάμετρος του στόμιού 15,50mm (Εικόνα 14).

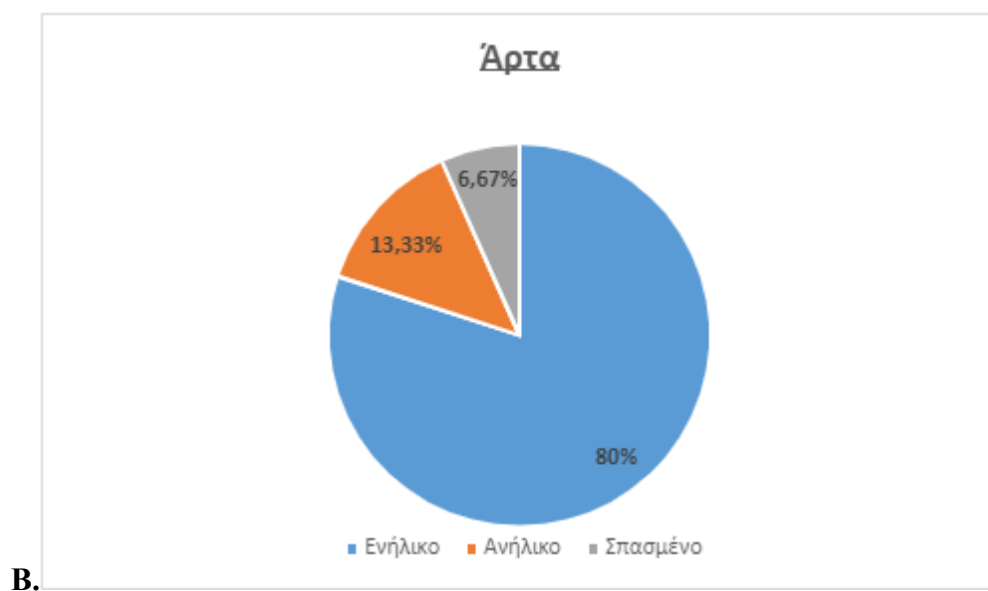
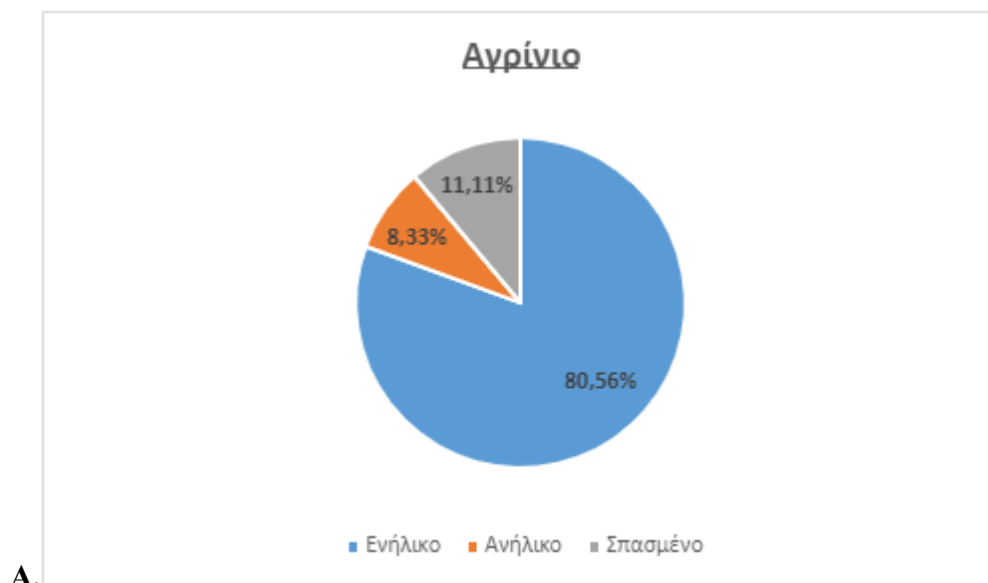


Εικόνα 13. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα των μέσων τιμών του ολικού βάρους και το βάρος των σπλάχνων της κάθε περιοχής Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.



Εικόνα 14. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα των μέσων τιμών της διαμέτρου (D), του ύψους (H) και της διαμέτρου του στόμιού (d) της κάθε περιοχής Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.

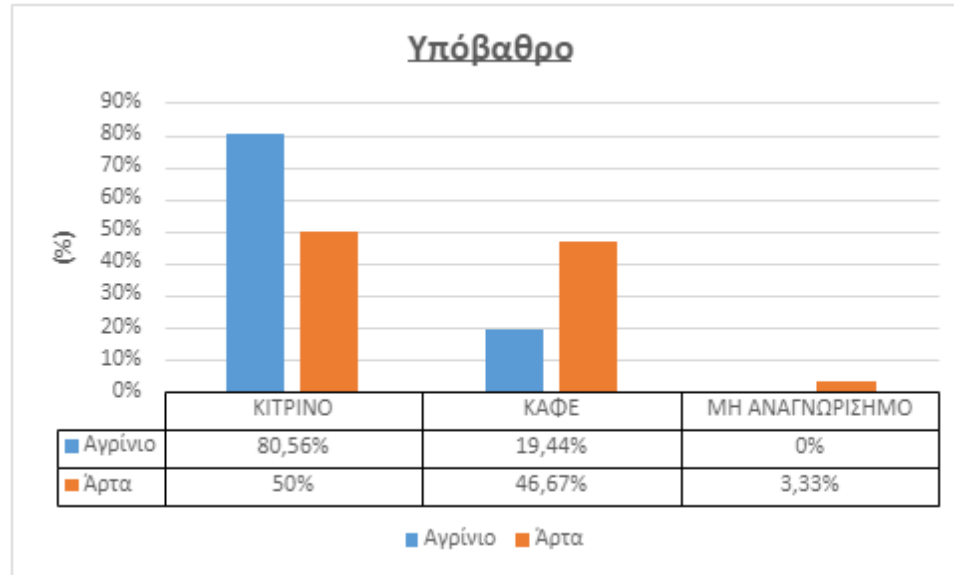
Υπολογίστηκαν επιπλέον παράμετροι στα μορφολογικά του σαλιγκαριού. Για το Αγρίνιο το ποσοστό των ενήλικων δειγμάτων ήταν 80,56%, των ανήλικων 8,33% και το 11,11% ήταν είναι μη μετρήσιμο λόγο ότι δεν μπορούσε να αναγνωριστεί η ωριμότητα του σαλιγκαριού επειδή ήταν σπασμένο(Εικόνα 15.A). Αντίστοιχα στην Άρτα τα ενήλικα ήταν το 80%, τα ανήλικα 13,3% και τα μη αναγνωρίσιμα το 6,67% (Εικόνα 15.B).



Εικόνα 15. Απεικόνιση σε μορφή pie chart το ποσοστό της ωριμότητας των σαλιγκαριών στο Αγρίνιο στο Α με 36 δείγματα και Άρτας το Β με 30 δείγματα.

Επιπλέον μορφομετρικά που μετρήθηκαν είναι το υπόβαθρο που στους πληθυσμούς του Αγρινίου βρέθηκε ότι το 80,5% ήτανε κιτρινωπό και το υπόλοιπο 19,5%

ήτανε καφέ. Στην Άρτα το 50% ήτανε κιτρινωπό, το 46,67% ήτανε καφέ και ένα δείγμα δεν μπορούσε να αναγνωρισθεί το υπόβαθρο του(Εικόνα 16).

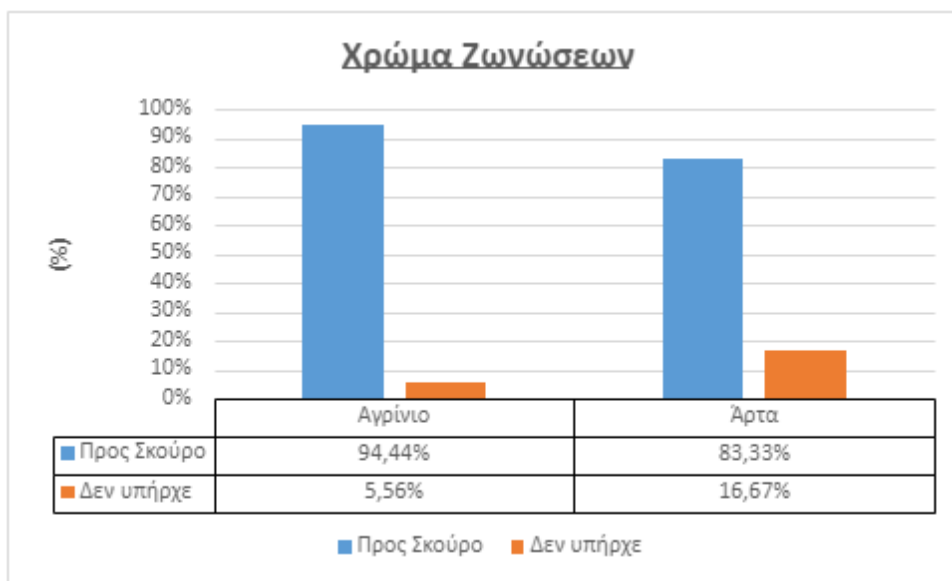


Εικόνα 16. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα το υπόβαθρο των σαλιγκαριών ανάμεσα στους δυο τόπους δειγματοληψίας Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.

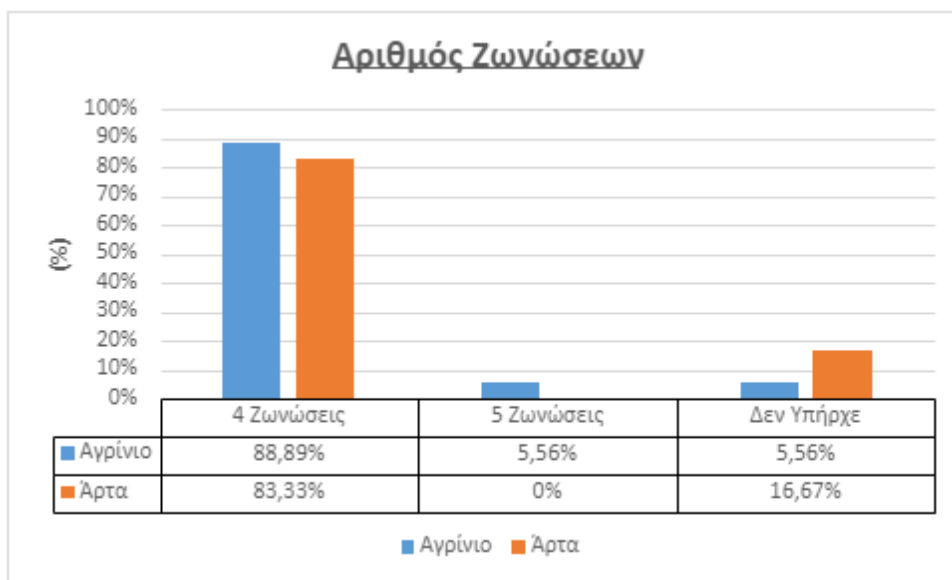
Οι υπόλοιπες μετρήσεις για το Αγρίνιο περιλαμβάνουν το χρώμα των ζωνώσεων που το 94,44% τείνουν προς το σκούρο και το 5,56% δεν υπήρχαν (Εικόνα 17). Το ποσοστό στις 4 ζωνώσεις ήταν 88,89%, στις 5 ήταν 5,56% και στο 5,56% των δειγμάτων δεν υπήρχε (Εικόνα 18). Στα δείγματα βρέθηκε ότι το διάστικτο στο 47,22% των περιπτώσεων ήτανε λίγο διάσπαρτες, στο 8,33% ήτανε συνεχείς και 36,11% ήτανε σχεδόν ανύπαρκτες, ενώ σε 2 δείγματα δεν μπορούσε να αναγνωρισθεί (Εικόνα 19). Μελετήθηκαν επίσης οι αποχρώσεις του ποδιού που ήτανε μαύρο στο 2,78% των δειγμάτων, γκρι στο 61,11% και ανοιχτόχρωμο 30,56%(Εικόνα 22). Επιπλέον χαρακτηρίστηκε και ο μανδύας που ήτανε ανοιχτόχρωμο προς κίτρινο 47,22% και προς γκρι στο 52,78% των

περιπτώσεων(Εικόνα 23). Χαρακτηρίστηκε επίσης πόσο αποχρωματισμένος ήταν ο μανδύας με το 83,33% να μην είναι και το 16,67% να είναι σχετικά αποχρωματισμένο (Εικόνα 20). Τέλος, είδαμε αν είναι αναπλασμένο το σαλιγκάρι με κανένα δείγμα του Αγρινίου να παρουσιάζει ανάπλαση (Εικόνα 21).

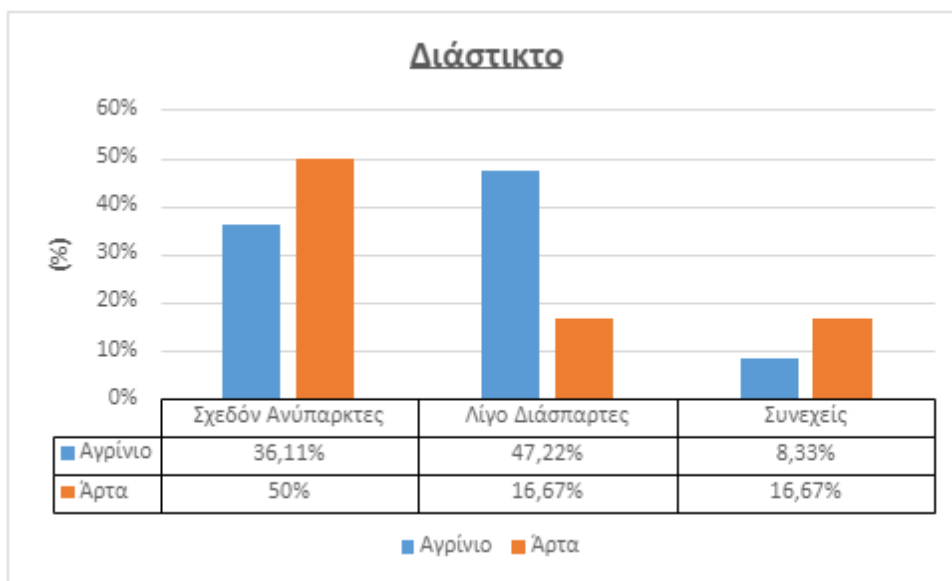
Για τις μετρήσεις της Άρτας περιλαμβάνουν το χρώμα των ζωνώσεων που το 83,33% τείνουν προς το σκούρο και το 16,67% δεν υπήρχαν (Εικόνα 17). Το ποσοστό στις 4 ζωνώσεις ήταν 83,33%, και στο 16,67% των δειγμάτων δεν υπήρχε (Εικόνα 18). Στα δείγματα βρέθηκε ότι το διάστικτο στο 16,67% των περιπτώσεων ήτανε λίγο διάσπαρτες, στο 16,67% ήτανε συνεχείς και στο 50% ήτανε σχεδόν ανύπαρκτες, ενώ σε 5 δείγματα δεν μπορούσε να αναγνωρισθεί (Εικόνα 19). Μελετήθηκαν επίσης οι αποχρώσεις του ποδιού που ήτανε μαύρο στο 23,33% των δειγμάτων, γκρι στο 70% και ανοιχτόχρωμο 6,67% (Εικόνα 22). Επιπλέον χαρακτηρίστηκε και ο μανδύας που ήτανε ανοιχτόχρωμο προς κίτρινο 70% και προς γκρι στο 30% των περιπτώσεων (Εικόνα 23). Χαρακτηρίστηκε επίσης πόσο αποχρωματισμένος ήταν ο μανδύας με το 60% να μην είναι και το 36,67% να είναι σχετικά αποχρωματισμένο και το 3,33% είναι πάρα πολύ (Εικόνα 20). Τέλος, είδαμε αν είναι αναπλασμένο το σαλιγκάρι με το 86,67% να μην παρουσιάζει ανάπλαση και το 13,33% να παρουσιάζει κάποια μορφή ανάπλασης (Εικόνα 21).



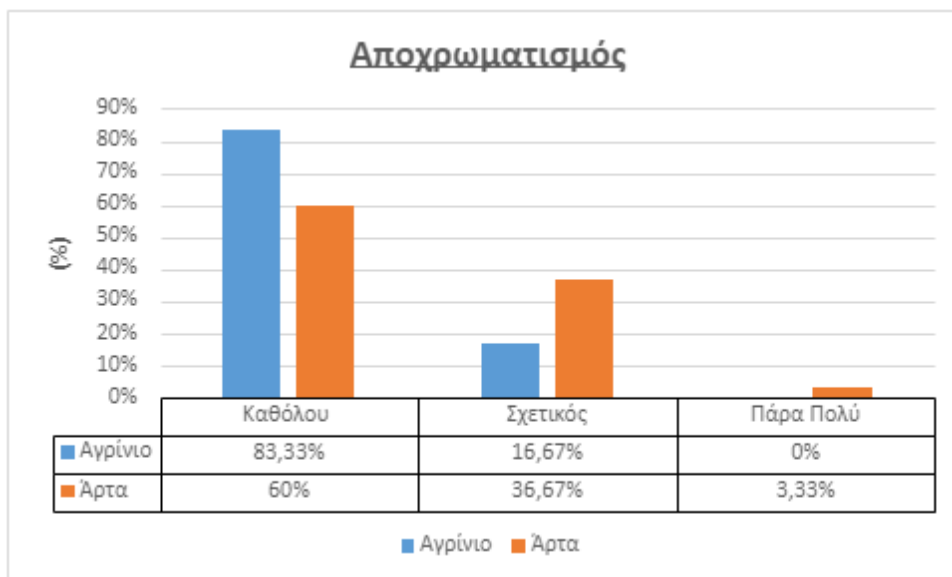
Εικόνα 17. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα το ποσοστό το χρώμα των ζωνώσεων των σαλιγκαριών του Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.



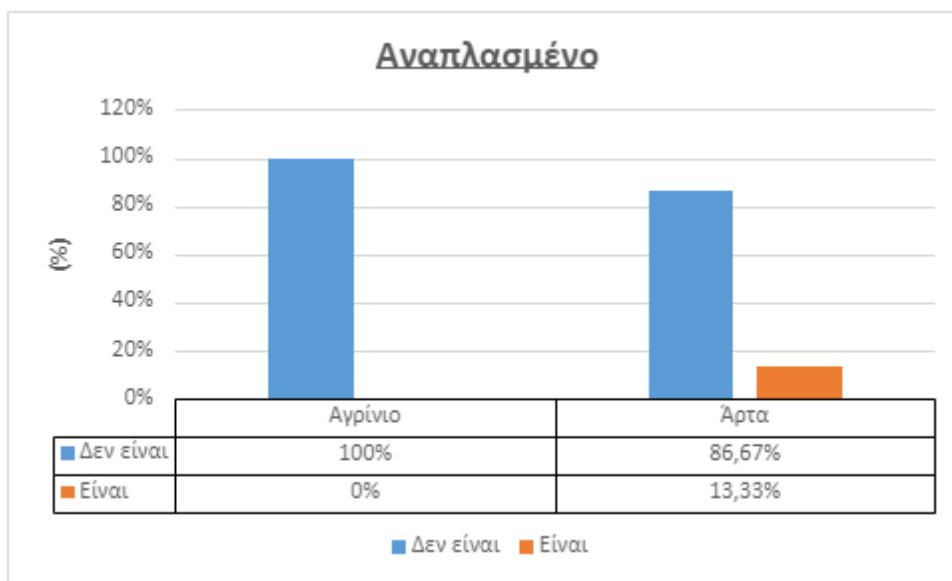
Εικόνα 18. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα το ποσοστό τον αριθμό των ζωνώσεων των σαλιγκαριών του Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.



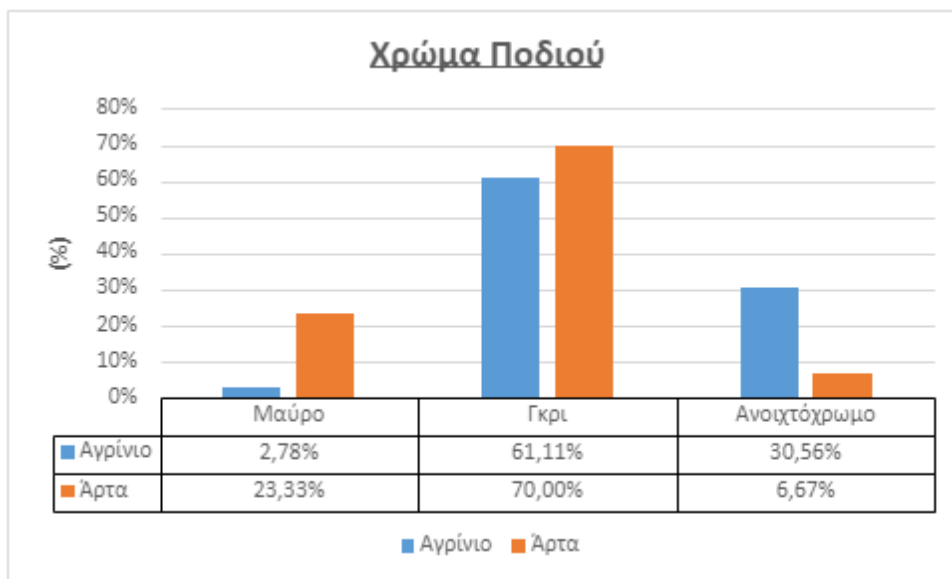
Εικόνα 19. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα το ποσοστό του διάστικτου των σαλιγκαριών του Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.



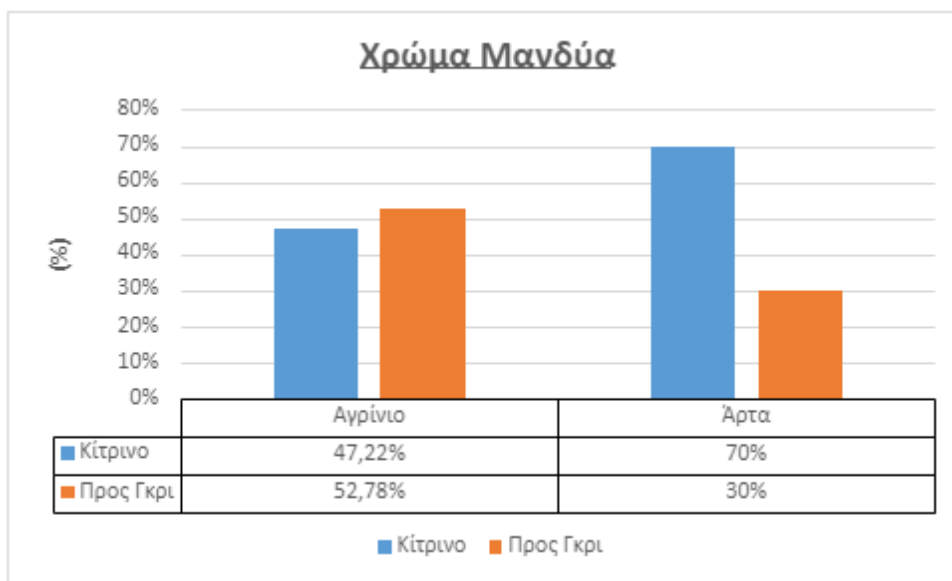
Εικόνα 20. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα το ποσοστό του αποχρωματισμού των σαλιγκαριών του Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.



Εικόνα 21. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα το ποσοστό του αναπλασμένων σαλιγκαριών του Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.



Εικόνα 22 . Απεικόνιση σε ιστόγραμμα ο χρωματισμός των ποδιών των σαλιγκαριών του Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.



Εικόνα 23 . Απεικόνιση σε ιστόγραμμα ο χρωματισμός του μανδύα των σαλιγκαριών του Αγρινίου με 36 δείγματα και Άρτας με 30 δείγματα.

3.2. Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης

Εξετάστηκαν συνολικά με μοριακούς δείκτες έξι μικροδορυφορικοί τόποι (Ha5, Ha6, Ha8, Ha9, Ha10 και Ha11) τους οποίους μελέτησαν και οι Guiller et al. (1994) στο είδος *C. aspersum*(Πίνακας 12).

Πίνακας 1. Γενετική παραλλακτικότητα σε κάθε γενετικό τόπο για κάθε πληθυσμό *C.a. aspersum*. Αναμενόμενη (H_{EXP}) και παρατηρούμενη (H_{OBS}) ετεροζυγωτία κατά Hardy-Weinberg και δείκτης ομομιξίας (F_{IS}) ανά γενετικό τόπο για τους δύο πληθυσμούς *C.a. aspersum* (N=24 για Άρτα και N=29 για Αγρίνιο)

Γ.Τ.		Άρα	Αργίριο	Μέσος όρος
Ha5	H_{EXP}	0,51	0,88	0,70
	H_{OBS}	0.67	0.83	0.78
	F_{IS}	-0,32	0,07	-0.127
Ha6	H_{EXP}	0,77	0,87	0,78
	H_{OBS}	0.67	0.90	0.78
	F_{IS}	0,14	-0,11	0.014
Ha8	H_{EXP}	0,70	0,87	0,78
	H_{OBS}	0.86	0.92	0.89
	F_{IS}	-0,24	-0,06	-0.151
Ha9	H_{EXP}	0,82	0,89	0,85
	H_{OBS}	0.65	0.93	0.79
	F_{IS}	0,21	-0,05	0.080
Ha10	H_{EXP}	0,73	0,85	0,79
	H_{OBS}	0.67	0.96	0.81
	F_{IS}	0,09	-0,14	-0.025
Ha11	H_{EXP}	0.78	0,81	0,79
	H_{OBS}	0.88	0.97	0.92
	F_{IS}	-0,13	-0,19	0.031
	H_{EXP}	0.72±0.11	0.85±0.03	

Όλοι	H_{OBS}	0.73±0.11	0.92±0.05	
Γ.Τ.	F_{IS}	-0.043	-0.016	

Η μέση τιμή της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας στην Άρτα 0.72 ήταν μικρότερη από το Αγρίνιο που η μέση τιμή ήταν 0.85. Η μέση τιμή της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας παρόμοια στην Άρτα ήταν 0.73 μικρότερη από το Αγρίνιο 0,92.

Η μέση τιμή της αναμενόμενης και παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας βρέθηκε, $H_{exp} = 0,785$ και $H_o = 0.825$ αντίστοιχα, τιμές που είναι σχετικά υψηλές σε σύγκριση με τις μέσες τιμές ετεροζυγωτίας των Arnaud et al. (2003) οι οποίες είναι 0.73 και 0.72 αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία των Arnaud & Laval (2003), σε φυσικούς πληθυσμούς, είναι 0,715, δηλαδή σχετικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη τιμή της παρούσης εργασίας.

Συντελεστής ομομιξίας F_{is}

Τα αποτελέσματα των μη τυχαίων διασταυρώσεων σε έναν πληθυσμό μπορούν να μετρηθούν συγκρίνοντας την αναμενόμενη από την ισορροπία H-W συχνότητα των ετεροζυγωτών (H_e) με την παρατηρούμενη (H_o). Ο συντελεστής ομομιξίας (Inbreeding coefficient), που συμβολίζεται με F, εκφράζει την πιθανότητα ένα άτομο να φέρει δύο όμοια αλληλόμορφα εξαιτίας της καταγωγής τους από κάποιον κοινό πρόγονο.

Ο συντελεστής F κινείται θεωρητικά στο όριο μεταξύ -1 και +1, με τις αρνητικές τιμές να είναι ενδεικτικές περίσσειας ετεροζυγωτών και τις θετικές ελλείμματος ετεροζυγωτών, άρα αντίστοιχης περίσσειας ομοζυγωτών (αύξηση της ομοζυγωτίας).

Η μέση τιμή του δείκτη ομομιξίας FIS για όλες τις πειραματικές σειρές σε όλους τους τόπους βρέθηκε -0.015, τιμή η οποία αντιπροσωπεύει χαμηλό ποσοστό ομομιξίας αν

αναλογιστούμε ότι στους φυσικούς πληθυσμούς η αντίστοιχη τιμή είναι της τάξης του 0.012 (Arnaud et al., 2003) ή ακόμα και αρνητικές τιμές της τάξεως του -0.03 (Arnaud & Laval, 2003). Παρατηρούμε ότι η Άρτα με μέση τιμή του δείκτη ομομιξίας FIS= -0,043 παρουσιάζει μικρότερη ομομιξία από τον πληθυσμό του Αγρίνιο που η μέση τιμή του δείκτη ομομιξίας FIS= -0,016.

Πίνακας 2. Μέσος όρος της εσωτερικής συγγένειας (IR) και της ομοζυγωτίας ανά τόπο (HL) για 24 δείγματα από τον πληθυσμό «Άρτα» και για 29 δείγματα από τον πληθυσμό «Αγρίνιο»

Πληθυσμός	IR	HL
Άρτα	0,136	0,281
Αγρίνιο	-0,052	0,096

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η στατιστική ανάλυση των μορφομετρικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών, κατέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Το συνολικό βάρος των πληθυσμών του Αγρινίου ήταν 38,37% ποιο βαριά από την Άρτα. Η σπλαχνική μάζα δεν σημείωσε μεγάλη διαφορά. Το κέλυφος των σαλιγκαριών του Αγρινίου ήταν αισθητά πιο μεγάλα από της Άρτας. Το υπόβαθρο των πληθυσμών του Αγρινίου τείνει στο κίτρινο ενώ της Άρτας πιο πολύ προς το καφέ. Στο διάστικτο φάνηκε έντονη διαφορά στο Αγρίνιο με το 47,22% να είναι λίγο διάσπαρτο σε σχέση με την Άρτα που εμφανιζόταν στο 16,67% του πληθυσμού. Τέλος σημαντική διαφορά εμφάνισε το χρώμα του μανδύα στην Άρτα με το 70% να τείνει στο κίτρινο ενώ στο Αγρίνιο ήταν σχεδόν παρόμοιες η δύο επιλογές.

Η περιοχή της Δ. Ελλάδας χαρακτηρίζεται από όχι πολύ υψηλές θερμοκρασίες το καλοκαίρι 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. 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 1993 : Madec et al., 2000). 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)

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 (interoparous animal) (Lazaridou-Dimitriadou & Katoulas, 1981 : Lazaridou-Dimitriadou & Bailey, 1991)

- η μικρή δυνατότητα μετακίνησης του με αποτέλεσμα να παρατηρούνται φαινόμενα ομομιξίας.

- 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 HardyWeinberg, έχει καταδειχθεί και σε άλλες μελέτες του είδους *Cornu aspersum*(Guiller et al., 2000). Διαπιστώθηκε ότι οι πληθυσμοί των σαλιγκαριών τείνουν να σχηματίσουν 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 *Cornu aspersum* αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg έχουν καταδειχθεί μετά από μελέτες με τη χρήση ισοενζύμων (Lazaridou-Dimitriadou et al., 1993).

Όσον αφορά την ανάλυση των γενετικών δεδομένων υπενθυμίζεται ότι οι πειραματικές σειρές για τις οποίες μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα ήταν η Άρτα και το Αγρίνιο. Εξετάστηκαν οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy – Weinberg για όλα

τα ζεύγη των γενετικών τόπων και για όλες τις πειραματικές σειρές. Οι 6 πειραματικές σειρές που μελετήθηκαν ακολουθούν το Νόμο Hardy-Weinberg και άρα βρίσκονται σε γενετική ισορροπία και έτσι υποδεικνύεται ότι υπάρχει τυχαία διασταύρωση μεταξύ των ατόμων. Επίσης, η ισορροπία υποδηλώνει ότι η συχνότητα ενός αλληλομόρφου μπορεί να κυμαίνεται από γενιά σε γενιά εξαιτίας τυχαίων γεγονότων (γενετική παρέκκλιση). Υπάρχει παρουσία μεταλλάξεων και παρουσία φυσικής επιλογής.

Η μέση τιμή της αναμενόμενης και παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας βρέθηκε, $H_{exp} = 0,785$ και $H_o = 0.825$ αντίστοιχα, τιμές που είναι σχετικά υψηλές σε σύγκριση με τις μέσες τιμές ετεροζυγωτίας των Arnaud et al. (2003) οι οποίες είναι 0.73 και 0.72 αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι παρατηρείται πλεόνασμα ετεροζυγωτίας μεταξύ των πειραματικών σειρών.. Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία των Arnaud & Laval (2003), σε φυσικούς πληθυσμούς, είναι 0,715, δηλαδή σχετικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη τιμή της παρούσης εργασίας.

Ο συντελεστής ομομιξίας FIS είναι χαμηλός (-0.015), . Σε μελέτες σε φυσικούς πληθυσμούς δεν παρατηρείται μετακίνηση των ατόμων σε μακρινές αποστάσεις, συνεπώς και ανταλλαγή γονιδίων με περισσότερα άτομα, γεγονός που μειώνει τόσο το βαθμό ομομιξίας και παράλληλα αυξάνει το δείκτη παραλλακτικότητας (Γκόγκας, 2008).

Η περιγραφή του γενετικού πολυμορφισμού, που εντάσσεται σε μία γενικότερη προσπάθεια μελέτης της βιοποικιλότητας οικοσυστημάτων, ενδιαιτημάτων, ειδών, πληθυσμών, θεωρείται το πλέον απαραίτητο βήμα τόσο για επιστημονικούς σκοπούς (κατανόηση μηχανισμών επιλογής, προσαρμογής και εξέλιξης των ειδών) όσο και για εφαρμοσμένους (διαχείριση, προστασία, διάσωση αποθεμάτων).

Μπορούμε λοιπόν να καταλήξουμε στα συμπεράσματα ότι η ενδοειδική ροή γονιδίων στους άγριους πληθυσμούς σαλιγκαριών είναι χαμηλή, καθώς η γενετική

παραλλακτικότητα είναι μεγάλη και η ομομιξία σε χαμηλά επίπεδα, ότι η γενετική ποικιλότητα παραμένει από γενιά σε γενιά.

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, Guiller A, Bellido A, 2001. Spatial analysis of allozyme and microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). Molecular Ecology. 10 (6), 1563-1576. DOI:10.1046/j.1365-294X.2001.01292.x
- 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.
- Bank, R.; Falkner, G.; Proschwitz, T. von (2007). "CLECOM-Project. A revised checklist of the non-marine Mollusca of Britain and Ireland". Helda. 5 (3): 41–72.
- Basinger Aj. (1931). The European brown snail in California. University of California Agricultural Experiment Station Bulletin, 151: 1-22.
- Bezemer, T. M.; Knight, K. J. (2001). "Unpredictable responses of garden snail *Helix aspersa* populations to climate change". Acta Oecologica. 22 (4): 201–208.
- Blondel J, Aronson J: Biology and Wildlife of the Mediterranean Region. 1999, Oxford: Oxford University Press

- Brent C. Emerson, Emmanuel Paradis, Christophe Thébaud,(2001). Revealing the demographic histories of species using DNA sequences, Trends in Ecology & Evolution, Volume 16, Issue 12,2001, Pages 707-716,ISSN 0169-5347,
- Burch JB. (1960). Some snails and slugs of quarantine significance to the United States. U.S. Department of Agriculture Research Service, 82: 1-70.
- Capinera JL. (2001). Handbook of Vegetable Pests. Academic Press, San Diego. 729 pp
- Cowie RH, 2011. Cornu Born, 1778 (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Helicidae): request for a ruling on the availability of the generic name. Bulletin of Zoological Nomenclature, 68(2):97-104.
- Cuttelod, A., Seddon, M., Neubert, E. (2011). European Red List of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union
- Durning W. C. (1957). Repair of a Defect in the Shell of the Snail *Helix aspersa*. J. Bone Joint Surg Am., 39: 377-393.
- 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
- F. W. Welter-Schultes-R. Klug: Comments on new names and nomenclatural acts of amphibians and non-avian sauropsids established by Garsault 1764 and Laurenti 1768 (response to Dubois & Bour 2010)
- Falkner, G.; Bank, R.A.; Proschwitz, T. von (2001). "Check-list of the non-marine molluscan species-group taxa of the states of northern, Atlantic and central Europe". 4 ((1/2)): 1-76

- Guiller A, Bellido A, Coutelle A, Madec L: Spatial Genetic Pattern in the Land Mollusc *Helix aspersa* inferred from a "Center-based Clustering" procedure. Genet Res. 2006, 88: 1-18. 10.1017/S0016672306008305
- Guiller A, Bellido A, Coutellec MA, Madec L, 2006. Spatial genetic pattern in the land mollusc *Helix aspersa* inferred from a "center-based clustering" procedure. Genetical Research, 88:1-18.
- Guiller A, Bellido A, Madec L, 1998. Genetic distances and ordination: the land snail *Helix aspersa* in North Africa as a test case. Systematic Biology, 47(2):208-227.
- Guiller A, Bellido A, Madec L: Ordination and genetic distances: the land snail *Helix aspersa* in north Africa as a test case. Syst Biol. 1998, 47: 208-227. 10.1080/106351598260888.
- Guiller A, Coutellec MA, Madec L, Deunff J: Evolutionary history of the land snail *Helix aspersa* in western Mediterranean: preliminary results inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol Ecol. 2001, 10: 81-87. 10.1046/j.1365-294X.2001.01145.x.
- Guiller A, Coutellec-Vreto M A, Madec L, 1996. Genetic relationships among suspected contact zone populations of *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata) in Algeria. Heredity. 77 (2), 113-129. DOI:10.1038/hdy.1996.116
- Guiller A, Coutellec-Vreto MA, Madec L, Deunff J, 2001. Evolutionary history of the land snail *Helix aspersa* in the Western Mediterranean: preliminary results inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Ecology, 10(1):81-87.
- Guiller A, Coutellec-Vreto MA, Madec L: Genetic relationships among suspected contact zone populations of *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata) in Algeria. Heredity. 1996, 74: 113-129. 10.1038/hdy.1996.116.

- Guiller A, Madec L, 1993. A contribution to the study of morphological and biochemical differentiation in French and Iberian populations of *Cepaea nemoralis*, *Biochemical Systematics and Ecology*, Volume 21, Issue 3, 1993, Pages 323-339, ISSN 0305-1978
- Guiller A, Madec L, 2010. Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: a new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. *BMC Evolutionary Biology*, 10(18):(20 January 2010). <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/18>
- Guiller A, Madec L, Daguzan J, 1994. Geographical patterns of genetic differentiation in the landsnail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*, 60(3):205-214.
- Guiller A, Madec L, Daguzan J, 1994. Geographical patterns of genetic differentiation in the landsnail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*. 60 (3), 205-214. DOI:10.1093/mollus/60.3.205
- Guiller A, Madec L, Daguzan J: Geographical patterns of genetic differentiation in the landsnail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata). *J Mollus Stud*. 1994, 60: 205-221. 10.1093/mollus/60.3.205
- International Commission Zoological Nomenclature] ICZN, 2015. OPINION 2354 (Case 3518) *Cornu Born*, 1778 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Helicidae): request for a ruling on the availability of the generic name granted. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 72(2):157.
- Jacques Blondel, James Aronson (1999). *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*, Oxford University Press, 1999

- 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
- Madec L, 1989. Geographic variations in shell size and form of *Helix aspersa* Müller. Evolution of these characters in laboratory conditions. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 114(1):85-100.
- Madec L, 1991. Genetic divergence in natural populations of the landsnail *Helix aspersa* Müller, 1774. *Journal of Molluscan Studies*, 57(4):483-487.
- Madec L, Bellido A, Guiller A, 1996. Statistical and biogeographical significances of patterns of morphological and biochemical variation in the land snail *Helix aspersa*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris Série III*, 319:225-229.231.
- Madec L, Bellido A, Guiller A: Shell shape of the land snail *Cornu aspersum* in north Africa: further evidence of a phylogeographical splitting. *Heredity*. 2003, 91: 224-231. 10.1038/sj.hdy.6800301.
- Madec L, Daguzan J (1993). Geographic variation in reproductive traits of *Helix aspersa* Müller studied under laboratory conditions. *Malacologia*, 35: 99–117.

- Madec L, Desbuquois C, Coutellec-Vreto MA, 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.
- Madec L, Guiller A, 1994. Geographic variation of distal genitalia in the landsnail *Helix aspersa* Müller (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Zoology*, 233:215-231.
- Malandrakis E.E., Gogas A., Hatzioannou M., Panagiotaki P., LazaridouDimitriadou M., Neofitou C. & Exadactylos A. (2007). Morphological and shell quality natural population diversity of the edible snail (*Helix aspersa* M.), in southern Hellas. 16th World Congress of Malacology (WCM), "Groenenborger" of the University of Antwerp, Belgium.
- Manganelli, G.; Salomone, N.; Giusti, F. (2005). "A molecular approach to the phylogenetic relationships of the western palaeartic Helicoidea (Gastropoda: Stylommatophora)". *Biological Journal of the Linnean Society*. 85 (4): 501–512. doi:10.1111/j.1095-8312.2005.00514.x.
- 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 Gal-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.
- 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*L. Microgeographic variation. *Evolution*, 29: 385-401.
- Sverlova, N. V. (2006). "O rasprostraneniі nekotorigkh vidov nazemnikh mollyuskov na territorii Ukraini". *Ruthenica*. 16 (1/2): 119–139.
- Taberlet, P., L. Fumagalli, A.-G. Wust-Saucy, and J.-F. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.
- Welter-Schultes, F. W., and R. Klug. 2011. Comments on new names and nomenclatural acts of amphibians and non-avian sauropsids established by Garsault 1764 and Laurenti 1768 (response to Dubois & Bour 2010). *Zootaxa* 2814: 50–58.
- 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

- Γκάφας Γ., 2006. Πληθυσμιακή γενετική δόμηση και αναπαραγωγή του μελανουριού, *Oblada melanura* L., στο Αιγαίο και Ιόνιο πέλαγος. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος
- Γκόγκας Αθανάσιος(2008)“Πληθυσμιακή γενετική του εδάδιμου σαλιγκαριού, *Helix aspersa* με χρήση μικρο-δορυφορικού DNA.”, ΒΟΛΟΣ 2008
- Δεσποτοπούλου Α., 2006. Επιλογή γεννητόρων του εδάδιμου σαλιγκαριού *Helix aspersa* σε σχέση με την αναπαραγωγική τους ικανότητα σε συνθήκες εντατικής εκτροφής.

Πτυχιακή διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος

- Λαζαρίδου-Δημητριάδου Μ. & Καττουλας Μ.Ε., 1985. Τα εδώδιμα και εμπορεύσιμα σαλιγκάρια της Ελλάδας – Σαλιγκαροτροφία. Γιαχούδη-Γιαπούλη Ο.Ε., Θεσσαλονίκη.
- Χατζηιωάννου Μ., 2003. Πανεπιστημιακές παραδόσεις του μαθήματος καλλιέργεια σαλιγκαριών και βατράχων. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Χατζηιωάννου Μ., Στάικου Α (2015) Βιολογία & Εκτροφή Γαστερόποδων Σαλιγκαροτροφία. Ελληνικά ακαδημαϊκά συγγράμματα και βοηθήματα. Κάλλιπος.
- Gallo, G. (1986). Σαλιγκαροτροφία. Αθήνα: Εκδ. Ψιγάλου

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- *Cornu aspersum* - Wikipedia
- *Cornu aspersum* (common garden snail) (cabi.org)
- *Cornu aspersum* (O. F. Müller 1774) - Garden Snail, Escargot Grise :: :: MolluscIreland :: Land and Freshwater Molluscs (habitas.org.uk)
- Fact Sheet: *Cornu aspersum* (idtools.org)