

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«Περιβαλλοντική Βιολογία-Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων»

Τα φυλογενετικά πρότυπα των χερσαίων σαλιγκαριών του γένους *Albinaria* στην Κρήτη

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ



Επιβλέπων: Επικ. Καθ. Πουλακάκης Νίκος

Τριμελής επιτροπή: Καθ. Μυλωνάς Μωσής
Επικ. Καθ. Πουλακάκης Νίκος
Ερευνητής Β' (ΕΛΚΕΘΕ) Τσιγγερόπουλος Κωνσταντίνος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2013

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ) υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Πουλακάκη Νίκου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την εξεταστική επιτροπή, Καθηγητή κ. Μυλωνά, Επίκουρο Καθηγητή κ. Πουλακάκη και Ερευνητή Β' κ. Τσιγγενόπουλο, για τα εποικοδομητικά σχόλια και τις διορθώσεις τους στο κείμενο.

Πριν απ' όλα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Μυλωνά και Δρ. Πουλακάκη για την εμπιστοσύνη στην ανάθεση του θέματος, το οποίο γνωρίζω ότι είχε μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον και για αυτούς. Ελπίζω, με τη βοήθειά τους, να το έφερα εις πέρας ικανοποιητικά. Η πολύτιμη στήριξή τους, υπήρξε τόσο σε πρακτικά όσο και σε επιστημονικά ζητήματα, ενώ πολλές φορές ήταν και ηθική. Δε χωρά αμφιβολία ότι χωρίς την πολύτιμη πείρα των μαλακολόγων του ΜΦΙΚ Δρ. Βαρδινογιάννη και Δρ. Μυλωνά στο πεδίο, και τις γνώσεις τους για την *Albinaria* δε θα είχαν πραγματοποιηθεί με επιτυχία ούτε καν οι δειγματοληψίες. Πέρα από την καθοριστική συμβολή τους στο πεδίο, στην αναγνώριση των ειδών και σε άλλα πρακτικά ζητήματα όποτε τους χρειάστηκα, έκαναν τις δειγματοληψίες για εμένα μια πολύ ευχάριστη εμπειρία και περίοδο, πράγμα που καθορίστηκε από το εξαιρετικό κλίμα και την καλή διάθεση όλων, από τις ανθρώπινες σχέσεις εν ολίγοις. Από τις δειγματοληψίες φυσικά δεν έλειψε ούτε ο Δρ. Πουλακάκης του οποίου η επιστημονική, πρακτική και ηθική υποστήριξη καθώς και η υπομονή, υπήρξαν μάλλον ανεξάντλητες όλη αυτή την περίοδο. Στις δειγματοληψίες συμμετείχαν ενίοτε και άλλοι άνθρωποι, μέλη του εργαστηρίου και μη, τους οποίους επίσης ευχαριστώ θερμά.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το πολύ καλό φιλικό κλίμα, το σεβασμό και τη ζωντάνια που υπήρχε σε αυτό και δρούσε υποστηρικτικά στην προσπάθεια του καθένα μας. Νομίζω ότι είναι σπάνιο σε χώρους τέτοιους που συνήθως επικρατεί ανταγωνισμός και ένταση να κυλούν όλα τόσο ομαλά και θετικά. Λιγάκι περισσότερο θα ήθελα να ευχαριστήσω την Πασχαλιά Καπλή που συνέβαλε πολύ σε αυτό και σε πολλές περιπτώσεις, υπήρξε δίπλα μου τόσο σε φιλικό όσο και επιστημονικό επίπεδο, βοηθώντας με τις συζητήσεις μας και την επίλυση πρακτικών θεμάτων.

Οι συμφοιτητές και φίλοι Νατάσα, Μαρία, Γαβριέλα και Νίκος, με τους οποίους μοιραζόμασταν παρόμοια άγχη και προβληματισμούς επίσης έπαιξαν σημαντικό ρόλο, άλλοτε και χωρίς να το γνωρίζουν όλο αυτό το διάστημα. Η πάρα πολύ σημαντική και ειλικρινής παρουσία των υπόλοιπων στενών μου φίλων και συνοδοιπόρων (Λήδα, Καλλιόπη, Δημήτρης

κ.α.), το γεγονός ότι πάντα ήταν δίπλα μου όσες φορές τους χρειάστηκα με κατανόηση και αγάπη, παρά τη γεωγραφική απόσταση που μπορεί να με χωρίζει με κάποιους από αυτούς, έχουν ανεκτίμητη αξία, πολύ πέρα από τα όρια αυτής της διατριβής προφανώς. Συνολικά οι άνθρωποι που ήταν γύρω μου, φίλοι και γνωστοί, παίζοντας μικρό ή μεγαλύτερο ρόλο κάποιες στιγμές, με βοήθησαν έμμεσα και άμεσα να πλησιάσω τους στόχους μου.

Θέλω να ευχαριστήσω τέλος τους γονείς μου, Μαρία και Αντώνη, τον αδερφό μου Δημήτρη και τη Δέσποινα, όπως και όλα τα αγαπημένα μου συγγενικά πρόσωπα για την υποστήριξη από τις «βάσεις», τις διευκολύνσεις που μου παρείχαν και την εμπιστοσύνη όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Η ανιδιοτελής προσφορά και η αγάπη τους δε χωράει προφανώς σε λίγες γραμμές και δε θα προσπαθήσω να τη χωρέσω.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Βιβλιογραφική αναδρομή για το γένος <i>Albinaria</i>	9
1.2 Μοριακή φυλογένεση στο Αιγαίο.....	12
1.3 Η ιστορία της περιοχής μελέτης συνοπτικά.....	13
1.4 Σκοπός.....	13
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1 Συλλογή δειγμάτων.....	13
2.2 Εργαστηριακές αναλύσεις.....	15
2.2.1 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA	15
2.2.2 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων (PCR)	16
2.2.3 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR	17
2.2.4 Στοίχιση των αλληλουχιών	18
2.2.5 Φυλογενετικές αναλύσεις	18
2.2.5.1 Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης	18
2.2.5.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων.....	18
2.2.5.3 Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης και στατιστικός έλεγχος των παραγόμενων δέντρων	18
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
3.1 Γενικά στοιχεία για το σύνολο δεδομένων και τις αλληλουχίες.....	19
3.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων.....	20
3.2.1 Ο δείκτης 16S rRNA.....	21
3.2.2 Ο δείκτης ITS1.....	21
3.3 Φυλογενετικές αναλύσεις	22
3.3.1 Μπεύζιανή Συμπερασματολογία.....	23
3.3.2 Μέγιστη Πιθανοφάνεια και Σύνδεση Γειτόνων.....	23
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	25
4.1 Οι φυλογενετικές σχέσεις των taxa και η ταξινομική τους.....	25
4.1.1 Βαθμός διαφοροποίησης.....	25
4.1.2 Οι σχέσεις των taxa της Κρήτης	27
4.1.2.1 Εξωτερικοί κλάδοι, έμφαση στο δυτικό κλάδο και το σύμπλεγμα <i>A. cretensis</i>	28
4.1.2.2 Οι εσωτερικότεροι κλάδοι	32
4.2 Συμπεράσματα	37

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	47
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Albinaria* (Gastropoda, Clausiliidae) εξαπλώνεται στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου, παρουσιάζοντας υψηλό βαθμό μορφολογικής και γενετικής διαφοροποίησης, κυρίως στην Ελλάδα και ειδικότερα στην Κρήτη. Η ταξινομική του ωστόσο αναθεωρείται διαρκώς εξαιτίας της μορφολογικής και οικολογικής πλαστικότητας των taxa που περιλαμβάνει, καθώς και της απουσίας ισχυρών συναπομορφικών χαρακτήρων στη μελέτη ενός μεγάλου αριθμού taxa. Ο υψηλός βαθμός μορφολογικής διαφοροποίησης που παρατηρείται στην Κρήτη και τις δορυφορικές νησίδες της, με τον αριθμό των περιγεγραμμένων ειδών να φτάνει τα 31, αποτελεί πρόκληση για την επίλυση των φυλογενετικών σχέσεων και της συστηματικής των taxa που περιλαμβάνει το γένος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν, δεδομένα από ένα μιτοχονδριακό δείκτη (16S rRNA) και έναν πυρηνικό (ITS1) και προσεγγίστηκαν με ανάλυση Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας, Σύνδεσης Γειτόνων και Μέγιστης Πιθανοφάνειας, ώστε να διαλευκανθούν κατά το δυνατόν οι φυλογενετικές σχέσεις, να αποτιμηθεί η γενετική ιδιαιτερότητα και συνεκτικότητα των taxa του γένους και να ανοικοδομηθεί η εξελικτική τους ιστορία στην Κρήτη, δίνοντας μια προοπτική βαθύτερης και συνολικότερης προσέγγισης της εξελικτικής ιστορίας του γένους *Albinaria* στο μέλλον. Οι φυλογενετικές σχέσεις των taxa της Κρήτης παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άλυτες, υπάρχουν όμως σημαντικές ενδείξεις ότι ο αριθμός των πραγματικών ειδών είναι πολύ μικρότερος από τα περιγεγραμμένα καθώς και ότι δε συνιστούν μία μονοφυλετική ομάδα.

Λέξεις κλειδιά

Albinaria, Κρήτη, 16S, ITS1, φυλογένεση.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαφοροποίηση των οργανισμών ανέκαθεν αποτελούσε και πιθανότατα θα εξακολουθήσει να αποτελεί σημείο αναφοράς της εξελικτικής βιολογίας. Η αυξημένη ποικιλότητα, από μόνη της, προξενεί το ενδιαφέρον του βιολόγου που αντιμετωπίζει με εξελικτική οπτική κάθε βιολογικό πρόβλημα ή φαινόμενο που παρατηρεί, πόσο μάλλον οι μηχανισμοί που ενδέχεται να την καθοδηγούν. Στο πλαίσιο της προσέγγισης της βιολογικής ποικιλότητας εν γένει, αλλά και πιο συγκεκριμένα της ποικιλότητας εντός κάποιου taxon, συχνά αναδεικνύεται μία ανάγκη κατάταξης και ταξινόμησης. Η ανάγκη της κατάταξης, πέρα από τις πιθανές εγγενείς τις ρίζες για τον άνθρωπο, έχει και πρακτική αξία για τους επιστήμονες που έχουν ως απώτερο στόχο να ασχοληθούν με τους μηχανισμούς της διαφοροποίησης και της εξέλιξης, καθώς η επιστημονική προσέγγιση μπορεί να διευκολυνθεί έχοντας ορισμένες μονάδες αναφοράς, ακόμα και αν αυτές είναι συμβατικά καθορισμένες ή και ενέχουν ένα βαθμό ασάφειας, όπως για παράδειγμα η έννοια του είδους. Δεν είναι τυχαίο που τόσο κατά το παρελθόν, όσο και σήμερα, πολλές μελέτες διαφοροποίησης ξεκινούν από το πεδίο της ταξινομικής.

Οι μελέτες των χερσαίων σαλιγκαριών δεν είναι λίγες στη βιβλιογραφία, αφορούν δε αρκετούς κλάδους της Βιολογίας. Τα χερσαία μαλάκια αποτελούν χρήσιμους οργανισμούς-μοντέλα, για διάφορους λόγους, μεταξύ των οποίων είναι οι εξής: α) συνήθως είναι πολυπληθή και ευδιάκριτα, επομένως εύκολο να συλλεχθούν, β) έχουν πιο περιορισμένες ικανότητες ενεργητικής διασποράς σε σχέση με άλλους οργανισμούς, γεγονός που μπορεί να επιτρέψει στις εξελικτικές δυνάμεις να παράγουν πρότυπα μικρής χωρικής κλίμακας τα οποία είναι πιο εύκολα παρατηρήσιμα (Γκιώκας 1996). Τα χερσαία σαλιγκάρια αποτελούν μοντέλα για την κατανόηση του ρόλου της ιστορίας και της φυσικής επιλογής στην προέλευση της ποικιλότητας (Davison 2002).

Αρκετά taxa σαλιγκαριών έχουν αποτελέσει μοντέλα έχοντας μελετηθεί σε βάθος για δεκαετίες. Μερικά από τα πιο χαρακτηριστικά είναι τα είδη του γένους *Partula* από νησιά του Ειρηνικού με μια σειρά εργασιών (Clarke & Murray 1969, 1970; Goodacre 2002; Goodacre & Wade 2001; Murray & Clarke 1980) και μορφές του γένους *Cerpea* από την Ευρώπη (Cain & Sheppard 1954; Cook 2008; Jones *et al.* 1977; Yamazaki *et al.* 1997). Από το χώρο της Μεσογείου έχουν μελετηθεί επίσης αρκετά είδη και γένη απαντώντας ερωτήματα διαφορετικών πεδίων της Βιολογίας. Μερικά από αυτά είναι το είδος *Helix aspersa* (Guiller *et al.* 2001; Guiller

et al. 1994; Selander & Kaufman 1975), το είδος *Theba pisana* (Däumer *et al.* 2012; Johnson 2011a, b; Madejón *et al.* 2013; Scheil *et al.* 2012a; Scheil *et al.* 2012b), το γένος *Mastus* (Parmakelis & Mylonas 2002, 2004; Parmakelis *et al.* 2005; Parmakelis *et al.* 2003), καθώς και το γένος *Albinaria*, για το οποίο έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες εργασίες ταξινομικές, οικολογικές, βιογεωγραφικές, φυλογενετικές (Ayoutanti *et al.* 1987; Douris *et al.* 1998a; Douris *et al.* 1998b; Douris *et al.* 2007; Douris *et al.* 1995; Giokas 1996, 2000, 2008; Giokas & Mylonas 2002, 2004; Giokas *et al.* 2005; Giokas *et al.* 2010; Gittenberger 1991; Kemperman & Gittenberger 1992; Kemperman *et al.* 1992; Schilthuizen 1995; Schilthuizen & Gittenberger 1996; Schilthuizen & Lombaerts 1995; Uit De Weerd & Gittenberger 2005; Welter-Schultes 2010; Welter-Schultes 1992).

Το γένος *Albinaria*, που ανήκει στην οικογένεια Clausiliidae αποτελείται από πνευμονοφόρα χερσαία σαλιγκάρια που εξαπλώνονται στις βορειοανατολικές ακτές της Μεσογείου. Πιο συγκεκριμένα κατανέμεται στην Ελλάδα και την Κύπρο και σε τμήματα της Αλβανίας, της Τουρκίας και του Λιβάνου (Welter-Schultes 2010; Γκιώκας 1996). Παρουσιάζει υψηλή μορφολογική και γενετική διαφοροποίηση, κυρίως στη νότια Ελλάδα. Αποτέλεσμα του παραπάνω είναι οι παραδοσιακοί ταξινομητές να έχουν περιγράψει περισσότερα από 200 taxa (είδη και υποείδη) (Giokas 2000). Στην Ελλάδα συνολικά, αποτελούν το 15% της χερσαίας μαλακοπανίδας (Giokas & Mylonas 2002). Όμως δεν είναι μόνο το μεγάλο πλήθος ειδών που προκάλεσε την προσοχή των επιστημόνων, καθώς το γένος παρουσιάζει και άλλα πολύ ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά για τη μελέτη και την κατανόηση των εξελικτικών διαδικασιών.

Η παρατήρηση ότι ο υψηλός αριθμός ειδών, αν και τίθεται υπό αμφισβήτηση (Mylonas *et al.* 1987), και η έντονη μορφολογική διαφοροποίηση δε φαίνεται να σχετίζονται με αντίστοιχο βαθμό οικολογικής διαφοροποίησης, έχει οδηγήσει στη διατύπωση της υπόθεσης της μη προσαρμοστικής διάσπασης (non-adaptive radiation) για το γένος (Gittenberger 1991). Στην Κρήτη, αρχικά υπολογιζόταν ότι αυτή η διαφοροποίηση για την *Albinaria* πραγματοποιήθηκε πριν το Τορτόνιο (7,2–11.6 εκ.χρ.) (Douris *et al.* 1998a; Welter-Schultes 2000b), αλλά πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα σημερινά γεωγραφικά πρότυπα της *Albinaria* στην Κρήτη είναι αποτέλεσμα νεότερων γεγονότων επέκτασης των κατανομών των ειδών (Schilthuizen *et al.* 2004; Welter-Schultes 2001)

Γενικά, τα παραδείγματα μη προσαρμοστικής διάσπασης είναι σχετικά περιορισμένα στη διεθνή βιβλιογραφία. Στο χώρο του Αιγαίου, πέραν του γένους *Albinaria*, τα πιο χαρακτηριστικά taxa για τα οποία έχει διατυπωθεί η μη προσαρμοστική διάσπαση ως ο μηχανισμός διαφοροποίησής τους είναι τα φυτά του γένους *Nigella* (Bittkau & Comes 2005; Bittkau &

Comes 2009; Comes *et al.* 2008) και τα χερσαία σαλιγκάρια του γένους *Xerocrassa* (Sauer & Hausdorf 2009, 2010) και του γένους *Mastus* (Parmakelis *et al.* 2005).

Επιπλέον παράγοντας πολυπλοκότητας στην προσέγγιση του γένους *Albinaria*, είναι το γεγονός ότι στη φύση παρατηρούνται ενδιάμεσες μορφές και ζώνες υβριδισμού (Giokas 2000; Gittenberger *et al.* 2001; Mylonas *et al.* 1987; Schilthuizen 1994, 1995). Ο υβριδισμός ανάμεσα σε διαφορετικά μορφολογικά είδη επιβεβαιώνεται και σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο κατά το παρελθόν, όσο και πρόσφατα στο εργαστήριο, των οποίων όμως τα αναλυτικά αποτελέσματα δε θα παρατεθούν στην παρούσα εργασία. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί εδώ ότι η μορφολογική διαφοροποίηση, σε ορισμένες ιδίως περιπτώσεις, είναι τέτοια που ακόμη και ένας μοριακός συστηματικός που δεν αποδέχεται τους μορφολογικούς χαρακτήρες ως αξιόπιστους και αποδίδει τη διαφοροποίηση σε μορφολογική πλαστικότητα, εντυπωσιάζεται.

1.1 Βιβλιογραφική αναδρομή για το γένος *Albinaria*

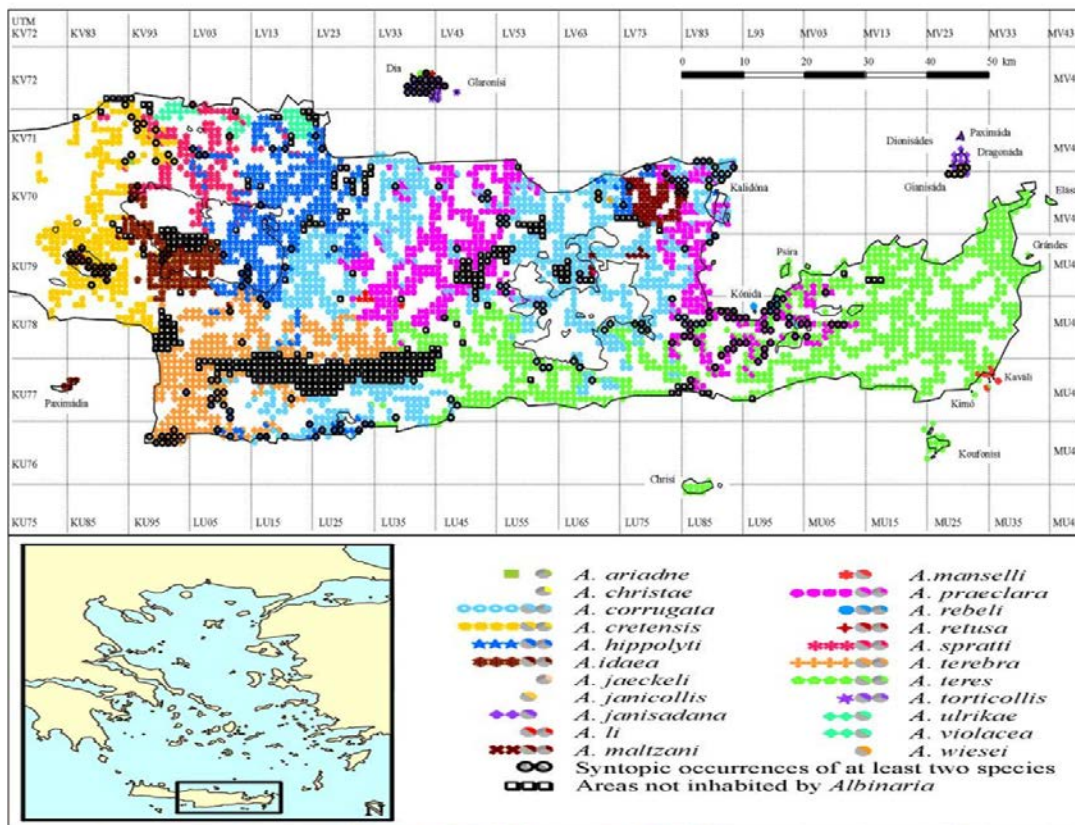
Η πολυπλοκότητα του taxon αντικατοπτρίζεται τόσο στις ταξινομικές αναθεωρήσεις που έχει υποστεί, όσο και στην αμφισβήτηση που υφίστανται οι αναθεωρήσεις αυτές (Giokas 2000). Από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, όταν συναντάμε την πρώτη συστηματική ενασχόληση με τα Clausiliidae της Ελλάδας, με μια σειρά εργασιών που δημοσιεύονται από τον Boettger (Boettger 1878a, b, 1883), μέχρι σήμερα, το γένος έχει υποστεί αρκετές αναθεωρήσεις και ταξινομική αμφισβήτηση. Ο Boettger περιέγραψε πολλά είδη, μορφές και ποικιλίες, στηριζόμενος σε κελυφικούς χαρακτήρες (Βαρδινογιάννη 1994). Λίγο αργότερα ο Steenberg (Steenberg 1914) και ο Wagner (Wagner 1919) μελετούν και ταξινομούν σε γένη και υπογένη με βάση το αναπαραγωγικό σύστημα και το ζύστρο. Για κάποια χρόνια, μετά την τελευταία εργασία του Wagner (Wagner 1924) στην οποία περιγράφει επτά είδη (τρία νέα) και πέντε νέα υποείδη από την Κρήτη, παύει η ενασχόληση με το γένος και αρχίζει ξανά μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο. Μετά το 1940 η πρώτη εργασία που πραγματοποιείται αφορά την *Albinaria* της Κρήτης και περιγράφονται σε αυτή 19 είδη με βάση το κέλυφος αποκλειστικά (Loosjes 1955).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ορισμένες εργασίες για τα Clausiliidae από τον ελληνικό χώρο και τα παράλια της Τουρκίας (Βαρδινογιάννη 1994). Έντονη και συστηματική ενασχόληση με τα Clausiliidae της Ελλάδας όμως, εμφανίζεται με τις εργασίες του Nordsieck, ο οποίος εργάστηκε πάνω στην οικογένεια για δεκαετίες. Αναθεώρησε την ταξινόμηση της οικογένειας και διέκρινε γένη και υπογένη με βάση το αναπαραγωγικό σύστημα. Σε επίπεδο είδους, βασίστηκε σε κελυφικούς χαρακτήρες θεωρώντας ότι το αναπαραγωγικό δεν παρέχει πληροφορίες (Nordsieck 1977). Αναθεώρησε την ταξινόμηση του γένους *Albinaria* καθώς

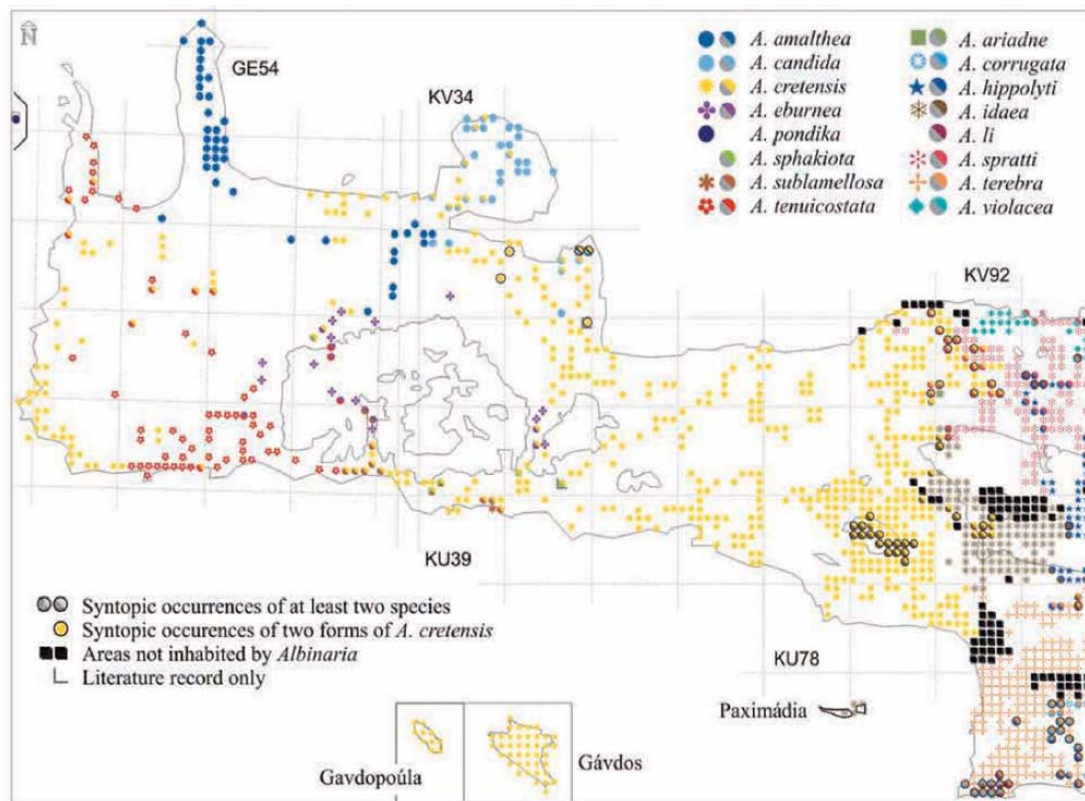
επίσης διέκρινε ομάδες πάνω από το επίπεδο του είδους (Βαρδινογιάννη 1994). Με την εργασία του ο Nordsieck (1977) αναγνώρισε συνολικά 59 είδη. Μετέπειτα ο ίδιος και διάφοροι άλλοι ταξινομοί, περιέγραψαν άλλα 21 είδη μέχρι το 1993 (Γκιώκας 1996).

Στην Κρήτη, συναντάμε πιο έντονα το ταξινομικό πρόβλημα του γένους, παρόλο που έχουν πραγματοποιηθεί πολλές προσπάθειες να επιλυθεί η ταξινομική του, χρησιμοποιώντας μορφολογικά και γενετικά δεδομένα. Είναι από μόνο του εντυπωσιακό το γεγονός ότι περιγράφονται πάνω από 30 είδη *Albinaria* στην Κρήτη. Ενδεικτικά αναφέρονται οι περιγραφές και αναθεωρήσεις ειδών που έχουν πραγματοποιηθεί μετά το 1940. Ο Loosjes (1955) περιγράφει 19 είδη από την Κρήτη και τις νησίδες της. Στη συνέχεια, με την αναθεώρηση του Nordsieck (1977) ο αριθμός αυτός αλλάζει σε 20 είδη για την Κρήτη και 33 υποείδη. Μέχρι το 1994, όταν η Βαρδινογιάννη δημοσιεύει το διδακτορικό της, ο αριθμός έχει φτάσει τα 37 είδη, η ίδια βρίσκει 24 όμως και θεωρεί κάποιες αναφορές λανθασμένες (Βαρδινογιάννη 1994). Ο Welter-Schultes αναγνωρίζει 27 είδη και 10 υποείδη (Welter-Schultes 1998; Welter-Schultes 2000a). Μέχρι το 2007, μετά από διάφορες ταξινομικές αλλαγές, έχουμε πάλι 37 είδη και 47 υποείδη (Welter-Schultes 2010). Το 2010 ωστόσο, ο τελευταίος συγγραφέας δημοσιεύει την πιο πρόσφατη ταξινομική αναθεώρηση του γένους στην Κρήτη, βασιζόμενος σε μορφολογικούς χαρακτήρες, στην οποία βασίστηκε και η δική μας προσέγγιση, αναγνωρίζοντας 31 ενδημικά είδη και 7 υποείδη στην Κρήτη και τις νησίδες της, οι χάρτες κατανομής των οποίων δίνονται στην Εικόνα 1 και στην Εικόνα 2.

Γενικά, υπάρχουν δύο κύριες επιστημονικές τάσεις στην ταξινομική του γένους (Βαρδινογιάννη 1994). Η μία προέρχεται από μια γερμανο-ολλανδική ομάδα ερευνητών, η οποία είχε την τάση να ανάγει υποείδη σε είδη και έτσι τελικά να αυξάνει τον αριθμό των ειδών και η άλλη προέρχεται από την ελληνική ομάδα η οποία δούλεψε παράλληλα στο χώρο του Αιγαίου, με την αντίθετη τάση. Χαρακτηριστική είναι η δημοσίευση με τίτλο “The genus *Albinaria* Vest. Is there any true species?” (Mylonas *et al.* 1987). Πολλοί από τους ερευνητές που δεν προέρχονταν από την Ελλάδα δούλευαν με δείγματα από μουσεία ή που είχαν συλλέξει άλλοι. Αυτό, σε ένα μικρό βεβαίως βαθμό, ίσως να αποτελεί μια από τις συνιστώσες της προβληματικής ταξινομικής (Βαρδινογιάννη 1994), αν και η αποδοχή της δυσκολίας στην ταξινομική του γένους είναι κοινή.



Εικόνα 1 Χάρτης κατανομής των ειδών της *Albinaria* στην κεντρική και ανατολική Κρήτη. (Welter-Schultes 2010)



Εικόνα 2 Χάρτης κατανομής των ειδών της *Albinaria* στη δυτική Κρήτη. (Welter-Schultes 2010)

Για το γένος *Albinaria* στην Ελλάδα, πέρα από τις οικολογικές και ταξινομικές μελέτες με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που έχουν δημοσιευθεί, έχουν επίσης πραγματοποιηθεί εργασίες χρησιμοποιώντας βιοχημικά εργαλεία (αλλοένζυμα, DNA) οι οποίες αφορούν είτε μερικά από τα taxa μιας συγκεκριμένης περιοχής της κατανομής του, είτε πληθυσμούς ενός είδους (Ayoutanti *et al.* 1987; Douris *et al.* 1998b; Douris *et al.* 2007; Douris *et al.* 1995; Giokas *et al.* 2010; Kemperman & Degenars 1992; Schilthuizen *et al.* 2004; Schilthuizen & Lombaerts 1994; Uit De Weerd & Gittenberger 2005). Όπως διαφαίνεται κάνοντας μια ανασκόπηση στη βιβλιογραφία, καμία επιστημονική ομάδα δεν έχει προσπαθήσει να αντιμετωπίσει τη φυλογένεση και τη φυλογεωγραφία της *Albinaria* με ολιστική τάση. Για παράδειγμα, για την περιοχή της Κρήτης έχει πραγματοποιηθεί μια εργασία με σύγχρονα εργαλεία (χρήση μιτοχονδριακού δείκτη), χωρίς όμως να συμπεριλαμβάνει όλα ή την πλειοψηφία των διαφορετικών μορφολογικών ειδών που συναντώνται (Douris *et al.* 1998a).

1.2 Μοριακή φυλογένεση στο Αιγαίο

Η φυλογένεση είναι η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα σε ομάδες οργανισμών (π.χ. είδη, πληθυσμούς). Οι φυλογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες είναι πολλές και παρουσιάζουν αυξητικό ρυθμό τόσο συνολικά, όσο και αυτές που αναφέρονται στην περιοχή του ελλαδικού χώρου.

Στην περιοχή μας, έχουν μελετηθεί μια σειρά από χερσαίοι ζωικοί οργανισμοί, τόσο ασπόνδυλοι (Kornilios *et al.* 2009a; Papadopoulou *et al.* 2009; Parmakelis *et al.* 2006; Poulakakis & Sfenthourakis 2008; Uit De Weerd & Gittenberger 2005; Παρμακέλης 2003) όσο και σπονδυλωτοί (Kornilios *et al.* 2010; Kyriazi *et al.* 2008; Lymberakis *et al.* 2007; Mantziou *et al.* 2004; Michaux *et al.* 2005), αλλά και φυτά (Bittkau & Comes 2005; Comes *et al.* 2008) με τη χρήση γενετικών δεικτών. Η χρήση των γενετικών δεικτών ως εργαλείο έχει συμβάλλει σημαντικά στη μελέτη και στην κατανόηση των εξελικτικών σχέσεων και διεργασιών που έχουν συντελέσει στην παρούσα βιοποικιλότητα που παρατηρείται στον ευρύτερο χώρο του Αιγαίου, ο οποίος αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα περιοχή από την πλευρά της βιογεωγραφίας εξάλλου.

1.3 Η ιστορία της περιοχής μελέτης συνοπτικά

Η Κρήτη είναι το μεγαλύτερο νησί της Ελλάδας και το πέμπτο μεγαλύτερο στη Μεσόγειο. Εντοπίζεται περίπου 160 χλμ νότια της ελληνικής ηπειρωτικής χώρας εκτεινόμενη κατά διεύθυνση Ανατολή - Δύση, νότια του Αιγαίου πελάγους, του οποίου και αποτελεί το νότιο φυσικό όριο και βόρεια του Λιβυκού.

Η ιστορία της Κρήτης και του Αιγαίου γενικότερα αρχίζει στα 12-11 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα (ανώτερο Σερραβάλλιο-κατώτερο Τορτόνιο, δηλαδή στο μέσο με ανώτερο Μειόκαινο), όταν η θάλασσα άρχισε να εισχωρεί στην ενιαία έως τότε μάζα της Αιγαίδας. Κατά τη διάρκεια του Πλειόκαινου (~5,3 εκ. χρόνια πριν) και εξαιτίας των έντονων τεκτονικών φαινομένων, η περιοχή του Αιγαίου κατακερματίζεται και αλλάζει σημαντικά ως προς τη γεωγραφία της. Η Κρήτη απομονώνεται οριστικά από την Πελοπόννησο και τις άλλες ηπειρωτικές περιοχές και παραμένει απομονωμένη με την μορφή πολλών (Πλειόκαινο) ή ενός νησιού (Πλειστόκαινο) έως σήμερα (Dermitzakis & De Vos 1987; Meulenkamp 1985).

1.4 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων όλων των αναγνωρισμένων μορφολογικών ειδών του γένους *Albinaria* στην Κρήτη, με βάση την τελευταία ταξινομική αναθεώρηση των taxa του γένους στο νησί (Welter-Schultes 2010), προσβλέποντας α) στον έλεγχο της τρέχουσας συστηματικής και β) στην έναρξη μιας προσπάθειας συνολικής ταξινομικής αναθεώρησης και φυλογενετικής διερεύνησης του γένους, με απώτερο στόχο την απάντηση και άλλων ερωτημάτων που τα ίδια τα χαρακτηριστικά του γένους δημιουργούν (π.χ. υβριδισμός, ειδογένεση, οριοθέτηση των ειδών).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

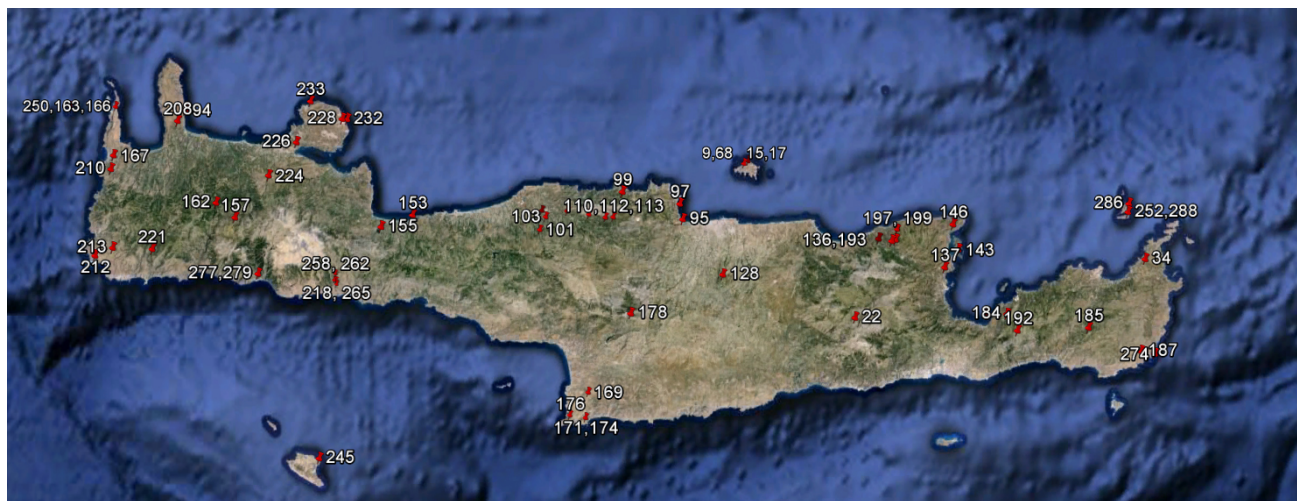
2.1 Συλλογή δειγμάτων

Ο σχεδιασμός της συλλογής των δειγμάτων βασίστηκε στην τελευταία ταξινομική αναθεώρηση του γένους *Albinaria* στην Κρήτη (Welter-Schultes 2010), συνδυάζοντας τη γνώση και την εμπειρία στο πεδίο ειδικών επιστημόνων (Δρ. Βαρδινογιάννη, Δρ. Μυλωνάς) του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ).

Αρχικός στόχος υπήρξε η αντιπροσώπευση όλων των διαφορετικών ειδών, καλύπτοντας δειγματοληπτικά και τις διαφορετικές περιοχές στις οποίες συναντώνται αυτά (διαφορετικούς

πληθυσμούς). Σε κάποιες περιπτώσεις που υπήρξε μικρή παρέκκλιση από την πιο πρόσφατη ταξινομική, συλλέχθηκαν δείγματα που προηγουμένως θεωρούνταν διαφορετικά είδη ώστε να ελεγχθεί αυτό και φυλογενετικά. Σκοπός αυτού του εγχειρήματος ήταν η αποφυγή της απώλειας πληροφορίας σε επίπεδο απλοτύπων και taxa, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε δυσκολία επίλυσης των φυλογενετικών σχέσεων των taxa που συναντώνται στην Κρήτη και τις νησίδες της. Στην Εικόνα 3 παρατίθεται ένας χάρτης στον οποίο σημειώνονται οι σταθμοί των δειγματοληψιών.

Στη συντριπτική τους πλειοψηφία, τα δείγματα συλλέχθηκαν σε δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν για την παρούσα διατριβή και αποθηκεύτηκαν απευθείας στους -20°C (βλ. Παράρτημα I). Σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τις επιστημονικές συλλογές του ΜΦΙΚ, τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε αιθανόλη 70% ή 100%. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν κάποιες αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων Genbank, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.



Εικόνα 3 Χάρτης των δειγματοληψιών. Με κόκκινες καρφίτσες σημειώνονται οι δειγματοληπτικοί σταθμοί στους οποίους αναγράφεται ο κωδικός των δειγμάτων που συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα εργασία (Παράρτημα I). Τα δείγματα 85 και 87, που προέρχονται από τα Κύθηρα και τη Σίφνο, αντίστοιχα, δεν απεικονίζονται στο χάρτη.

Πίνακας 1 Οι αλληλουχίες που αντλήθηκαν από τη γενετική βάση δεδομένων Genbank.

Είδος	Γονίδιο	Αρ. Καταχώρησης	Αναφορά
<i>Isabellaria saxicola</i>	16S	AF012080	(Douris <i>et al.</i> 1998c)
	ITS-1	AF254613	(Boettger 1883)
<i>A. caerulea</i>	16S	DQ665346	(Douris <i>et al.</i> 2007)
	ITS-1	AF136012	(Schilthuizen <i>et al.</i> 2004)
<i>A. discolor</i>	16S	DQ665354	(Douris <i>et al.</i> 2007)
	ITS-1	AD19820	(Schilthuizen <i>et al.</i> 1995)
<i>A. hippolyti</i>	16S	AF031679	(Douris <i>et al.</i> 1998a)

<i>A. cretensis</i>	ITS-1	AF136064	(Schilthuisen <i>et al.</i> 2004)
	16S	AF031672	(Douris <i>et al.</i> 1998a)
<i>A. ulrikae</i>	ITS-1	AF136019	(Schilthuisen <i>et al.</i> 2004)
	16S	AF031676	(Douris <i>et al.</i> 1998a)
<i>A. spratti</i>	ITS-1	AF136011	(Schilthuisen <i>et al.</i> 2004)
	16S	AF031675	(Douris <i>et al.</i> 1998a)
	ITS-1	AF136016	(Schilthuisen <i>et al.</i> 2004)

2.2 Εργαστηριακές αναλύσεις

Για τις εργαστηριακές αναλύσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του ΜΦΙΚ, χρησιμοποιήθηκαν όλες οι δυνατές προφυλάξεις, τόσο για τη δική μας ασφάλεια, όσο και για την αποφυγή μολύνσεων των δειγμάτων (αποστείρωση υλικών, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία αντιδραστηρίων, γάντια, σχολαστικός καθαρισμός).

Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν επιγραμματικά για τις εργαστηριακές αναλύσεις είναι:

A) εξαγωγή του ολικού γενωμικού DNA, συνήθως δύο δειγμάτων από κάθε διαφορετική τοποθεσία

B) πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και

Γ) προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης.

2.2.1 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA

Για την εξαγωγή του ολικού γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα α) το πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με οξικό αμμώνιο (ammonium acetate, NH₄Ac) και β) το πρωτόκολλο εξαγωγής “Holmes-Bonner” (Holmes & Bonner 1973), χρησιμοποιώντας ένα μικρό τμήμα ιστού από τον πόδα κάθε ζώου. Κάθε πρωτόκολλο που αναφέρεται στην παρούσα εργασία, μπορεί να διατεθεί σε οποιονδήποτε ενδιαφερόμενο λεπτομερέστερα, εφόσον ζητηθεί.

Για τον έλεγχο της απόδοσης της εξαγωγής του DNA, ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση 3μl του ολικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Συνήθως η εικόνα του DNA που λαμβανόταν υποδήλωνε καλής ποιότητας απομόνωση, όπως αναμένεται σε περιπτώσεις εξαγωγής γενετικού υλικού από καλά συντηρημένο ιστό.

2.2.2 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων (PCR)

Για τις φυλογενετικές αναλύσεις επιλέχθηκαν να εξεταστούν τμήματα δύο γονιδίων, ενός μιτοχondριακού και ενός πυρηνικού. Το μιτοχondριακό γονίδιο είναι αυτό που κωδικοποιεί τη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος (16S rRNA) και το πυρηνικό αποτελεί τμήμα της περιοχής ITS-1 (Internal Transcribed Spacer 1).

Οι συγκεκριμένοι δείκτες δεν επιλέχθηκαν τυχαία. Το γονίδιο του 16S rRNA χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε φυλογενετικές αναλύσεις για πολλές διαφορετικές ομάδες οργανισμών, δεδομένου ότι περιλαμβάνει περιοχές που εξελίσσονται γρήγορα, επομένως εξυπηρετεί τη διερεύνηση φυλογενετικών σχέσεων πρόσφατα διαχωρισμένων taxa, αλλά επίσης φέρει περιοχές αρκετά συντηρημένες, οι οποίες εξυπηρετούν τη διερεύνηση σχέσεων μεταξύ παλαιότερα διαχωρισμένων ταξινομικών μονάδων (Πουλακάκης 2005).

Στους ευκαρυώτες υπάρχουν δύο περιοχές ITS, οι ITS-1 και ITS-2, οι οποίες διαχωρίζουν τα 18S, 5.8S και 28S γονίδια ή τα ομόλογά τους και μία περιοχή ETS (External Transcribed Spacer) πριν το 18S. Οι ITS και ETS μη κωδικές περιοχές περιλαμβάνουν σήματα για την τροποποίηση του rRNA μεταγράφου (Hillis & Dixon 1991). Δεδομένης της μικρής εξελικτικής πίεσης που δέχεται μία μη κωδική αλληλουχία, η ITS-1 περιοχή παρουσιάζει σχετικά υψηλό βαθμό διαφοροποίησης ακόμα και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών και χρησιμοποιείται συχνά σε φυλογενετικές μελέτες. Όπως και για το 16S rRNA, εξαιτίας της χρησιμότητάς τους σε φυλογενετικές εργασίες, υπάρχουν δεδομένα για τις αλληλουχίες αυτές για πάρα πολλά taxa στη βάση δεδομένων GenBank, συμπεριλαμβανομένου του γένους *Albinaria*, πράγμα που αποτελεί ένα ακόμη κριτήριο στην επιλογή των γενετικών δεικτών. Μπορεί ο κάθε ενδιαφερόμενος να βρει αλληλουχίες για δείγματα που δεν έχει στην κατοχή του ή από τα οποία δεν έχει καταφέρει να πάρει αλληλουχίες καθώς και για taxa που μπορεί να χρησιμοποιήσει ως εξωομάδες.

Για τον πολλαπλασιασμό του 16S χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών (primers), οι 16S-1 και 16S-2 (Douris *et al.* 1998a) και για τρία δείγματα για τα οποία δεν ήταν εφικτός ο πολλαπλασιασμός του παραπάνω δείκτη με τους συγκεκριμένους εκκινητές, χρησιμοποιήθηκαν και οι εσωτερικότεροι PyrFor και PyrRev1 (Kornilios *et al.* 2009a) για nested PCR. Για το ITS-1 χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών, οι ITS1FOR και ITS1REV (Armbruster *et al.* 2000). Οι αλληλουχίες των εκκινητών και το κατά προσέγγιση μέγεθος του προϊόντος που παράγουν παρατίθενται στον Πίνακα 2. Οι συνθήκες των αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης για κάθε ζεύγος εκκινητών, ανά γονίδιο, δίδονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 2 Οι εκκινητές των γονιδίων που μελετήθηκαν για τους δύο γενετικούς δείκτες.

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία	Μέγεθος	Αναφορά
16S	16S-1	5'-CGACTGTTTAWCAAAAAT-3'	~422bp	(Douris <i>et al.</i> 1998a)
	16S-2	5'-GGTCTGAACTCAGATCATGT-3'		
	PyrFor	5'-GCCGCAGTACATTGACTGTGC-3'		
ITS-1	PyrRev1	5'-GCCTTAATCCAACATCGAGGT-3'	~320bp	Παρούσα εργασία (Kornilios <i>et al.</i> 2009b)
	ITS1-FOR	5'-TAACAAGGTTTCCGTATGTGAA-3'		
	ITS1-REV	5'-GCGTTCTTCATCGATGC-3'		

Πίνακας 3 Οι συνθήκες των αντιδράσεων των PCR και στα 3 ζεύγη εκκινητών για τα δύο γονίδια που μελετήθηκαν.

Γονίδιο	Όνομα	Συνθήκες			Συγκέντρωση MgCl ₂	
		Στάδιο	Θ°C	Χρόνος		
16S	16S-1	Denaturation	94	60 sec	3mM	
		16S-2	Annealing	50		60 sec
			Extension	72		60 sec
	PyrFor	Denaturation	94	60 sec		
		PyrRev	Annealing	50		60 sec
			Extension	72		60 sec
ITS-1	ITS1-FOR	Denaturation	94	60 sec	3mM	
		ITS1-REV	Annealing	54,9		60 sec
			Extension	72		60 sec

2.2.3 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (sequencing), τόσο του μιτοχονδριακού, όσο και του πυρηνικού δείκτη, προέκυψε από απευθείας αλληλούχηση των προϊόντων της PCR, αφού είχε προηγηθεί καθαρισμός τους με πρωτόκολλο καθαρισμού PCR με οξικό αμμώνιο (ammonium acetate). Ακολουθούσε και σε αυτή την περίπτωση ηλεκτροφόρηση 1μl DNA και ποσοτικοποίησή του ώστε να σταλεί η απαιτούμενη ποσότητα DNA για αλληλούχηση.

Διευκρινίζεται ότι η αλληλούχηση γινόταν απευθείας στο καθαρισμένο προϊόν της PCR καθώς πολύ συχνά, οι πυρηνικοί δείκτες απαιτούν και κλωνοποίηση, δεδομένης της ύπαρξης παραπάνω από δύο αλληλομόρφων για κάθε τόπο, το οποίο σε επίπεδο παραγόμενων αλληλουχιών και χρωματογραφημάτων εκφράζεται με την ύπαρξη πολλαπλών κορυφών και επομένως αδυναμία του προσδιορισμού της αλληλουχίας.

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση BigDye Terminator v.3.1 σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχησης ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). Η τεχνολογία και η διάταξη της συγκεκριμένης συσκευής (τριχοειδή σωληνάρια) αποτρέπει την ύπαρξη φαινομένων διάχυσης μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων και επομένως διασφαλίζει την αποτροπή της επιμόλυνσης.

Προσδιορίστηκαν αρχικά οι αλληλουχίες των δειγμάτων από την Κρήτη και τις νησίδες της για το 16S rRNA, μη συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων από τη Δία, των οποίων αλληλουχίες υπήρχαν από προηγούμενη δική μας εργασία. Η πρόχειρη ανάλυση των αλληλουχιών από το 16S στη συνέχεια αποτέλεσε κριτήριο, τόσο για την επιβεβαίωση της ορθότητας της αρχικής επιλογής του δεύτερου δείκτη, όσο και για την επιλογή των δειγμάτων (αριθμός, αντιπροσώπευση). Για το ITS1 μετά από την πρώτη αλληλούχηση του προϊόντος της PCR, η οποία και έδειξε ότι δεν χρειαζόταν η διαδικασία της κλωνοποίησης, αποφασίστηκε να σταλούν όλα τα δείγματα από τα οποία είχε ήδη αλληλουχηθεί το 16S.

2.2.4 Στοιχισμός των αλληλουχιών

Μετά τη διαδικασία της αλληλούχησης, αφού τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν προσεκτικά για τυχόν λάθη και διαφορούμενες κορυφές ακολούθησε η διαδικασία της στοιχιστικής (alignment). Για την καλύτερη στοιχιστική δοκιμάστηκαν αρχικά διάφορα λογισμικά το αποτέλεσμα των οποίων ελέγχθηκε παρατηρώντας τη στοιχιστική. Η στοιχιστική των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε εν τέλει και για τους δύο δείκτες με το λογισμικό MAFFT v.7 (Katoh & Standley 2013). Για το μιτοχονδριακό δείκτη 16S χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική Q-INS-i ενώ για τον πυρηνικό η στρατηγική E-INS-i.

2.2.5 Φυλογενετικές αναλύσεις

2.2.5.1 Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

Η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης, πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό jModelTest 0.1.1 (Posada 2008).

2.2.5.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων ανά ζεύγη πραγματοποιήθηκε με βάση το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993), με τη βοήθεια του φυλογενετικού προγράμματος MEGA v.5.05 (Tamura *et al.* 2011).

2.2.5.3 Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης και στατιστικός έλεγχος των παραγόμενων δέντρων

Για το σύνολο των δεδομένων (συνδυασμών δύο δεικτών) πραγματοποιήθηκαν οι εξής φυλογενετικές αναλύσεις: α) Σύνδεσης γειτόνων (ΣΓ) ή Neighbor-Joining (NJ), β) Μέγιστης

Πιθανοφάνειας (ΜΠ) ή Maximum Likelihood (ML) και γ) Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (ΜΣ) ή Bayesian Inference (BI).

Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα προγράμματα MEGA v.5.05 (Tamura *et al.* 2011), RAxML Blackbox (Stamatakis *et al.* 2008) και MrBayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), αντίστοιχα. Τα φυλογενετικά δέντρα των αναλύσεων ΣΓ και ΜΠ εξετάστηκαν ως προς τη στατιστική τους ισχύ με τη δοκιμασία των ψευδοεπαναλήψεων (bootstrap analysis), με 1000 και 100 ψευδοεπαναλήψεις, αντίστοιχα (Felsenstein 1985). Η ανάλυση ΜΣ πραγματοποιήθηκε με 4 ανεξάρτητα τρεξίματα (runs) και 8 ανεξάρτητες αλυσίδες (chains) για 5572000 γενεές (generations). Κάθε 100 γενεές αποθηκευόταν ένα δέντρο, ενώ απορρίφθηκαν τα πρώτα 5570 δέντρα με τη διαδικασία burn-in. Το συναινετικό δέντρο, ακολουθώντας τον κανόνα της πλειοψηφίας του 50% (50% majority rule) εκτιμήθηκε από την εκ των υστέρων κατανομή των δέντρων. Οι εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities) υπολογίστηκαν ως το ποσοστό των δέντρων που υποστηρίζουν έναν κλάδο λαμβάνοντας υπόψη ότι πιθανότητες ίσες ή μεγαλύτερες από 95% υποδεικνύουν σημαντική υποστήριξη (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενικά στοιχεία για το σύνολο δεδομένων και τις αλληλουχίες

Στο τελικό σύνολο δεδομένων που παρουσιάζεται, συμπεριλαμβάνονται 77 taxa. Τα επτά από αυτά προέρχονται από τη βάση γενετικών δεδομένων GenBank και αφορούν τέσσερα είδη της Κρήτης (*A. hippolyti*, *A. cretensis*, *A. ulrikae*, *A. spratti*), δύο είδη που κατανέμονται εκτός Κρήτης (*A. discolor*, *A. caerulea*) και το είδος *Isabellaria saxicola* το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα (Πίνακας 1). Για τα επτά taxa που προήλθαν από τη βάση δεδομένων, υπάρχουν και οι δύο γενετικοί δείκτες. Για τα υπόλοιπα taxa (70), στο σύνολό τους αλληλουχήθηκαν ως προς το 16S, ενώ για το ITS1 καταφέραμε να αλληλουχήσουμε 54 από τα 70. Στο Παράρτημα I υπάρχει ο πίνακας των 70 δειγμάτων στον οποίο παρουσιάζεται ο κωδικός αριθμός που τους έχουμε δώσει, ο κωδικός πεδίου (FC) και η τοποθεσία της δειγματοληψίας.

Για τις αλληλουχίες του 16S των taxa της Κρήτης, υπολογίστηκε ότι από τις 419 νουκλεοτιδικές θέσεις των στοιχισμένων αλληλουχιών α) 251 είναι συντηρημένες, β) 162 είναι πολυμορφικές, γ) 134 είναι πληροφοριακές υπό το κριτήριο της φειδωλότητας και δ) 26 ήταν πολυμορφικές ως προς ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Για τις αλληλουχίες του ITS1 δείκτη, συμπεριλαμβάνοντας μόνο τα taxa της Κρήτης, με τη βοήθεια του ίδιου προγράμματος,

υπολογίστηκε ότι από τις 602 νουκλεοτιδικές θέσεις α) 361 είναι συντηρημένες, β) 192 πολυμορφικές, γ) 148 πληροφοριακές υπό το κριτήριο της φειδωλότητας και δ) 42 είναι πολυμορφικές ως προς ένα νουκλεοτίδιο.

3.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Όλες οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των υπό εξέταση taxa εκτιμήθηκαν με το μοντέλο TrN (βλ. Παράρτημα II και III). Όταν συμπεριλαμβάνονται και τα δύο γονίδια στις αναλύσεις, καθώς επίσης και τα taxa εκτός Κρήτης, οι εκτιμώμενες γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 0% έως 39%. Η μέση γενετική απόσταση είναι 12%. Μηδενικές αποστάσεις παρουσιάζονται είτε μεταξύ taxa που ανήκουν στα ίδια μορφολογικά είδη, αλλά αφορούν δείγματα από διαφορετικές περιοχές, είτε μεταξύ διαφορετικών μορφολογικών ειδών, όπως στην περίπτωση των *A. janicollis* από το νησάκι Γιανυσάδα του συμπλέγματος των Διονυσάδων (252) και *A. janisadana* από το νησάκι Δραγονάδα του ίδιου συμπλέγματος (256), καθώς και μεταξύ των *A. ariadne* (103) και ορισμένων *A. cretensis* (101, αλληλουχία βάσης δεδομένων). Η υψηλότερη γενετική απόσταση παρουσιάζεται μεταξύ της εξωομάδας (*I. saxicola*) και της *A. hippolyti* από την περιοχή του Αλμυρού ποταμού (95). Εάν αφαιρεθούν τα taxa που δε συναντώνται στην Κρήτη (*A. discolor*, *A. turrita*, *A. caerulea*, *I. saxicola*), οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 0% έως 36%, με τη μέγιστη απόσταση να συναντάται μεταξύ των *A. sublamellosa* από την Αγία Ρουμέλη (279) και *A. hippolyti* από τον Αλμυρό ποταμό (95), καθώς και μεταξύ *A. pondika* από το Ποντικονήσι (250) και *A. cretensis* από το φαράγγι του Θερίσου (224). Η μέση γενετική απόσταση όλων των taxa της Κρήτης είναι 13%.

Στο Παράρτημα II, για λόγους οικονομίας χώρου και πρακτικότητας, παρουσιάζονται οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διαφορετικών μορφολογικών ειδών σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση (Welter-Schultes 2010), αφού ομαδοποιήθηκαν οι αλληλουχίες που προέρχονταν από τα ίδια είδη. Παρουσιάζονται επομένως οι γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες εκ των οποίων κάθε μία περιλαμβάνει το σύνολο των taxa του ίδιου μορφολογικού είδους για κάθε γονίδιο χωριστά. Παρακάτω, στον Πίνακα 4, παρατίθενται οι γενετικές αποστάσεις για το συνδυασμό των δύο γενετικών δεικτών, ανάμεσα σε ομάδες μορφολογικών που δημιουργήθηκαν βάσει της τοπολογίας του δέντρου που προέκυψε από την ανάλυση ΜΣ (Εικόνα 4).

3.2.1 Ο δείκτης 16S rRNA

Οι γενετικές αποστάσεις ανά ζεύγη για το τμήμα του 16S γονιδίου που πολλαπλασιάστηκε, συμπεριλαμβανομένων των taxa από περιοχές εκτός της Κρήτης, κυμαίνονται από 0% έως 39% επίσης. Η μέση γενετική απόσταση είναι 17%. Η μέγιστη γενετική απόσταση συναντάται μεταξύ της εξωομάδας *I. saxicola* και της *A. hippolyti* (95), αλλά και μεταξύ *A. janisadana* (286) και *A. cretensis* (224).

Μόνο για τα taxa της Κρήτης, οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 0% έως 39% και πάλι, με τη μέση γενετική απόσταση να είναι 15%. Μηδενική γενετική απόσταση συναντάται μεταξύ ορισμένων δειγμάτων που τοποθετούνται στο ίδιο είδος με μορφολογικά κριτήρια. Πιο συγκεκριμένα μεταξύ των *A. cretensis* α) από τη χώρα Σφακίων (218) και το φαράγγι της Ίμβρου (265), β) της Γραμβούσας (166) και των Πρασσών Ρεθύμνου (162), όπως επίσης και μεταξύ των *A. teres* α) από το Χαμαίτουλο προς Ξερόκαμπο της Σητείας (187) και το Καλό Χωριό του Αγίου Νικολάου (199) και β) από το Καλό Χωριό του Αγίου Νικολάου (199) και το φαράγγι του Καβουσίου της Ιεράπετρας (184), των *A. spratti* από το Μακρυγιάννη Μυλοποτάμου (112) και τον κάμπο Απλαδιανών Μυλοποτάμου (110), των *A. janicollis* από το νησάκι Γιανυσάδα των Διονυσάδων (252 και 288). Ωστόσο είναι εντυπωσιακό ότι μηδενικές αποστάσεις παρουσιάζουν και άτομα που ανήκουν σε διαφορετικά μορφολογικά είδη, όπως α) *A. janicollis* από τη Γιανυσάδα (288, 252) και *A. janisadana* από τη Δραγονάδα των Διονυσάδων (286), β) *A. cretensis* από τα Κυνηγιανά Μυλοποτάμου (101) και *A. ariadne* από τις Ορθές Μυλοποτάμου (103) και γ) *A. ariadne* (103) και *A. cretensis* από τη βάση δεδομένων. Ενδεικτικά, μικρές γενετικές αποστάσεις (1%) παρουσιάζονται μεταξύ άλλων και ανάμεσα στα εξής taxa: *A. teres* (187) -*A. manselli* (274), *A. teres* (185) -*A. sturanyi* (192), καθώς και ανάμεσα σε taxa του ίδιου είδους.

Οι μέγιστες γενετικές αποστάσεις, όταν δεν συμπεριλαμβάνονται τα taxa εκτός της Κρήτης, παρουσιάζονται α) ανάμεσα σε *A. janisadana* (286) και *A. cretensis* (224) από το φαράγγι του Θερίσσου και η οποία ανέρχεται στο 39%, β) ανάμεσα στο τελευταίο δείγμα και στην *A. pondika* (250) από το Ποντικονήσι (36%) και γ) ανάμεσα σε *A. hippolyti* (95) από το ποτάμι του Αλμυρού και *A. sublamelosa* (279) από την Αγία Ρουμέλη (36%).

3.2.2 Ο δείκτης ITS1

Οι γενετικές αποστάσεις για το τμήμα του δείκτη ITS1, συμπεριλαμβανομένων των taxa από περιοχές εκτός της Κρήτης, κυμαίνονται από 0% έως 21% με τη μέση γενετική απόσταση

να ανέρχεται στο 9%. Οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις παρατηρούνται ανάμεσα στην εξωομάδα (*I. saxicola*) και σε μέλη της ενδοομάδας [*A. terebra* από Λίσταρο προς τη Μονή Οδηγητριάς Μεσαρά (169), *A. cretensis* από το φαράγγι του Θερίσου (224) και τη Γραμβούσα (166), *A. janocollis* από τη Γιανυσάδα (252) και *A. teres* από τη Δία (9)].

Για τα taxa της Κρήτης, οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 0% έως 19% και η μέση γενετική απόσταση είναι 9%. Μηδενική γενετική απόσταση παρουσιάζουν κάποια δείγματα που ανήκουν στο ίδιο μορφολογικό είδος (π.χ. μεταξύ των *A. teres*, των *A. cretensis* των *A. candida* κ.α.) (Πίνακας 2 Παραρτήματος III). Αντίστοιχες αποστάσεις παρουσιάζουν και διαφορετικά μορφολογικά είδη μεταξύ τους, όπως η *A. janicollis* από τη Γιανυσάδα (288) και η *A. janisadana* από τη Δραγονάδα των Διονυσάδων (286), η *A. cretensis* από τα Κυνηγιανά Μυλοποτάμου (101) και η *A. ariadne* από το Πέραμα Μυλοποτάμου (107, 108) και από τις Μαργαρίτες Μυλοποτάμου (105) κ.α. (Πίνακας 2 παραρτήματος III). Οι μέγιστες γενετικές αποστάσεις, μη συμπεριλαμβανομένων των taxa εκτός Κρήτης για το συγκεκριμένο δείκτη, παρουσιάζονται ανάμεσα στο είδος *A. christae* από την περιοχή της Πλάκας προς Βρουχά Αγίου Νικολάου (146) και *A. terebra* από τους Καλούς Λιμένες (171) και το Μάρτσαλο (176).

Πίνακας 4 Πίνακας γενετικών αποστάσεων με βάση το μοντέλο TrN για το συνδυασμό των γενετικών δεικτών (16S & ITS1). Στον πίνακα συγκρίνονται ομάδες taxa όπως αυτά προέκυψαν από το φυλογενετικό δέντρο (κλάδοι με σημαντική στατιστική υποστήριξη).

Κλάδοι	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Κλάδος Δ												
2. Κλάδος Α	12,8											
3. Κλάδος Β1	15,3	12,1										
4. Κλάδος Γ1	17,1	13,4	13,0									
5. Κλάδος Β3	15,6	13,6	13,9	14,9								
6. Κλάδος Β5	13,1	12,0	11,5	13,2	12,9							
7. Κλάδος Β4	14,0	13,6	13,0	16,6	12,5	10,5						
8. Κλάδος Γ2	15,6	15,0	15,8	16,0	17,5	13,2	16,7					
9. Κλάδος Γ4	13,9	13,2	14,0	14,9	14,9	11,2	12,0	14,6				
10. Κλάδος Γ3	12,2	12,5	12,6	11,9	12,5	8,7	10,6	12,4	9,9			
11. <i>I. saxicola</i>	22,4	22,3	23,1	25,4	22,3	19,5	22,4	25,7	22,0	19,8		
12. Κλάδος Β2	15,5	13,6	13,0	16,1	14,5	11,7	13,0	18,5	14,7	12,5	21,9	
13. <i>A. caerulea</i>	13,6	11,1	13,0	12,9	12,6	10,7	11,5	15,1	12,1	10,8	18,9	13,4

3.3 Φυλογενετικές αναλύσεις

Οι τρεις φυλογενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για το συνδυασμό των δύο γενετικών δεικτών (Σύνδεσης Γειτόνων, Μέγιστης Πιθανοφάνειας και Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας) οδήγησαν σε φυλογενετικά δέντρα με σχεδόν ταυτόσημη τοπολογία. Για

το λόγο αυτό παρακάτω παρουσιάζεται το δέντρο που προέκυψε από την ανάλυση της ΜΣ, στο οποίο, εκτός από τις εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities, p.p.) αναφέρονται και οι τιμές στατιστικής υποστήριξης (bootstrap support, b.s.) των αναλύσεων ΣΓ και ΜΠ (Εικόνα 4). Γενικά, αναγράφονται μόνο οι εκ των υστέρων πιθανότητες που είναι μεγαλύτερες από 0,95, εφόσον αυτές θεωρούμε αποδεκτές σε σχέση με την υποστήριξη στους κλάδους στους οποίους αναφέρονται και εκείνες που θεωρήθηκαν σημαντικές. Επίσης, από τις αναλύσεις ΜΠ και ΣΓ, αναγράφονται οι τιμές των bootstraps που ήταν μεγαλύτερες από 50%.

3.3.1 Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία

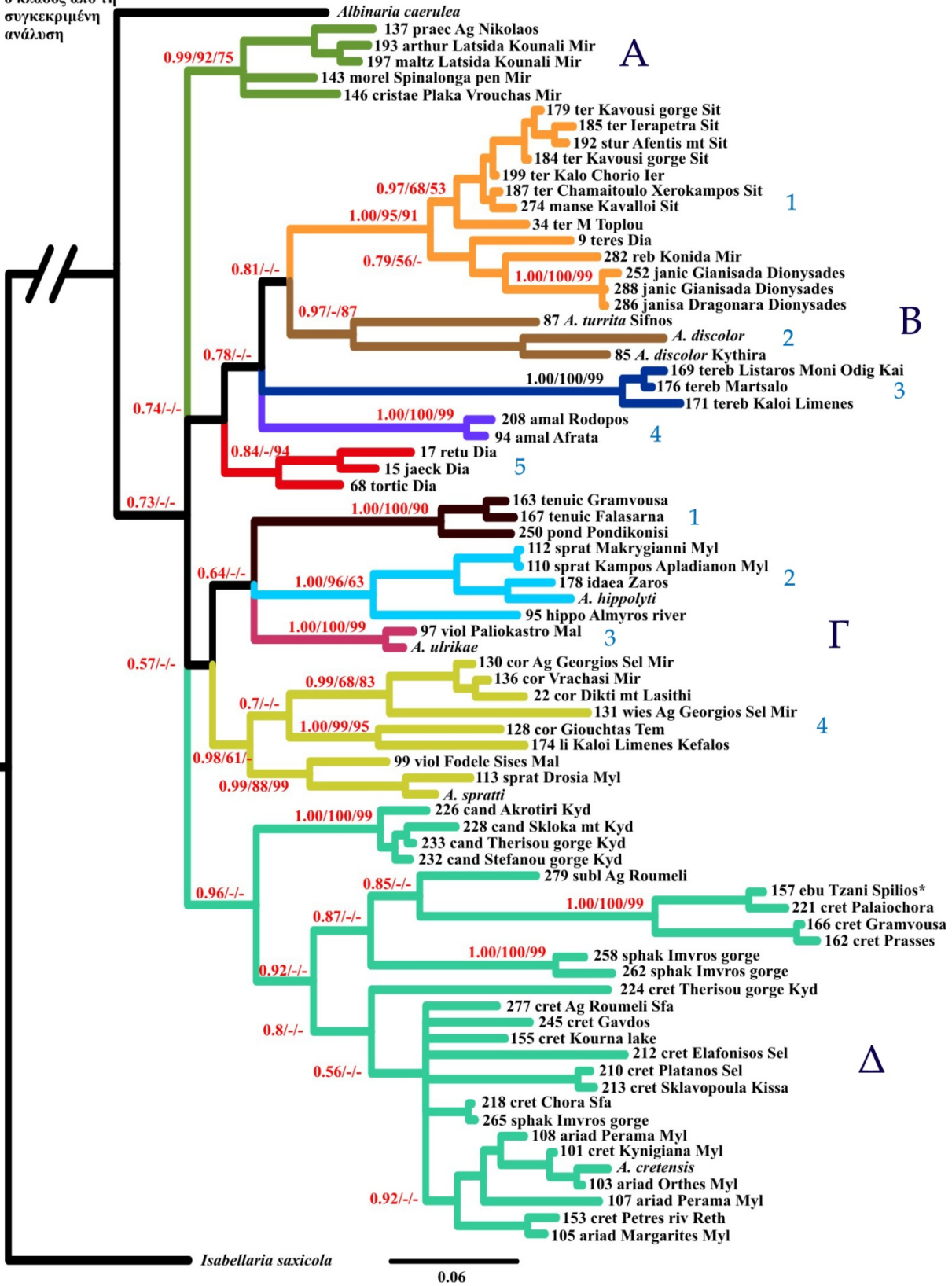
Το φυλογενετικό δέντρο της ΜΣ δίνεται στην Εικόνα 4 (αρμονικός μέσος της ανάλυσης ήταν $\ln L = -10105,45$). Η ανάλυση έτρεξε έχοντας επιλέξει με βάση το Akaike Informational Criterion (AIC) και το Bayesian Informational Criterion (BIC), το μοντέλο HKY+G, τόσο για 16S rRNA, όσο και για το ITS1.

3.3.2 Μέγιστη Πιθανοφάνεια και Σύνδεση Γειτόνων

Η ανάλυση της ΜΠ υπό το μοντέλο GTR+G και για τους δύο δείκτες έδωσε ένα δέντρο με τελικό βελτιστοποιημένο $\ln L = -9900,204721$, ενώ η ανάλυση της ΣΓ, βάσει του μοντέλου TrN, οδήγησε σε δέντρο με παρόμοια τοπολογία. Χαρακτηριστικό και των δύο αναλύσεων είναι οι σχετικά χαμηλές τιμές στατιστικής υποστήριξης, οι οποίες δίνονται στην Εικόνα 4.

BI/ML/NJ

-: <50 ή δεν υποστηρίζεται
ο κλάδος από τη
συγκεκριμένη
ανάλυση



Εικόνα 4 Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από την ανάλυση ΜΣ, στο οποίο αναγράφονται τα p.p. και τα b.s. των αναλύσεων ΜΣ, ΜΠ και ΣΓ (BI/ML/NJ).

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα των φυλογενετικών αναλύσεων και οι γενετικές αποστάσεις που προέκυψαν, αξιοποιώντας την πλούσια βιβλιογραφία που αναφέρεται στο γένος *Albinaria* ως άξονα αναφοράς, μπορούν να δώσουν τροφή για συζήτηση και να θέσουν μελλοντικούς στόχους σχετικά με την ταξινομική και φυλογενετική προσέγγιση του γένους.

4.1 Οι φυλογενετικές σχέσεις των taxa και η ταξινομική τους

4.1.1 Βαθμός διαφοροποίησης

Ο βαθμός διαφοροποίησης σε επίπεδο γενετικών αποστάσεων για το γένος *Albinaria* είναι πολύ υψηλός, αν τον συγκρίνουμε με άλλους οργανισμούς. Τα χερσαία μαλάκια όμως, αποτελούν μια ομάδα για την οποία ούτως ή άλλως το παραπάνω δεν είναι πρωτοφανές (Douris *et al.* 1998a; Goodacre & Wade 2001; Kornilios *et al.* 2009a; Parmakelis & Mylonas 2004; Thomaz *et al.* 1996). Ακόμα και συγκρινόμενο με άλλα γένη σαλιγκαριών όμως, το γένος *Albinaria* παρουσιάζει υψηλή διαειδική διαφοροποίηση. Δεδομένου ότι σε πολλές φυλογενετικές μελέτες χερσαίων σαλιγκαριών έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης το 16S rRNA, είναι ορθότερο να συγκρίνουμε τις γενετικές αποστάσεις άλλων γενών με βάση αυτόν. Για παράδειγμα, τα τρία ενδημικά είδη της Κρήτης του γένους *Mastus* που μελετήθηκαν από το νησιωτικό συγκρότημα του Κουφονησίου και τις νοτιοανατολικές ακτές της Κρήτης, διαφέρουν μεταξύ τους από 1% έως 21,8% για το δείκτη 16S (Parmakelis *et al.* 2003). Σε άλλη εργασία ωστόσο που έχει πραγματοποιηθεί για τα σαλιγκάρια του γένους *Zonites* από την Ελλάδα, οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 0% έως 40,4% και η μέση γενετική απόσταση είναι 22,2% (Kornilios *et al.* 2009a). Στην περίπτωση της *Albinaria*, οι γενετικές αποστάσεις των taxa όταν δε συμπεριλαμβάνεται η εξωομάδα *I. saxicola*, αλλά συμπεριλαμβάνουμε τα τρία taxa από την υπόλοιπη Ελλάδα (*A. caerulea*, *A. turrata*, *A. discolor*), για να υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης, κυμαίνονται από 0% έως 39% με τη μέση γενετική απόσταση να είναι 17%. Από τη βιβλιογραφία που εξετάστηκε, φαίνεται ότι παρουσιάζει από τις μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις που παρατηρούνται εντός κάποιου γένους σαλιγκαριών. Αν και από τις υπόλοιπες εργασίες στις οποίες προστρέξαμε για σύγκριση δεν μπορούμε να εξάγουμε απολύτως ασφαλή συμπεράσματα εξαιτίας των διαφορετικών γενετικών δεικτών που έχουν χρησιμοποιηθεί ή επειδή δεν παρουσίαζαν ξεχωριστά τις γενετικές αποστάσεις για το 16S rRNA, το γένος πέρα από μορφολογική ποικιλότητα, παρουσιάζει αξιοσημείωτη και εντυπωσιακή γενετική ποικιλότητα.

Στην εργασία που έχει δημοσιευτεί σχετικά με το γένος *Albinaria* στην Κρήτη (Douris *et al.* 1998a) και εξετάστηκαν 17 είδη και ένα πιθανό υβρίδιο για το μιτοχονδριακό δείκτη 16S, οι γενετικές αποστάσεις που προέκυψαν ανάμεσα στα taxa της Κρήτης αποκλειστικά, φτάνουν το 19,1% όπως προκύπτει από τον πίνακα που παρατίθεται, αν και στο κείμενο αναφέρεται ότι φτάνουν το 18%. Οι γενετικές αποστάσεις που προέκυψαν από την παρούσα εργασία για το 16S, όταν δε συμπεριλαμβάνονται η εξωομάδα και τα taxa από την υπόλοιπη Ελλάδα, φτάνουν το 39%. Η προσθήκη των υπόλοιπων μορφολογικών ειδών της Κρήτης στο σύνολο δεδομένων της εργασίας των Douris *et al.* (1998a), έδειξε πολύ μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις, με τη μέγιστη απόσταση σχεδόν να διπλασιάζεται. Αυτό ενδέχεται να αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι εφόσον μελλοντικά προστεθούν taxa από την υπόλοιπη κατανομή του γένους, η γενετική ποικιλότητα που θα αποκαλυφθεί θα είναι ακόμη εντυπωσιακότερη, μεγαλύτερη και από αυτή που παρατηρήθηκε μεταξύ των ειδών του γένους *Zonites*. Ασφαλώς δε στηριζόμαστε σε ένα γονίδιο για να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα, όμως όπως διευκρινίστηκε και παραπάνω, ο δείκτης 16S μας παρέχει ένα μέτρο σύγκρισης ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε το βαθμό διαφοροποίησης ανάμεσα σε διαφορετικά γένη.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, εκτός από το ότι τονίζουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του γένους, αναδεικνύουν και την ανάγκη ταξινομικής αναθεώρησης στην οποία εξαρχής αναφερθήκαμε, καθώς το εύρος των γενετικών αποστάσεων είναι υψηλό. Οι γενετικές αποστάσεις, δε στηρίζουν απόλυτα την τελευταία ταξινομική αναθεώρηση που βασίστηκε σε μορφολογικούς χαρακτήρες. Για παράδειγμα, βάσει μορφολογίας, αποτελούν διακριτά είδη τα taxa *A. sublamellosa* και *A. pondika* που απέχουν 27,4%, αλλά και τα taxa *A. janicollis* και *A. janisadana* που για το συνδυασμό των δεικτών 16S και ITS1 απέχουν μόλις 0,3%. Η σχεδόν μηδενική απόσταση που απέχουν τα 2 τελευταία είδη, μας βάζουν σε σκέψεις σχετικά με την προέλευση των δεδομένων και καθιστούν αναγκαία την μελλοντική ανάλυση περισσότερων δειγμάτων και από τα δύο είδη ώστε να επιβεβαιωθεί το παραπάνω αποτέλεσμα. Πόσο λογικό είναι όμως αυτό και ποιος είναι ο ρόλος των γενετικών αποστάσεων στον καθορισμό των ορίων των ειδών της *Albinaria*; Από την άλλη, υπάρχουν μορφολογικά είδη που κρύβουν μεγάλη γενετική ποικιλότητα όπως θα αναδειχθεί παρακάτω, π.χ. η *A. cretensis*¹, ενώ η μορφολογική τους ποικιλότητα δεν είναι αντίστοιχα υψηλή (Welter-Schultes 2010) συγκρινόμενη με άλλα

¹ Σε αυτό το σημείο, να σημειωθεί ότι ο ίδιος ο συγγραφέας της τελευταίας ταξινομικής αναθεώρησης Welter-Schultes (2010), κάνοντας τη βιβλιογραφική αναδρομή για την ομάδα της *A. cretensis* και εξετάζοντας τις αναθεωρήσεις που έχει υποστεί, αναγνωρίζει και επισημαίνει ότι για τη δυτική Κρήτη δεν έχει πραγματοποιηθεί τόσο λεπτομερής δουλειά όσο για την κεντρική και ανατολική σε επίπεδο δειγματοληψιών.

μορφολογικά είδη που παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές αλλά οι γενετικές τους αποστάσεις δεν αιτιολογούν το διαχωρισμό τους.

4.1.2 Οι σχέσεις των taxa της Κρήτης

Όπως διακρίνεται και από το φυλογενετικό δέντρο, γενικά οι σχέσεις των μορφολογικών ειδών της Κρήτης δεν είναι επιλυμένες, καθώς πέρα από τη χαμηλή στατιστική υποστήριξη που παρατηρείται, εμφανίζονται πολλές πολυφυλετικές περιπτώσεις. Στο σύνολό τους τα taxa έχουν μια γεωγραφική συνέπεια, με τη έννοια ότι δίνουν ένα ασθενές γεωγραφικό πρότυπο (ανατολής-δύσης) που αξίζει να σημειωθεί. Φυσικά, άξιες συζήτησης είναι και οι παρατηρήσεις που αφορούν τους εσωτερικότερους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου οι οποίοι στηρίζονται επαρκώς στατιστικά, καθώς και εκείνες που αφορούν ομάδες ειδών.

Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, ορισμένα ευρέως εξαπλωμένα είδη παρουσιάζονται πολυφυλετικά ή παραφυλετικά, γιατί μικροί πληθυσμοί ενδεχομένως αποσπάστηκαν πρόσφατα σχετικά από τους αρχικούς, απομονώθηκαν και εξελίχθηκαν σε νέα είδη (Giokas 2000; Schilthuizen & Gittenberger 1996).

Οι παρατηρήσεις που αφορούν υβριδισμό στο φυσικό περιβάλλον και οι περιπτώσεις υβριδισμού στο εργαστήριο ανάμεσα σε διαφορετικά μορφολογικά είδη, δημιουργούν ερωτήματα τόσο αναφορικά με την ειδογένεση στο γένος, όσο και σχετικά με την οριοθέτηση των ειδών, όπως αυτή αποτυπώνεται (προβληματικά) και στο φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από τις αναλύσεις μας. Φαίνεται ότι γενικά στην *Albinaria* δεν υπάρχουν ισχυροί συζευκτικοί φραγμοί. Η απουσία τους υποδεικνύει ότι πιθανότατα έχουν διαδραματίσει μικρό ρόλο στην εξέλιξη του γένους (Giokas *et al.* 2006).

Επίσης, έχει διαπιστωθεί έλλειψη συσχέτισης μεταξύ γενετικής διαφοροποίησης και συζευκτικής απομόνωσης (Giokas *et al.* 2006). Μία εξήγηση για τους ασθενείς μηχανισμούς συζευκτικής απομόνωσης είναι ότι πολλά από τα είδη, ιδιαίτερα αυτά των νησιών, είναι αλλοπάτρια και επομένως εξελίσσονται και παραμένουν απομονωμένα οπότε δεν ανέπτυξαν ισχυρούς φραγμούς, δεδομένου ότι η εξέλιξη των φραγμών συνήθως σχετίζεται με τη συμπατρία (Boettger 1878a). Στην Κρήτη βεβαίως με τη σημερινή της μορφή συναντούμε και συμπάτρια και παραπάτρια taxa *Albinaria*. Αυτό που αξίζει να κρατήσουμε πάντως είναι ότι υψηλές γενετικές αποστάσεις ή μικρές γενετικές αποστάσεις, δεν μπορούν να μας παραπέμψουν οπωσδήποτε στην ύπαρξη ή στην απουσία γενετικών φραγμών αντίστοιχα. Για τη διαφοροποίηση της *Albinaria* πάντως, παραμένει ζωντανό το σενάριο της μη προσαρμοστικής

διάσπασης (Gittenberger 1991), εφόσον δεν μπορούν να το καταρρίψουν κάποια επιστημονικά δεδομένα.

4.1.2.1 Εξωτερικοί κλάδοι, έμφαση στο δυτικό κλάδο και το σύμπλεγμα *A. cretensis*

Με μια πρώτη ματιά, στο δέντρο διακρίνονται τέσσερις κύριοι κλάδοι (Α, Β, Γ, Δ) εκ των οποίων οι δύο μόνο έχουν τέτοια υποστήριξη που να μας επιτρέπει να τους συζητήσουμε: ο κλάδος Α με $p.p. = 0,99$ (ΜΣ) και $b.s. = 92$ και 75 (ΜΠ και ΣΓ αντίστοιχα)², που περιλαμβάνει τα μορφολογικά είδη *A. praeclara*, *A. arthuriana*, *A. maltzani*, *A. moreletiana* και *A. christae* και ο κλάδος Δ με $p.p. = 0,96$ που περιλαμβάνει τα *A. candida*, *A. cretensis*, *A. eburnea*, *A. sphakiota*, *A. sublamellosa* και *A. ariadne*. Ο κλάδος Α περιλαμβάνει πέντε είδη από την ανατολική Κρήτη (περιοχή πρώην επαρχίας Μιραμπέλου) και η μέση γενετική διαφοροποίηση³ που παρατηρείται εντός του κλάδου είναι 6,7%, ενώ η μικρότερη απόσταση εντοπίζεται μεταξύ *A. arthuriana* και *A. maltzani* (2%) και η μεγαλύτερη μεταξύ *A. arthuriana* και *A. moreletiana* (10,9%). Ο κλάδος Δ περιλαμβάνει 6 διαφορετικά είδη (27 δείγματα) από τη δυτική Κρήτη (και κάποια από την κεντρική-δυτική) και παρουσιάζει μέση γενετική απόσταση 11%, με ελάχιστη απόσταση μεταξύ διαφορετικών taxa 0,3% (*A. ariadne* και *A. cretensis*) και μέγιστη 22,1% (*A. ariadne* και *A. sphakiota*).

Σχετικά με τον κλάδο Α, οι σχέσεις των μορφολογικών ειδών δεν είναι σαφείς όπως σε άλλες περιπτώσεις που θα δούμε στη συνέχεια. Βάσει της βιβλιογραφίας, η *A. praeclara* θεωρείται πολυτυπικό είδος και εμφανίζεται συγγενικό της *A. idaea* (Welter-Schultes 2010), πράγμα που δε συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα. Η *A. arthuriana* θεωρείτο παλιότερα υποείδος της *A. hippolyti* και πιθανότατα υβριδίζει με την *A. maltzani* (Welter-Schultes 2010). Ωστόσο, η σχέση της με την *A. hippolyti* δε στηρίζεται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, σε αντίθεση με τη μεγάλη συγγένεια που φαίνεται να εμφανίζει με τη *A. maltzani*, με τη γενετική τους απόσταση να είναι μόλις 2%. Γενικά οι *A. praeclara*, *A. arthuriana* και *A. maltzani* εμφανίζονται πολύ συγγενικές, γεγονός που στηρίζεται και από τις σχετικά μικρές γενετικές τους αποστάσεις (2%-4,5%). Η σχέση *A. praeclara* και *A. maltzani* επιβεβαιώνεται και από την εργασία των Douiris et al. (1998a). Ακόμα, η σχέση των παραπάνω με την *A. moreletiana* είναι υπαρκτή και στην προαναφερθείσα εργασία, ωστόσο δε φαίνεται να έχει εξεταστεί η σχέση αυτή μορφολογικά. Τέλος, για την *A. christae*, που συναντάται σε μία πολύ

² Εφεξής θα δίνονται με την ίδια σειρά και θα υπάρχουν διευκρινίσεις μόνο όταν λείπει κάποια από τις τιμές. Οι δεκαδικές τιμές αφορούν αποκλειστικά τις τιμές από την ανάλυση ΜΣ.

³ Όπου δε διευκρινίζεται, οι αποστάσεις αφορούν το συνδυασμό των δεικτών 16S και ITS1.

μικρή περιοχή κοντά στον Άγιο Νικόλαο, δεν αναφέρεται κάποια μορφολογική σύγκριση με άλλο είδος, ωστόσο φαίνεται να διαφέρει λίγο από την *A. moreletiana* (5,5% γενετική απόσταση) και την *A. maltzani* (6,3%) και ελαφρώς περισσότερο από την *A. arthuriana* (10,1%) και την *A. praeclara* (9,1%).

Παρατηρώντας τον κλάδο Δ που περιλαμβάνει δείγματα που συλλέχτηκαν από τη δυτική Κρήτη καθώς και τις γενετικές αποστάσεις των taxa, λαμβάνει κανείς ένα δείγμα της γενικότερης πολυπλοκότητας του γένους, όπως θα εκτυλιχθεί και παρακάτω. Το κλαδί που περιλαμβάνει την *A. candida* αποτελεί μία μονοφυλετική ομάδα με καλή στατιστική υποστήριξη (1,00, 100, 99) και με μέση γενετική απόσταση εντός του κλάδου αυτού είναι 2%. Η σχέση της *A. candida* με τα υπόλοιπα τάξα του κλάδου, λαμβάνοντας υπόψη τις μέσες γενετικές αποστάσεις, διαμορφώνονται ως εξής: από τις *A. cretensis* έχει απόσταση 11,7%, από τις *A. ariadne* 13,7%, από την *A. eburnea* 12,7%, από την *A. sublamellosa* 13,3% και από τις *A. sphakiota* 11%.

Το εύρος των γενετικών αποστάσεων εντός των taxa που έχουν εξαρχής αναγνωριστεί ως *A. cretensis* είναι μεγάλο: από 0,1% έως 17,6% και μέση γενετική απόσταση 10,5%. Το παραπάνω δημιουργεί σύγχυση σε πολλές περιπτώσεις, καθώς υπάρχουν άλλα μορφολογικά είδη μέσα στον κλάδο με μικρότερες γενετικές αποστάσεις από τις *A. cretensis* σε σχέση με αυτές που σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν μεταξύ τους. Πιο απομακρυσμένες φαίνεται να είναι οι *A. cretensis* 221 (Παλαιόχωρα), 166 (Γραμβούσα), 162 (Πρασές) και 245 (Γαύδος) σε σχέση με τις παρατηρούμενες γενετικές αποστάσεις. Η μέση γενετική απόσταση των *A. cretensis* από τα υπόλοιπα μορφολογικά είδη του κλάδου, εξαιρώντας τις *A. candida*, είναι από τις *A. ariadne* 9,5%, από την *A. eburnea* 12,7%, από την *A. sublamellosa* 11,9% και από την *A. sphakiota* 12,7%, δηλαδή κοντά ή ελαφρώς μεγαλύτερη από τη μέση απόσταση εντός του είδους.

Η τοπολογία της *A. eburnea*, παρ' όλο που στην περιοχή από την οποία τη συλλέξαμε (Σπήλαιο Τζανή) με βάση τη βιβλιογραφία υπάρχει *A. eburnea* και όχι *A. cretensis*, μας οδήγησαν στην υποψία ότι πρόκειται πιθανότατα για *A. cretensis*. Οι υπόλοιπες *A. cretensis* με τις οποίες συναποτελεί ένα καλά υποστηριγμένο κλαδί (221, 166, 162) είναι οι πιο απομακρυσμένες γενετικά. Από άλλη εργασία που έχει πραγματοποιηθεί για την Κρήτη και έχουν συμπεριληφθεί δύο δείγματα *A. eburnea* φαίνεται ότι οι αποστάσεις τους από τις *A. cretensis* είναι μικρές, από 7,5% έως 8,9% για το 16S και τοποθετούνται στο ίδιο πολυφυλετικό κλαδί με την *A. cretensis* (Douris *et al.* 1998a). Φυσικά δεν μπορούμε να γνωρίζουμε εάν τα δείγματα αυτά ήταν ορθά αναγνωρισμένα, ωστόσο αυτό αποτελεί ένδειξη ότι δεν πρόκειται οπωσδήποτε για λάθος αναγνώριση στην παρούσα εργασία, καθώς οι γενετικές αποστάσεις, για

το 16S μόνο, που έχει το συγκεκριμένο δείγμα (157) από τις *A. cretensis* είναι μεγαλύτερες από αυτές που παρατηρούνται στην εργασία των Douiris *et al.* (1998a). Συγκεκριμένα, παρουσιάζει πολύ μικρή γενετική απόσταση με ένα μόνο δείγμα, το 221 από Παλαιόχωρα (2,5%), αλλά με όλα τα υπόλοιπα έχει γενετικές αποστάσεις από 13,4% έως 22,6%.

Η *A. sublamellosa* έχει αντίστοιχες με τις προαναφερθείσες αποστάσεις από τα υπόλοιπα μορφολογικά είδη: 9,5% με τις *A. sphakiota*, 11,9% με τις *A. cretensis* και 12,7% με τις *A. ariadne*. Οι *A. sphakiota* (258, 262, 265) που φαίνονται, αν και χωρίς στατιστική υποστήριξη, πολυφυλετικές, παρουσιάζουν αντίστοιχες αποστάσεις, από 9,5% έως 13,8% με την *A. sublamellosa* και έως 13,6% με την *A. ariadne*. Σχετικά με την πολυφυλία που παρουσιάζεται, το δείγμα 265 αν και συλλέχθηκε ως *A. sphakiota* από το φαράγγι της Ίμβρου, όπως και τα υπόλοιπα δείγματα, αποτελεί κατά πάσα πιθανότητα *A. cretensis* καθώς το συγκεκριμένο προέρχεται από την έξοδο του φαραγγιού στην οποία τα δύο μορφολογικά είδη είναι συμπάτρια. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με ένα δείγμα από την είσοδο του φαραγγιού το οποίο δεν συμπεριλήφθηκε στις τελικές αναλύσεις. Το γεγονός επισημαίνεται γιατί προξενεί εντύπωση το πως διαφοροποιείται, αλληλεπικαλύπτεται και εναλλάσσεται ενίοτε η κατανομή των ειδών του γένους σε ορισμένα μέρη, όπως το φαράγγι, όπου στην είσοδο συλλέξαμε *A. cretensis*, κατά μήκος *A. sphakiota* και στην έξοδο πάλι *A. cretensis*. Γενικά, κάποια από τα είδη έχουν πολύ εντοπισμένη κατανομή, ενώ άλλα έχουν ευρύτερη εξάπλωση. Η *A. sphakiota* εντοπίζεται σε κάποια φαράγγια των νότιων Λευκών Ορέων συμπάτρια με την *A. cretensis* και την *A. sublamellosa* (Welter-Schultes 2010). Εδώ με την ευκαιρία να σημειωθεί ότι ακόμη και για κάποιον που έχει εξοικείωση με την εξέταση των μορφολογικών χαρακτήρων, υπάρχουν είδη που είναι δυσδιάκριτα στο πεδίο.

Το μορφολογικό είδος *A. ariadne* συνιστά ένα εσωτερικότερο πολυφυλετικό κλαδί, το οποίο υποστηρίζεται στατιστικά επαρκώς (0,92). Όπως αναφέρθηκε, η μέση γενετική ποικιλότητα εντός όλων των *A. cretensis* είναι 10,5%. Εντός των *A. ariadne* είναι 7,8% ενώ η μέση γενετική απόσταση μεταξύ τους είναι 9%. Το εύρος στις μεταξύ τους αποστάσεις είναι μεγάλο, από 0% έως 19,3%. Λαμβάνοντας υπόψη και το τεράστιο εύρος γενετικών αποστάσεων που υπάρχει μέσα στις *A. cretensis*, αντιλαμβανόμαστε ότι η μέση απόσταση από τις *A. ariadne* (9%) δεν είναι πολύ μεγάλη. Πιο συγκεκριμένα όμως μέσα στο κλαδί που περιλαμβάνει τις τέσσερις *A. ariadne* και τις τρεις *A. cretensis* (101, 153, αλληλουχία βάσης δεδομένων) η μέση γενετική απόσταση είναι 5,7% και οι αποστάσεις κυμαίνονται από 0,3% έως 9%, ενώ οι *A. ariadne* μεταξύ τους παρουσιάζουν αποστάσεις μέχρι 13,4%.

Ο δυτικός κλάδος, αφήνοντας την *A. candida* προς το παρόν εκτός συζήτησης, υπογραμμίζει το πρόβλημα της ταξινόμικής εντός του αποκαλούμενου "*A. cretensis* group" ή "*A. cretensis* complex". Διάφορα taxa έχουν τοποθετηθεί, απορριφθεί και επανατοποθετηθεί σε αυτό το σύμπλεγμα ειδών μέσα από τις αναθεωρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί. Για λόγους οικονομίας αυτές δε θα αναφερθούν, καθώς παρουσιάζονται στην εργασία του Welter-Schultes (2010). Θα αναφερθεί μόνο ότι σε εργασία του 2004 στο σύμπλεγμα συμμετέχουν έξι taxa: *A. cretensis*, *A. byzantina*, *A. troglodytes*, *A. virginea*, *A. tenuicostata* και *A. sphakiota* (Nordsieck 2004), αφού προηγουμένως έχει διατυπωθεί ότι οι *A. sphakiota* και *A. cretensis* είναι αναπαραγωγικά απομονωμένες (Gittenberger *et al.* 2001). Ο Welter-Schultes (2010) καταλήγει στο ότι *A. cretensis*, *A. byzantina*, *A. troglodytes* και *A. virginea* πρέπει να αντιμετωπίζονται ως ένα είδος, αλλά δεν τοποθετεί στην ίδια κατηγορία τις *A. tenuicostata* και *A. sphakiota*, οι οποίες θεωρεί ότι δε θα πρέπει να ανήκουν στο σύμπλεγμα *A. cretensis*. Αξίζει να σημειωθεί ότι το είδος *A. cretensis* φαίνεται να είναι πολυφυλετικό και σε παλιότερες εργασίες (Schilthuizen & Gittenberger 1996; Γκιώκας 1996). Τα δικά μας αποτελέσματα ενδεχομένως περιπλέκουν ακόμα περισσότερο το ζήτημα, καθώς όπως φαίνεται, παρ' όλο που αντιμετωπίσαμε τα μορφολογικά είδη όπως ο Welter-Schultes (2010), τόσο η *A. sublamellosa*, όσο και οι *A. sphakiota* και *A. ariadne*, ενδεχομένως και η *A. eburnea* τοποθετούνται μέσα στο κλαδί των *A. cretensis*, με την *A. tenuicostata* ωστόσο να φαίνεται ότι αποτελεί ξεχωριστό κλάδο που δεν ανήκει στην ομάδα της *A. cretensis*.

Με αφορμή τις παραπάνω παρατηρήσεις, μπορεί να πραγματοποιηθεί μεγάλη συζήτηση καθώς η ταξινόμική του γένους από το πρώτο σχεδόν κλαδί που εξετάσαμε, συναντά ένα σημαντικό ζήτημα της Βιολογίας, το γνωστό "species delimitation" (οριοθέτηση του είδους). Το γένος *Albinaria* μπορεί να προσφέρει ποσότητα "τροφής" και προβληματισμού για να μελετήσει κανείς το ζήτημα της οριοθέτησης των ειδών. Είναι εξαιρετικά δύσκολο, τουλάχιστον με τα δεδομένα αυτής της εργασίας, να οριοθετήσει κανείς τα διαφορετικά είδη του συμπλέγματος *A. cretensis* και όχι μόνο. Οι γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στα taxa που περιλαμβάνει το κλαδί των *A. cretensis* δε βοηθούν πολύ στην εξαγωγή συμπερασμάτων, καθώς παρατηρείται σε γενικές γραμμές όλα τα taxa να ισαπέχουν μεταξύ τους (Πίνακας 5). Το ίδιο παρατηρείται και σε σχέση με την *A. candida* και τα υπόλοιπα taxa, που αρχικά αποκλείσαμε από τη συζήτηση για να αναφερθούμε αναλυτικά την περίπτωση της *A. cretensis*.

Πίνακας 5 Πίνακας γενετικών αποστάσεων κλάδου Δ (δυτικός)

	1	2	3	4	5
1. <i>A. cretensis</i>					
2. <i>A. ariadne</i>	9,48				
3. <i>A. candida</i>	11,67	13,70			
4. <i>A. sublamellosa</i>	11,92	12,65	9,39		
5. <i>A. eburnea</i>	12,72	15,84	12,13	10,73	
6. <i>A. sphakiota</i>	12,72	13,58	10,96	9,53	12,59

4.1.2.2 Οι εσωτερικότεροι κλάδοι

Όπως προαναφέρθηκε, οι δύο μεσαίοι εξωτερικοί κλάδοι του δέντρου, Β και Γ, δεν έχουν καλή στατιστική υποστήριξη κι επομένως δεν μπορούν να συζητηθούν ως σύνολο. Μπορούμε ωστόσο να αναφέρουμε για τον **κλάδο Β** ότι περιλαμβάνει δείγματα από την ανατολική Κρήτη κυρίως και λιγότερο από την κεντρική (νότιο Ηράκλειο και Δία), με σημαντική εξαίρεση τις *A. turrita* και *A. discolor*, από τη Σίφνο και τα Κύθηρα αντίστοιχα και την *A. amalthea* που είναι ένα taxon που κατανέμεται στη δυτική Κρήτη και θα ανέμενε κάποιος να βρίσκεται στον κλάδο Δ.

Ο υποκλάδος Β1, με υποστήριξη (1,0, 95, 91), περιλαμβάνει τα taxa *A. teres*, *A. sturanyi*, *A. manselli*, *A. rebeli*, *A. janicollis* και *A. janisadana* της ανατολικής Κρήτης. Η μέση γενετική απόσταση εντός του κλαδιού είναι 4,9%, παρ' όλο που περιλαμβάνει έξι διαφορετικά taxa. Οι αποστάσεις κυμαίνονται από 0% έως 10,9%. Αν συγκρίνουμε τις αποστάσεις αυτές με εκείνες που συναντήσαμε στον κλάδο Δ της δυτικής Κρήτης διαπιστώνουμε ότι είναι μικρές. Η *A. teres* είναι -όπως και η *A. cretensis*- από τα taxa με ευρεία εξάπλωση. Εξαπλώνεται λοιπόν στην ανατολική Κρήτη και παρουσιάζει αρκετή ετερομορφία όπως μπορούμε να συμπεράνουμε από τις πολλές αναθεωρήσεις που έχει υποστεί, αλλά και από την πρόσφατη εργασία του Welter-Schultes (2010) στην οποία όμως αναφέρεται ότι είναι πολύ δύσκολο η ετερομορφία αυτή να ομαδοποιηθεί και να οδηγήσει σε υποδιαιρέσεις του taxon. Από την πλευρά της γενετικής ποικιλότητας, τα επτά δείγματα *A. teres* που έχουν συμπεριληφθεί στις αναλύσεις μας, δε διαφέρουν πολύ: μέση γενετική ποικιλότητα 2,9%, ελάχιστη 0,1% και μέγιστη 6,6%, η οποία παρατηρείται μεταξύ του δείγματος από την Ιεράπετρα (185) και αυτού από τη Δία (9), το οποίο μάλιστα φαίνεται πιο συγγενικό με το κλαδί των *A. rebeli*, *A. janicollis* και *A. janisadana*.

Στο "*A. teres complex*" έχουν συμπεριληφθεί κατά καιρούς διάφορα taxa. Αυτό όμως που έχει αξία να σχολιάσουμε με βάση το δέντρο που έχει προκύψει και την υπάρχουσα ταξινομική, είναι η σχέση της με τα υπόλοιπα taxa που περιλαμβάνονται στον υποκλάδο Β1. Η

A. sturanyi αναφέρεται παραπάτρια της *A. teres* με την οποία συνδέεται με μια στενή ζώνη υβριδισμού όπου βρίσκονται ενδιάμεσα μορφολογικά κελύφη. Μορφολογικά είναι πολύ πιο κοντά όμως με την *A. rebeli* και αυτός είναι ο λόγος που δεν τοποθετήθηκε ταξινομικά στην *A. teres* κατά τον κατά τον Welter-Schultes (2010). Η μέση γενετική απόσταση από τις *A. teres* είναι 2,3%, με ελάχιστη 0,9% και μέγιστη 5,9% από το δείγμα της Δίας.

Η *A. manselli* συναντάται σε μία περιορισμένη περιοχή, κοντά στον Ξερόκαμπο Λασιθίου, που περιλαμβάνει και τις νησίδες των Καβάλλων και μορφολογικά είναι πολύ συγγενική της *A. teres* (Welter-Schultes 2010), της οποίας μάλιστα αποτελούσε υποείδος παλιότερα, με το επιχείρημα ότι μία ραβδωτή πρωτοκόγχη δεν είναι αρκετή για να διαχωρίσει την *A. manselli* από την *A. teres* (Mylonas *et al.* 1987). Το τελευταίο επισημαίνεται για να αναδείξουμε ότι πολλές φορές οι μορφολογικοί - και όχι μόνο- χαρακτήρες, εμπίπτουν έντονα στην υποκειμενικότητα του ερευνητή και επομένως, ιδιαίτερα στο συγκεκριμένο γένος με το οποίο έχουν εμπλακεί πολλοί διαφορετικοί επιστήμονες, ενδέχεται να έχουν γίνει άλλοτε υπερβολικές διασπάσεις ειδών υπερεκτιμώντας κάποιες μορφολογικές διαφορές και άλλοτε το αντίθετο. Η μέση γενετική απόσταση της *A. manselli* από την *A. teres* και την *A. sturanyi* είναι μικρή (3,2%). Η γενεαλογική γραμμή που περιλαμβάνει τα παραπάνω taxa μέσα στον υποκλάδο B1, έχει και σημαντική υποστήριξη (0,97, 68, 53). Το αξιοπερίεργο είναι ότι δεν συμπεριλαμβάνεται μέσα σε αυτόν τον υποκλάδο το taxon της *A. teres* από τη Δία. Βάσει αυτού, αν θεωρήσουμε τις *A. sturanyi* και *A. manselli* συνώνυμες της *A. teres*, όπως υποστηρίζεται από το φυλογενετικό δέντρο και τη μεταξύ τους γενετική διαφοροποίηση, η *A. teres*, αποτελεί μια παραφυλετική ομάδα.

Αν εξετάσουμε και τις σχέσεις με τη γενεαλογική γραμμή που περιλαμβάνει την *A. teres* από τη Δία, την *A. rebeli*, τις *A. janicollis* και την *A. janisadana*, καθώς και τις αποστάσεις τους από την παραπάνω τη γενεαλογική γραμμή, θα διαπιστώσουμε ότι και αυτές είναι μικρές. Ο Nordsieck (1999) αλλά και ο Welter-Schultes (2010) έχουν διατυπώσει τη μορφολογική συγγένεια της *A. janisadana* με την *A. teres*. Ο τελευταίος επίσης θεωρεί την *A. rebeli* πολύ συγγενική της *A. teres*. Η γενεαλογική γραμμή της *A. teres* που περιλαμβάνει και την *A. manselli* και την *A. sturanyi*, απέχει 5,3% από την *A. teres* της Δίας, 7,7% από την *A. rebeli*, 6,7% από τις *A. janisadana* και *A. janicollis* και 10,3% (η μεγαλύτερη απόσταση) από την *A. manselli*. Οι αποστάσεις αυτές είναι τέτοιες που θα δικαιολογούσαν όλα αυτά τα taxa να ανήκουν στο ίδιο είδος ενδεχομένως.

Ο υποκλάδος B2 περιλαμβάνει δύο είδη από τη Σίφνο και τα Κύθηρα που όπως φαίνεται υπεισέρχονται εντός των κρητικών taxa. Η μονοφυλετικότητα των κρητικών taxa δεν τίθεται για

πρώτη φορά υπό αμφισβήτηση (Giokas 2000). Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι υπάρχουν εργασίες που υποστήριξαν τη μονοφυλετικότητά τους (Schilthuizen & Gittenberger 1996), άλλες που την έθεσαν σε αμφισβήτηση χωρίς να πάρουν σαφή θέση (Sauer & Hausdorf 2010; Γκιώκας 1996) και κάποιες που την απέρριψαν (Douris *et al.* 1998a). Ο Nordsieck (1999) υποστήριξε ότι οι *A. janisadana*, *A. sturanyi* και *A. rebeli*, έχουν σχέση με την *A. caerulea* και κάποια είδη από τις Κυκλάδες. Οι Douris *et al.* (1998a) βρήκαν τα κρητικά taxa μη μονοφυλετικά, αφού τόσο taxa από τις Κυκλάδες, όσο και από την ηπειρωτική Ελλάδα εισχωρούν σε αυτά.

Ο υποκλάδος B3 περιλαμβάνει την *A. terebra* για την οποία δεν έχει περιέργως περιγραφεί κανένα επιπλέον taxon μετά το 1853 (Welter-Schultes 2010), το οποίο ίσως έχει κάποια αξία ως παρατήρηση, με την έννοια ότι θεωρείται ένα ξεκάθαρα διαφορετικό μορφολογικό είδος. Η θέση των δειγμάτων *A. terebra* στον κλάδο B δεν υποστηρίζεται βεβαίως, αλλά είναι ενδεικτικό ότι δεν ομαδοποιούνται με κάποιο άλλο κλάδι εντός του κλάδου. Μεταξύ τους οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 0,7% έως 2,4%, ενώ η μέση γενετική απόσταση από όλα τα taxa του κλάδου είναι 13,7%, με ελάχιστη 11,1% με την *A. janicollis* και μέγιστη 20,5% με την *A. manselli*.

Ο υποκλάδος B4 περιλαμβάνει την *A. amalthea* που γεωγραφικά δεν παρουσιάζει κάποια συνάφεια με τα υπόλοιπα taxa, αφού προέρχεται από τη δυτική Κρήτη. Η *A. amalthea* έχει τοποθετηθεί στο σύμπλεγμα της *A. candida* (μαζί με την *A. pondika*) και έχει ενσωματωθεί σε αυτή και η *A. xanthostoma* (Welter-Schultes 2010), κάτι με το οποίο τα αποτελέσματά μας προφανώς δε συμφωνούν. Ωστόσο σύμφωνα με τον Welter-Schultes (2010) διαχωρίζεται τόσο από την *A. candida*, όσο και από την *A. tenuicostata*. Το taxon αυτό έχει μέση απόσταση 12,2% από τα υπόλοιπα του κλάδου B, με μικρότερη απόσταση 9,9% από την *A. jaeckeli* και μέγιστη 21,8% από την *A. manselli*.

Τέλος, ο κλάδος B περιλαμβάνει τον υποκλάδο B5 με τα ενδημικά taxa της Δίας που αποτελούν μία μάλλον μονοφυλετική ομάδα (υποστηρίζεται ισχυρά μόνο από την ανάλυση ΣΓ, b.s. = 94). Γενικά τα ενδημικά είδη της Δίας εμφανίζουν σχετικά μικρή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ τους (4,9%), παρά τις έντονες μορφολογικές διαφορές που παρουσιάζουν. Οι γενετικές τους αποστάσεις από τους υπόλοιπους υποκλάδους (1, 2, 3 και 4) κυμαίνονται από 10,5% έως 12,9%.

Ο κλάδος Γ που επίσης δεν υποστηρίζεται ισχυρά, περιλαμβάνει ως επί το πλείστον taxa που εξαπλώνονται στην κεντρική Κρήτη. Περιλαμβάνει 4 κλαδιά με καλή υποστήριξη τα οποία θα συζητήσουμε εκτενέστερα. Η μέση γενετική απόσταση εντός του κλάδου Γ, παρ' όλο που δεν υποστηρίζεται, υπολογίστηκε και είναι 12%.

Οι υποκλάδοι 1, 2 και 3 δε συνιστούν κλάδο με καλή στατιστική υποστήριξη ώστε να μπορούμε να τους συζητήσουμε μαζί. Ο υποκλάδος Γ1 (1,0, 100, 90), περιλαμβάνει τα μορφολογικά είδη *A. tenuicostata* και *A. pondika* από τη δυτική Κρήτη. Τα δύο δείγματα *A. tenuicostata* (163, 167) απέχουν γενετικά μεταξύ τους 1%. Η *A. pondika* (250) απέχει 7% και 8% από τα άτομα της *A. tenuicostata* αντίστοιχα. Γενικά είναι ένα από τα taxa που εμφανίζει μερικές από τις υψηλότερες γενετικές αποστάσεις που παρατηρούνται όταν συγκρίνεται με άλλα μορφολογικά είδη (βλ. Παράρτημα II). Η *A. pondika* σύμφωνα με τον Welter-Schultes (2010) τοποθετείται στο σύμπλεγμα της *A. candida*, μαζί με την *A. amalthea*, κάτι που δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί από τα δικά μας αποτελέσματα και αποτελεί το νέο είδος που περιέγραψε στην εργασία του. Η *A. tenuicostata* όπως έχει ήδη αναφερθεί θεωρείται, με βάση τους μορφολογικούς χαρακτήρες, ότι ανήκει στο σύμπλεγμα της *A. cretensis* (Nordsieck 2004) οπότε και στην εργασία του Welter-Schultes (2010) συγκρίνεται με αυτή. Ωστόσο, τόσο λόγω της γεωγραφικής συνάφειας των *A. tenuicostata* και *A. pondika*, όσο και λόγω των γενετικών αποστάσεων και της ομαδοποίησής τους στο δέντρο, υπάρχουν ενδείξεις ότι ενδέχεται να πρέπει να τοποθετηθούν στο ίδιο είδος.

Ο υποκλάδος Γ2 (1,0, 96, 63), περιλαμβάνει τα μορφολογικά είδη *A. spratti*, *A. idaea* και *A. hippolyti*. Η *A. spratti* εμφανίζεται πολυφυλετική, καθώς υπάρχουν taxa *A. spratti* και στον υποκλάδο Γ4, όπου ομαδοποιείται με την *A. violacea*. Η *A. idaea* είναι ένα καλά μελετημένο είδος μορφολογικά, στο οποίο στο παρελθόν αναγνωρίζονταν πολλά υποείδη. Η *A. hippolyti*, είναι ένα επίσης καλά μελετημένο taxon με αναγνωρισμένες ζώνες επαφής μεταξύ των υποειδών του (Schilthuizen *et al.* 2004) που παρουσιάζει υψηλές γενετικές αποστάσεις από ορισμένα taxa της Κρήτης. Σύμφωνα και με την τελευταία αναθεώρηση του γένους αλλά και τις παλαιότερες, εμφανίζεται ως πολυτυπικό είδος με πέντε διακριτά υποείδη (Welter-Schultes 2010). Η μέση γενετική απόσταση στον υποκλάδο Γ2 είναι 11%. Όπως διακρίνεται και από το δέντρο, το πιο απομακρυσμένο taxon είναι αυτό της *A. hippolyti* από το Ηράκλειο (95) το οποίο παρουσιάζει αποστάσεις από 13% (με την *A. idaea*) έως 19% και 20% (με τις *A. spratti*). Οι δύο *A. hippolyti* μεταξύ τους έχουν απόσταση 14%, τόσο για τους δύο δείκτες, όσο και το 16S χωριστά. Από την εργασία των Douris *et al.* (1998a) φαίνεται ότι οι αποστάσεις ανάμεσα στις *A. hippolyti* κυμαίνονται από 0,5% έως 9,5% για το 16S. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η *A. hippolyti* της βάσης δεδομένων έχει πολύ μικρή γενετική απόσταση από την *A. idaea* (3%) και τη σχετικά αυξημένη γενετική απόσταση μεταξύ των δύο *A. hippolyti*, θεωρούμε ότι ίσως πρόκειται για λανθασμένη αναγνώριση του taxon της βάσης δεδομένων. Οι *A. spratti* μεταξύ τους διαφέρουν κατά 3% και η μέση τους απόσταση από την *A. idaea* είναι 13%. Πρόκειται γενικά για μια ομάδα με taxa που

έχουν αποστάσεις από 12% έως 20%, οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν αρκετά μεγάλες. Έχοντας επιπλέον ως δεδομένο ότι για τα συγκεκριμένα taxa δεν έχουμε μορφολογικά στοιχεία που να υποστηρίζουν τη μεταξύ τους συγγένεια καθώς και ότι η *A. spratti* παρουσιάζει πολυφυλετικότητα, δε θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι έχουμε σαφείς ενδείξεις που να μας επιτρέπουν την υπόδειξη κάποιας συγκεκριμένης ταξινομικής αλλαγής.

Στον υποκλάδο Γ3 έχουμε δύο άτομα *A. violacea* (το 97 και ένα δείγμα από τη βάση δεδομένων). Το συγκεκριμένο taxon εμφανίζεται πολυφυλετικό επίσης, καθώς συναντάται και στον υποκλάδο Γ4 (δείγμα 99). Τα τρία δείγματα παρουσιάζουν μικρές σχετικά γενετικές αποστάσεις. Συγκεκριμένα, το δείγμα της βάσης δεδομένων (τότε γνωστό ως *A. ulrikae*⁴) έχει γενετικές αποστάσεις 1,2% από το δείγμα 97 και 8% από το 99, ενώ τα δείγματα 97 και 99 μεταξύ τους έχουν απόσταση 7,6%. Πριν το 1990, οι ερευνητές κατέτασσαν την *A. violacea* στην *A. hippolyti*, επομένως θα περίμενε κανείς να είναι πιο συγγενική με την ομάδα στην οποία τοποθετείται η *A. hippolyti*. Από την άλλη, η πιο στενή της σχέση με την *A. spratti* (στον υποκλάδο Γ4) έχει υποστηριχτεί και από τους Douris et al. (1998a). Από την τελευταία εργασία στην οποία δε συμπεριλήφθηκαν όλα τα taxa της Κρήτης, δεν μπορούμε δυστυχώς να αποσπάσουμε πληροφορίες για τη σχέση των *A. violacea* και *A. spratti* με την *A. hippolyti* και με την *A. corrugata*, παρ' όλο που βρίσκονται στον ίδιο κλάδο, εξαιτίας της χαμηλής στατιστικής υποστήριξής του.

Ο υποκλάδος Γ4, ο οποίος έχει καλή στατιστική υποστήριξη (0,98), περιλαμβάνει πέντε διαφορετικά taxa, δύο εκ των οποίων είναι πολυφυλετικά όπως προαναφέρθηκε. Τα taxa *A. corrugata*, *A. wiesei*, *A. li*, *A. violacea* και *A. spratti* παρουσιάζουν μέση γενετική απόσταση 9,2%, με τη μικρότερη απόσταση (1,2%) να παρατηρείται ανάμεσα στις *A. corrugata* 136 και 130 και τη μεγαλύτερη (13,4%) ανάμεσα σε *A. spratti* (113) και *A. corrugata* (128). Οι παρατηρούμενες αποστάσεις εντός του κλάδου δεν είναι ιδιαίτερα υψηλές. Η *A. corrugata* εμφανίζεται πολυφυλετική μέσα στον υποκλάδο 4 και στην εργασία του Welter-Schultes (2010) αναφέρεται ως πολυτυπικό είδος με τρία υποείδη. Εμφανίζει μορφολογική διαφοροποίηση και έχει υποστεί πολλές ταξινομικές αναθεωρήσεις, είναι δε, το τρίτο πιο εξάπλωμένο είδος στην Κρήτη. Η *A. li* είναι συμπάτρια με τις *A. corrugata* και της *A. terebra* σε μια μικρή περιοχή της νότιας κεντρικής Κρήτης κοντά στους Καλούς Λιμένες. Επίσης μικρή περιοχή εξάπλωσης έχει το είδος *A. wiesei* που συναντάται στη βορειοανατολική Κρήτη, κοντά στη Νεάπολη. Η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των δειγμάτων *A. corrugata* είναι 6,1%, η ελάχιστη απόσταση είναι

⁴ Οι *A. ulrikae* και *A. violacea* θεωρούνται πλέον συνώνυμα.

1,2% και η μέγιστη 12,5%. Η απόσταση μεταξύ της *A. li* και του δείγματος *A. corrugata* 128 με το οποίο αποτελούν ένα κλαδί με καλή υποστήριξη, είναι 7,2%, ενώ με όλες τις υπόλοιπες *A. corrugata* οι αποστάσεις κυμαίνονται από 8,4% έως 11,4%. Η γενετική απόσταση ανάμεσα στην *A. wiesei* και τις *A. corrugata* κυμαίνεται από 7,4% έως 12%. Η απόσταση ανάμεσα στις *A. wiesei* και *A. li* είναι 13,2%. Η μέγιστη απόσταση των δειγμάτων *A. spratti* του υποκλάδου 4 από όλα τα υπόλοιπα taxa που περιλαμβάνονται σε αυτόν, είναι 13,4%, ενώ της *A. violacea* είναι 12,9% με την *A. wiesei*. Εάν δεν υπήρχε το ζήτημα της πολυφυλετικότητας των *A. spratti* και *A. violacea* θα μπορούσε πιθανά όλος ο υποκλάδος να αποτελεί ένα είδος. Οι γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στους υποκλάδους 1, 2, 3 και 4 του κλάδου Γ πάντως, έχουν ως εξής: ο υποκλάδος 1 από τον 2 διαφέρουν γενετικά κατά 16% (μέγιστη απόσταση), ο 1 από τον 3 κατά 11,9% και από τον 4 κατά 14,9%, ο 2 από τον 3 κατά 12,4% και από τον 4 κατά 14,6% και τέλος ο 3 από τον 4 κατά 9,9%. Όπως φαίνεται, ο υποκλάδος 3 με τον 4 δεν έχουν μεγάλη απόσταση. Ίσως εάν αυξηθεί η πληροφορία (περισσότεροι δείκτες) η ανάλυση να οδηγήσει σε μία διαφορετική τοπολογία με τον υποκλάδο 3 μέσα στον 4.

4.2 Συμπεράσματα

Συνολικά το γένος στην Κρήτη εμφανίζει υψηλή γενετική ποικιλότητα και πολύπλοκα φυλογενετικά πρότυπα. Επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός γεωγραφικού προτύπου ανατολικών και δυτικών taxa. Η υπάρχουσα ταξινομική ασφαλώς δε συμφωνεί με τα όποια πρότυπα μπορέσαμε να διακρίνουμε στην παρούσα εργασία, ούτε δικαιολογείται από τις γενετικές αποστάσεις που παρατηρήσαμε. Υπάρχουν γενικά μορφολογικά είδη με ιδιαίτερα αυξημένη ενδοειδική γενετική ποικιλότητα (π.χ. *A. cretensis*) και άλλα που παρουσιάζουν μεταξύ τους πολύ μικρές γενετικές αποστάσεις (π.χ. *A. arthuriana* και *A. maltzani*, *A. teres* και *A. sturanyi*). Η ελλιπής στατιστική υποστήριξη βασικών κλάδων και οι άλυτες φυλογενετικές σχέσεις σε πολλές περιπτώσεις, δε μας επιτρέπουν να διατυπώσουμε με ασφάλεια προτάσεις για την ταξινομική αναθεώρηση των κρητικών taxa. Χρειάζεται σίγουρα επιπλέον πληροφορία και αναλύσεις ώστε να διευκρινιστούν οι φυλογενετικές σχέσεις των taxa και να αποτυπωθεί η πραγματική εξελικτική ιστορία τους. Οι ανεπίλυτες σχέσεις ωστόσο δεν είναι αποκλειστικά αποτέλεσμα έλλειψης δεδομένων απαραίτητα, καθώς όπως είδαμε, το ίδιο το γένος έχει χαρακτηριστικά που ενδέχεται να δυσχεραίνουν την επίλυση των σχέσεών των taxa του, όπως αυτό των ασθενών αναπαραγωγικών φραγμών.

Οι μέχρι τώρα ενδείξεις που έχουμε, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο αριθμός των ξεχωριστών γενεαλογικών γραμμών που θα μπορούσαν να αποτελούν τα διαφορετικά είδη του γένους στην Κρήτη είναι κατά πολύ μικρότερος από 31. Ασφαλώς αυτό δεν αμφισβητεί την ύπαρξη της μορφολογικής ποικιλότητας που έχει παρατηρηθεί και έχει οδηγήσει στην αναγνώριση των ειδών, θα μπορούσε να θέσει σε αμφισβήτηση όμως ορισμένους τουλάχιστον από τους μορφολογικούς χαρακτήρες και την ουδετερότητά τους. Καθώς και η γενετική ποικιλότητα είναι υψηλή εντός του γένους ωστόσο, τίθεται έντονα το ζήτημα της οριοθέτησης των ειδών.

Η έλλειψη της μονοφυλετικότητας των κρητικών taxa, επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας αποτελέσματα και δημιουργεί παράλληλα ένα επιπλέον κίνητρο για τη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων στο σύνολο της κατανομής του γένους. Πριν από αυτό όμως, μελλοντικό στόχο αποτελεί ο εμπλουτισμός του συνόλου δεδομένων με taxa και δείκτες. Ένα άλλο πολύ ενδιαφέρον πεδίο μελλοντικής ενασχόλησης σε σχέση με το γένος, αποτελεί ο υβριδισμός και η ειδογένεση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Armbruster GFJ, van Moorsel CHM, Gittenberger E (2000) Conserved sequence patterns in the non-coding ribosomal ITS-1 of distantly related snail taxa. *Journal of Molluscan Studies* **66**, 570-573.
- Ayoutanti A, Krimbas C, Tsakas S, Mylonas M (1987) Genetic differentiation and speciation in the Greek archipelago: The genus *Albinaria*. *Biologia Gallo-hellenica* **13**, 155-160.
- Bittkau C, Comes HP (2005) Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. *Molecular Ecology* **14**, 4065-4083.
- Bittkau C, Comes HP (2009) Molecular inference of a Late Pleistocene diversification shift in *Nigella* s. lat. (Ranunculaceae) resulting from increased speciation in the Aegean archipelago. *Journal of Biogeography* **36**, 1346-1360.
- Boettger O (1878a) *Neue recente Clausilien I-IV* Dtsch. Malakozool. Ges.
- Boettger O (1878b) Systematisches Verzeichnis der lebenden Arten der Landschnecken-Gattung *Clausilia* Drap. mit ausführlicher Angabe der geographischen Verbreitung der einzelnen Species. *Bericht über die Thätigkeit des Offenbacher Vereins für Naturkunde* **17/18**, 18-101.

- Boettger O (1883) Diagnosen neuer Clausilien, gesammelt 1883 auf Creta vom Freiherrn H. v. Maltzan. *Nachrichtsblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **15**, 106-113.
- Cain AJ, Sheppard PM (1954) Natural selection in *Cepaea*. *Genetics* **39**, 89-116.
- Clarke B, Murray J (1969) Ecological genetics and speciation in land snails of the genus *Partula*. *Biological Journal of the Linnean Society* **1**, 31-42.
- Clarke B, Murray J (1970) Polymorphism in a Polynesian Land Snail *Partula suturalis vexillum*. In: *Ecological Genetics and Evolution* (ed. Creed R), pp. 51-64. Springer US.
- Comes HP, Tribsch A, Bittkau C (2008) Plant speciation in continental island floras as exemplified by *Nigella* in the Aegean Archipelago. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**, 3083-3096.
- Cook LM (2008) Variation with habitat in *Cepaea nemoralis*: the Cain & Sheppard diagram. *Journal of Molluscan Studies* **74**, 239-243.
- Däumer C, Greve C, Hutterer R, Misof B, Haase M (2012) Phylogeography of an invasive land snail: Natural range expansion versus anthropogenic dispersal in *Theba pisana pisana*. *Biological Invasions* **14**, 1665-1682.
- Davison A (2002) Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Population Ecology* **44**, 0129-0136.
- Dermitzakis DM, De Vos J (1987) Faunal succession and the evolution of mammals in Crete during the Pleistocene. *Neues Jahrbuch fuer Geologie und Palaontologie, Abhandlungen* **173**, 377-408.
- Douris V, Cameron RAD, Rodakis GC, Lecanidou R (1998a) Mitochondrial phylogeography of the land snail *Albinaria* in Crete: Long-term geological and short-term vicariance effects. *Evolution* **52**, 116-125.
- Douris V, Giokas S, Lecanidou R, Mylonas M, Rodakis GC (1998b) Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA and morphological characters suggest a need for taxonomic re-evaluation within the Alopiinae (Gastropoda : Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **64**, 81-92.
- Douris V, Giokas S, Lecanidou R, Mylonas M, Rodakis GC (1998c) Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA and morphological characters suggest a need for taxonomic re-evaluation within the Alopiinae (Gastropoda: Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **64**, 81-92.
- Douris V, Giokas S, Thomaz D, Lecanidou R, Rodakis GC (2007) Inference of evolutionary patterns of the land snail *Albinaria* in the Aegean archipelago: Is vicariance enough? *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 1224-1236.
- Douris V, Rodakis GC, Giokas S, Mylonas M, Lecanidou R (1995) Mitochondrial-DNA and Morphological-Differentiation of *Albinaria*

- Populations (Gastropoda, Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **61**, 65-78.
- Felsenstein J (1985) Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Giokas S (1996) *The differentiation of the genus Albinaria in the Hellenic Region*, University of Athens.
- Giokas S (2000) Congruence and conflict in Albinaria (Gastropoda, Clausiliidae). A review of morphological and molecular phylogenetic approaches. *Belgian Journal of Zoology* **130**, 95-103.
- Giokas S (2008) Shell surface adaptations in relation to water management in rock-dwelling land snails, Albinaria (Pulmonata: Clausiliidae). *Journal of Natural History* **42**, 451-465.
- Giokas S, Mylonas M (2002) Spatial distribution, density and life history in four Albinaria species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Malacologia* **44**, 33-46.
- Giokas S, Mylonas M (2004) Dispersal patterns and population structure of the land snail Albinaria coerulea (Pulmonata : Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **70**, 107-116.
- Giokas S, Mylonas M, Rolan-Alvarez E (2006) Disassociation between weak sexual isolation and genetic divergence in a hermaphroditic land snail and implications about chirality. *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1631-1640.
- Giokas S, Pafilis P, Valakos E (2005) Ecological and physiological adaptations of the land snail Albinaria caerulea (Pulmonata : Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **71**, 15-23.
- Giokas S, Thomaz D, Douris V, Lecanidou R, Rodakis GC (2010) 5000 years of molecular evolution in a population of the land snail Albinaria caerulea transported by humans. *Journal of Molluscan Studies* **76**, 49-56.
- Gittenberger A, Vrieling K, Gittenberger E (2001) Restricted Gene Flow Between Two Alleged Subspecies of Albinaria Cretensis (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Netherlands Journal of Zoology* **51**, 71-84.
- Gittenberger E (1991) What About Nonadaptive Radiation. *Biological Journal of the Linnean Society* **43**, 263-272.
- Goodacre SL (2002) Population structure, history and gene flow in a group of closely related land snails: genetic variation in Partula from the Society Islands of the Pacific. *Molecular Ecology* **11**, 55-68.
- Goodacre SL, Wade CM (2001) Patterns of genetic variation in Pacific island land snails: the distribution of cytochrome b lineages among Society Island Partula. *Biological Journal of the Linnean Society* **73**, 131-138.
- 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**, 81-87.
- 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**, 205-221.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**, 411-453.
- Holmes DS, Bonner J (1973) Preparation, molecular weight, base composition, and secondary structure of giant nuclear ribonucleic acid. *Biochemistry* **12**, 2330-2338.
- Johnson MS (2011a) Effects of contrasting habitats and weather on abundance of the land snail *Theba pisana* (O. F. Müller, 1774): A 34-year study. *Journal of Molluscan Studies* **77**, 218-225.
- Johnson MS (2011b) Thirty-four years of climatic selection in the land snail *Theba pisana*. *Heredity* **106**, 741-748.
- Jones JS, Leith BH, Rawlings P (1977) Polymorphism in *Cepaea*: A Problem with Too Many Solutions? *Annual Review of Ecology and Systematics* **8**, 109-143.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 772-780.
- Kemperman TCM, Degenars GH (1992) Allozyme frequencies in *Albinaria* (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae) from the Ionian islands of Kephallinia and Ithaka. *Malacologia* **34**, 33-61.
- Kemperman TCM, Gittenberger E (1992) The genus *Albinaria* (Gastropoda Pulmonata : Clausiliidae) in Kephallinia and Ithaka (Ionian islands, Greece): an intergated approach. In: *Systematics and evolutionary history of the Albinaria species from the Ionian islands of Kephallinia and Ithaka (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae)*. pp. 159-232. Universal Book Services, Leiden.
- Kemperman TCM, Povel GDE, Bor PHF (1992) Differentiation in radulae of closely related pulmonates: a pilot study in *Albinaria* (Gastropoda: Clausiliidae). In: *Systematics and evolutionary history of the Albinaria species from the Ionian islands of Kephallinia and Ithaka (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae)* (ed. Kemperman TCM), pp. 81-120. Universal Book Services, Leiden.
- Kornilios P, Kyriazi P, Poulakakis N, *et al.* (2010) Phylogeography of the ocellated skink *Chalcides ocellarus* (Squamata, Scincidae), with the use of mtDNA sequences: A hitch-hiker's guide to the Mediterranean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**, 445-456.

- Kornilios P, Poulakakis N, Mylonas M, Vardinoyannis K (2009a) The phylogeny and biogeography of the genus *Zonites* Montfort, 1810 (Gastropoda: Pulmonata): preliminary evidence from mitochondrial data. *Journal of Molluscan Studies* **75**, 109-117.
- Kornilios P, Poulakakis N, Mylonas M, Vardinoyannis K (2009b) The phylogeny and biogeography of the genus *Zonites* Montfort, 1810 (Gastropoda: Pulmonata): preliminary evidence from mitochondrial data. *Journal of Molluscan Studies* **75**, 109-117.
- Kyriazi P, Poulakakis N, Parmakelis A, *et al.* (2008) Mitochondrial DNA reveals the genealogical history of the snake-eyed lizards (*Ophisops elegans* and *O. occidentalis*) (Sauria: Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**, 795-805.
- Loosjes F (1955) Eine Clausilien-Ausbeute von Kreta. *Sitzungsberichte, Österreichische Akademie der Wissenschaften, mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, Abteilung I* **164** 855-885.
- Lymberakis P, Poulakakis N, Manthalous G, *et al.* (2007) Mitochondrial phylogeography of *Rana* (Pelophylax) populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 115-125.
- Madejón P, Arrébola J, Madejón E, *et al.* (2013) The snail *Theba pisana* as an indicator of soil contamination by trace elements: Potential exposure for animals and humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 2259-2266.
- Mantziou G, Poulakakis N, Lymberakis P, Valakos E, Mylonas M (2004) The inter- and intraspecific status of Aegean *Mauremys rivulata* (Chelonia, Bataguridae) as inferred by mitochondrial DNA sequences. *Herpetological Journal* **14**, 35-45.
- Meulenkamp JE (1985) Aspects of the Late Cenozoic Evolution of the Aegean Region. In: *Geological evolution of the Mediterranean Basin* (eds. Stanley DJ, Wezel FC), pp. 307-321. Springer, New York.
- Michaux J, Bellinvia E, Lymberakis P (2005) Taxonomy, evolutionary history and biogeography of the broad-toothed field mouse (*Apodemus mystacinus*) in the eastern Mediterranean area based on mitochondrial and nuclear genes. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**, 53-63.
- Murray J, Clarke B (1980) The Genus *Partula* on Moorea: Speciation in Progress. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **211**, 83-117.
- Mylonas M, Krimbas C, Tsakas S, Ayoutanti A (1987) The genus *Albinaria* Vest. (Clausiliidae, Gastropoda). Is there any true species? *Biologia Gallo-hellenica* **13**, 161-164.

- Nordsieck H (1977) Zur Anatomie und Systematik der Clausilien, XVII. Taxonomische Revision des Genus *Albinaria* Vest. *Archiv für Molluskenkunde* **107**, 285-307.
- Nordsieck H (2004) *Albinaria cretensis* group: definition of the species and subspecies, with the description of new taxa (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Basteria* **68**, 51-70.
- Papadopoulou A, Anastasiou I, Keskin B, Vogler AP (2009) Comparative phylogeography of tenebrionid beetles in the Aegean archipelago: the effect of dispersal ability and habitat preference. *Molecular Ecology* **18**, 2503-2517.
- Parmakelis A, Mylonas M (2002) Aspects of the reproduction and activity of two sympatric *Mastus* (Beck, 1837) species in Crete (Gastropoda: Pulmonata: Buliminidae). *Journal of Molluscan Studies* **68**, 225-233.
- Parmakelis A, Mylonas M (2004) Dispersal and population structure of two sympatric species of the mediterranean land snail genus *Mastus* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **83**, 131-144.
- Parmakelis A, Pfenninger M, Spanos L, *et al.* (2005) Inference of a radiation in *Mastus* (gastropoda, pulmonata, enidae) on the island of Crete. *Evolution* **59**, 991-1005.
- Parmakelis A, Spanos E, Papagiannakis G, Louis C, Mylonas M (2003) Mitochondrial DNA phylogeny and morphological diversity in the genus *Mastus* (Beck, 1837): a study in a recent (Holocene) island group (Koufonisi, south-east Crete). *Biological Journal of the Linnean Society* **78**, 383-399.
- Parmakelis A, Stathi I, Chatzaki M, *et al.* (2006) Evolution of *Mesobuthus gibbosus* (Brulle, 1832) (Scorpiones: Buthidae) in the northeastern Mediterranean region. *Molecular Ecology* **15**, 2883-2894.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253-1256.
- Poulakakis N, Sfenthourakis S (2008) Molecular phylogeny and phylogeography of the Greek populations of the genus *Orthometopon* (Isopoda, Oniscidea) based on mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society* **152**, 707-715.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574.
- Sauer J, Hausdorf B (2009) Sexual Selection Is Involved in Speciation in a Land Snail Radiation on Crete. *Evolution* **63**, 2535-2546.
- Sauer J, Hausdorf B (2010) Reconstructing the evolutionary history of the radiation of the land snail genus *Xerocrassa* on Crete based on

- mitochondrial sequences and AFLP markers. *Bmc Evolutionary Biology* **10**.
- Scheil AE, Gärtner U, Köhler HR (2012a) Colour polymorphism and thermal capacities in *Theba pisana* (O.F. Müller 1774). *Journal of Thermal Biology* **37**, 462-467.
- Scheil AE, Scheil V, Tribskorn R, *et al.* (2012b) Shell colouration and antioxidant defence capacity in *Theba pisana* (O.F. Müller, 1774). *Molluscan Research* **32**, 132-136.
- Schilthuizen M (1994) Reproductive isolation in snails of the genus *Albinaria* (Gastropoda, Clausiliidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **52**, 317-325.
- Schilthuizen M (1995) A comparative study of hybrid zones in the polytypic land snail *Albinaria hippolyti* (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae). *Netherlands Journal of Zoology* **45**, 261-290.
- Schilthuizen M, Gittenberger E (1996) Allozyme variation in some Cretan *Albinaria* (Gastropoda): paraphyletic species as natural phenomena. In: *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca* (ed. Taylor J), pp. 301-311. Oxford University Press, Oxford.
- Schilthuizen M, Gittenberger E, Gulyaev AP (1995) Phylogenetic Relationships Inferred from the Sequence and Secondary Structure of ITS1 rRNA in *Albinaria* and Putative *Isabellaria* Species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**, 457-462.
- Schilthuizen M, Gutteling E, Van Moorsel CHM, *et al.* (2004) Phylogeography of the land snail *Albinaria hippolyti* (Pulmonata: Clausiliidae) from Crete, inferred from ITS-1 sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**, 317-326.
- 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.
- Schilthuizen M, Lombaerts M (1995) Life on the edge: A hybrid zone in *Albinaria hippolyti* (Gastropoda: Clausiliidae) from Crete. *Biological Journal of the Linnean Society* **54**, 111-138.
- Selander RK, Kaufman DW (1975) Genetic Structure of Populations of the Brown Snail (*Helix aspersa*). I. Microgeographic Variation. *Evolution* **29**, 385-401.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* **57**, 758-771.
- Steenberg CM (1914) *Anatomie des Clausilies demoises: Les organes génitaux Biancos Lunos*.

- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial-DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 512-526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. . *Molecular Biology and Evolution*.
- Thomaz D, Guiller A, Clarke B (1996) Extreme Divergence of Mitochondrial DNA within Species of Pulmonate Land Snails. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **263**, 363-368.
- Uit De Weerd DR, Gittenberger E (2005) Towards a monophyletic genus *Albinaria* (Gastropoda, Pulmonata): The first molecular study into the phylogenetic position of eastern *Albinaria* species. *Zoological Journal of the Linnean Society* **143**, 531-542.
- Wagner A (1924) Ergänzungen und Erläuterungen zur Systematik der Clausiliiden. II. Neue Formen und Arten des Genus *Albinaria* ex rect. mea. (Schluss). *Prace Zoologiczne Polskiego Panstwowego Muzeum Przyrodniczego [Annales Zoologici Musei Polonici Historiae Naturalis]* **2**, 9-23.
- Wagner AJ (1919) Zur Anatomie und Systematik der Clausiliiden. *Nachrichtsblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **51**, 49-60, 87-104, 129-147.
- Welter-Schultes F (1998) *Albinaria* in central and eastern Crete: distribution map of the species (Pulmonata: Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **64**, 275-279.
- Welter-Schultes FW (2000a) Approaching the genus *Albinaria* in Crete from an evolutionary point of view (Pulmonata: Clausiliidae). *Schriften zur Malakozoologie* **16**, 1-208.
- Welter-Schultes FW (2000b) The paleogeography of late Neogene central Crete inferred from the sedimentary record combined with *Albinaria* land snail biogeography. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **157**, 27-44.
- Welter-Schultes FW (2001) Spatial Variations in *Albinaria terebra* Land Snail Morphology in Crete (Pulmonata: Clausiliidae): Constraints for Older and Younger Colonizations? *Paleobiology* **27**, 348-368.
- Welter-Schultes FW (2010) Revision of the genus *Albinaria* in Crete (Greece): presence of geographically variable monotypic and polytypic species (Gastropoda: Clausiliidae). *Archiv für Molluskenkunde: International Journal of Malacology* **139**, 143-245.
- Welter-Schultes WF (1992) Notes on the taxonomy of *Albinaria* of Nisos Dia, Crete (Gastropoda: Clausiliidae). *Biologia Gallo-hellenica* **19**, 55-61.

- Yamazaki N, Ueshima R, Terrett JA, *et al.* (1997) Evolution of Pulmonate Gastropod Mitochondrial Genomes: Comparisons of Gene Organizations of Euhadra, Cepaea and Albinaria and Implications of Unusual tRNA Secondary Structures. *Genetics* **145**, 749-758.
- Βαρδινογιάννη Κ (1994) *Βιογεωγραφία των χερσαίων μαλακίων στο νότιο νησιωτικό αιγιακό τόξο*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Γκιώκας Σ (1996) *Η διαφοροποίηση του γένους Albinaria στον Ελλαδικό χώρο*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παρμακέλης Α (2003) *Η διαφοροποίηση του γένους Mastus (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae) στον Ελλαδικό χώρο. Μια συγκριτική μελέτη με μεθόδους οικολογίας, μορφομετρίας και μοριακής ανάλυσης*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Πουλακάκης Ν (2005) *Διερεύνηση των φυλογενετικών διεργασιών στις σαύρες του γένους Podarcis (Sauria:Lacertidae) του ελληνικού χώρου*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Κατάλογος των δειγμάτων που συμπεριλήφθηκαν στις γενετικές αναλύσεις. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται 1) ο κωδικός που έχουμε δώσει σε κάθε δείγμα και αναφέρεται στο φυλογενετικό δέντρο στην Εικόνα 4, στους πίνακες των γενετικών αποστάσεων και στο κείμενο, 2) το όνομα του είδους, 3) η γεωγραφική προέλευση, 4) ο κωδικός αριθμός πεδίου του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης.

Κωδικός	FC	Είδος	Περιοχή (Κρήτη, εκτός εξαιρέσεων που αναφέρεται άλλη περιοχή)
9	11962	<i>A. teres</i>	Δία, Ηράκλειο
15	11966	<i>A. jaeckeli</i>	Δία, Ηράκλειο
17	11966	<i>A. retusa</i>	Δία, Ηράκλειο
22	11950	<i>A. corrugata</i>	Όρος Δίκητη, Λασιθί
34	11510	<i>A. teres</i>	Μονή Τοπλού, Σητεία, Λασιθί
68	11962	<i>A. torticollis</i>	Δία, Ηράκλειο
85	1178	<i>A. discolor</i>	Κύθηρα, Επτάνησα
87	4466	<i>A. turrita</i>	Σίφνος, Κυκλάδες
94	3699	<i>A. xanthostoma</i>	Αφράτα, Χερσόνησος Ροδωπού, Χανιά
95	13278	<i>A. hippolyti</i>	Αλμυρός ποταμός, Γάζι, Ηράκλειο
97	13279	<i>A. violacea</i>	Παλαιόκαστρο, Γάζι, Ηράκλειο
99	13280	<i>A. violacea</i>	Φόδελε προς Σίσσες, Ρέθυμνο
101	13281	<i>A. cretensis</i>	Κυνηγιανά (νότια), Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
103	13282	<i>A. ariadne</i>	Ορθές (νότια) προς Πέραμα, Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
105	13283	<i>A. ariadne</i>	Μαργαρίτες προς Πέραμα, Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
107	13284	<i>A. ariadne</i>	Πέραμα προς Δαφνές, Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
108	13284	<i>A. ariadne</i>	Πέραμα προς Δαφνές, Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
110	13285	<i>A. spratti</i>	Κάμπος Απλαδιανών, Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
112	13286	<i>A. spratti</i>	Μακρυγιάννη, Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
113	13287	<i>A. spratti</i>	Δροσιά (δυτικό άκρο), Μυλοπόταμος, Ρέθυμνο
128	14011	<i>A. corrugata</i>	Όρος Γιούχτας (ανατολική πλευρά), Ηράκλειο
130	14012	<i>A. corrugata</i>	Σεληνάρι (Άγιος Γεώργιος), Αγ. Νικόλαος, Λασιθί
131	14012	<i>A. wiesei</i>	Σεληνάρι (Άγιος Γεώργιος), Αγ. Νικόλαος, Λασιθί
136	14014	<i>A. corrugata</i>	Βραχάσι, Άγιος Νικόλαος, Λασιθί
137	14015	<i>A. praeclara</i>	Άγιος Νικόλαος (βόρειο άκρο), Λασιθί
143	14017	<i>A. moreletiana</i>	Σπιναλόγκα, Άγιος Νικόλαος, Λασιθί
146	14018	<i>A. christae</i>	Πλάκα προς Βρουχάς, Αγ. Νικόλαος, Λασιθί
153	14021	<i>A. cretensis</i>	Πετρές ποταμός (κοντά στην Εθνική), Ρέθυμνο
155	14022	<i>A. cretensis</i>	Λίμνη Κουρνά, (δάσος <i>Quercus</i> νότια της λίμνης), Γεωργιούπολη, Χανιά
157	14023	<i>A. eburnea</i>	Σπήλαιο Τζανή, Ομαλός, Χανιά
162	14025	<i>A. cretensis</i>	Πρασσές (1km από τα Νέα Ρουμάτα), Πλατανιάς, Χανιά
163	14026	<i>A. tenuicostata</i>	Γραμβούσα (στο μονοπάτι προς Μπάλο), Κίσσαμος, Χανιά
166	14026	<i>A. cretensis</i>	Γραμβούσα (στο μονοπάτι προς Μπάλο), Κίσσαμος, Χανιά
167	14027	<i>A. tenuicostata</i>	Φαλάσαρνα, Κίσσαμος, Χανιά
169	14031	<i>A. terebra</i>	Λίσταρος προς Μονή Οδηγητριάς, Φαιστός, Ηράκλειο
171	14032	<i>A. terebra</i>	Καλοί Λιμένες- όρος Κέφαλος, Φαιστός, Ηράκλειο
174	14032	<i>A. li</i>	Καλοί Λιμένες- όρος Κέφαλος, Φαιστός, Ηράκλειο
176	14033	<i>A. terebra</i>	Μάρτσαλο, Αστερούσια Όρη, Ηράκλειο
178	14034	<i>A. idaea</i>	Ζαρός, Φαιστός, Ηράκλειο
179	14035	<i>A. teres</i>	Καβούσι (φαράγγι), Ιεράπετρα, Λασιθί
184	14035	<i>A. teres</i>	Καβούσι (φαράγγι), Ιεράπετρα, Λασιθί
185	14036	<i>A. teres</i>	Ιεράπετρα προς Σητεία (μετά τη διασταύρωση για Αρμένους), Λασιθί
187	14037	<i>A. teres</i>	Χαμαίτουλο-Ξερόκαμπος (250m υψόμετρο), Σητεία, Λασιθί
192	14039	<i>A. sturanyi</i>	Όρος Αφέντης, Ιεράπετρα, Λασιθί

193	14040	<i>A. arthuriana</i>	Λατσίδα – Κουνάλι (πριν την γέφυρα, 200m υψόμετρο), Άγιος Νικόλαος, Λασιθί
197	14042	<i>A. maltzani</i>	Λατσίδα – Κουνάλι (κοντά στο Κουνάλι), Άγιος Νικόλαος, Λασιθί
199	14043	<i>A. teres</i>	Καλό Χωριό (νότια), Άγιος Νικόλαος, Λασιθί
208	14052	<i>A. amalthea</i>	Ροδωπός (2 km νότια), Πλατανιάς, Χανιά
210	14053	<i>A. cretensis</i>	Πλάτανος (2 km νότια προς Σφηνάρι), Κίσσαμος, Χανιά
212	14054	<i>A. cretensis</i>	Ελαφώνησος, Κάντανος –Σέλινο, Χανιά
213	14055	<i>A. cretensis</i>	Σκλαβοπούλα (4 km νοτιοδυτικά), Κάντανος –Σέλινο, Χανιά
218	14050	<i>A. sphakiota</i>	Χώρα Σφακίων προς Ασκυφού (630m υψόμετρο), Σφακιά, Χανιά
221	14057	<i>A. cretensis</i>	Παλαιόχωρα προς Κάντανο (7 km πριν την Κάντανο), Κάντανος –Σέλινο, Χανιά
224	14058	<i>A. cretensis</i>	Φαράγγι του Θερίσου (στη μέση), Χανιά
226	14059	<i>A. candida</i>	Χερσονήσος Ακρωτηρίου από Σούδα προς όρος Σκλόκα, Χανιά
228	14060	<i>A. candida</i>	Όρος Σκλόκα (300m υψόμετρο), Χανιά
232	14062	<i>A. candida</i>	Φαράγγι παραλία Στεφάνου, Ακρωτήρι, Χανιά
233	14063	<i>A. candida</i>	Σταυρός, Ακρωτήρι, Χανιά
245	13001	<i>A. cretensis</i>	Γαύδος, Χανιά
250		<i>A. pondika</i>	Ποντικονήσι, Κίσσαμος, Χανιά
252	3360	<i>A. janicollis</i>	Διονυσάδες (Γιανυσάδα), Σητεία, Λασιθί
258	13090	<i>A. sphakiota</i>	Φαράγγι Ίμβρου, Σφακιά, Χανιά
262	13092	<i>A. sphakiota</i>	Φαράγγι Ίμβρου, Σφακιά, Χανιά
265	13093	<i>A. cretensis</i>	Φαράγγι Ίμβρου, Σφακιά, Χανιά
274	13032	<i>A. manselli</i>	Νησίδες Καβάλοι, Σητεία, Λασιθί
277	10126	<i>A. cretensis</i>	Αγία Ρουμέλη, Σφακιά, Χανιά
279	10126	<i>A. sublamellosa</i>	Αγία Ρουμέλη, Σφακιά, Χανιά
282	13294	<i>A. rebeli</i>	Νησίδα Κόνιδα, Ιεράπετρα, Λασιθί
286	14475	<i>A. janisadana</i>	Διονυσάδες (Δραγονάδα), Σητεία
288	14476	<i>A. janicollis</i>	Διονυσάδες (Γιανυσάδα), Σητεία

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Οι γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στα διαφορετικά μορφολογικά είδη, για τους δύο δείκτες χωριστά. Κάτω τριγωνικός πίνακας: 16S. Πάνω τριγωνικός πίνακας: ITS1

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
1. <i>A. cretensis</i>		4.8	nc	nc	8.6	8.1	12.2	12.9	nc	nc	14.2	14.1	9.4	10.7	nc	6.6	10.1	8.8	8.6	8.7	8.9	10.4	9.4	10.9	10.8	8.8	4.8	8.5	9.5	6.5	10.6	16.2	10.9	10.8	9.9	
2. <i>A. ariadne</i>	12.4		nc	nc	7.4	7.1	12.9	13.7	nc	nc	14.8	15.0	7.7	10.5	nc	5.5	9.2	8.0	7.2	7.2	7.8	9.1	9.1	10.7	11.0	7.6	3.8	11.6	8.8	5.5	10.5	14.2	9.3	10.4	8.3	
3. <i>A. praeclara</i>	14.9	15.7		nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
4. <i>A. arthuriana</i>	13.6	14.8	3.6		nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
5. <i>A. maltzani</i>	13.6	14.3	4.5	2.0		1.2	9.0	10.3	nc	nc	10.1	9.8	1.9	6.5	nc	6.2	7.7	5.5	7.0	5.9	6.1	7.6	9.0	7.0	8.3	5.6	6.5	10.4	6.5	7.7	9.9	13.5	8.8	8.2	7.5	
6. <i>A. moreletiana</i>	16.0	17.4	9.8	10.9	11.2		8.6	9.7	nc	nc	9.8	9.5	1.0	6.9	nc	5.7	8.6	5.0	6.4	6.6	5.5	6.6	8.5	6.2	8.1	5.0	5.8	9.3	5.8	7.0	9.3	12.6	9.4	8.7	7.3	
7. <i>A. teres</i>	16.0	18.1	12.5	12.1	12.2	11.6		2.1	nc	nc	4.3	4.0	12.5	9.2	nc	9.8	10.4	8.9	7.7	7.1	9.2	10.2	8.7	9.1	10.1	9.0	9.4	11.0	9.7	10.6	10.6	18.1	10.5	11.6	9.1	
8. <i>A. sturanyi</i>	15.4	17.7	11.2	11.2	11.0	10.5	2.8		nc	nc	5.4	5.4	13.8	10.2	nc	10.6	11.0	9.6	7.7	7.6	10.2	11.0	8.6	9.0	9.9	10.2	9.8	11.4	10.0	11.5	11.7	19.2	10.3	12.8	9.0	
9. <i>A. mansli</i>	21.9	24.3	17.7	16.3	18.6	16.9	3.2	2.8		nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	
10. <i>A. rebeli</i>	16.7	18.8	12.6	13.4	13.0	9.4	7.5	6.5	10.3		nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
11. <i>A. janicolis</i>	16.6	19.7	12.6	13.3	12.8	10.9	8.3	7.2	9.5	7.6		0.3	13.5	10.4	nc	10.8	9.7	10.9	9.0	7.7	11.0	11.7	10.5	8.9	8.8	10.5	10.2	13.9	9.9	12.5	13.8	19.3	11.2	12.9	9.8	
12. <i>A. janisadana</i>	25.0	28.3	19.8	19.6	19.9	15.6	10.6	9.7	9.3	10.9	0.2		13.4	10.4	nc	10.4	9.5	10.8	8.8	7.3	10.9	11.7	10.4	9.1	9.0	10.5	9.8	14.1	9.7	12.3	13.5	19.4	10.9	12.8	9.4	
13. <i>A. christae</i>	15.3	18.4	9.1	10.1	10.3	9.6	9.8	9.1	12.4	12.0	10.8	15.1		9.0	nc	6.8	17.3	8.5	10.5	12.1	8.0	8.1	8.8	8.2	13.1	6.7	7.1	12.1	9.7	6.7	10.2	12.7	11.7	10.6	11.7	
14. <i>A. tenuicostata</i>	16.7	19.0	13.1	13.7	13.6	13.8	11.6	11.2	15.1	13.6	13.7	20.3	12.2		nc	7.5	10.2	5.5	6.5	5.9	6.0	7.9	7.3	9.3	10.7	6.6	7.9	13.5	8.9	9.3	8.8	18.3	11.0	8.7	8.1	
15. <i>A. pondika</i>	24.5	25.6	16.4	17.1	19.5	16.5	15.3	14.2	13.7	17.7	19.4	19.4	18.5	7.1		nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
16. <i>A. candida</i>	14.7	17.6	13.0	13.1	11.3	11.4	14.5	13.9	20.1	15.2	11.7	17.3	11.1	15.9	20.5		8.0	5.6	4.1	4.9	5.8	7.4	6.7	7.0	8.7	5.6	4.2	9.4	5.6	5.4	7.5	14.6	8.3	8.8	5.9	
17. <i>A. terebra</i>	20.1	22.8	13.1	14.9	16.3	15.3	15.3	14.1	20.9	15.2	14.6	21.5	15.2	15.7	18.7	16.8		7.9	6.7	6.9	8.2	10.5	9.3	10.1	9.4	8.2	9.1	10.2	9.8	9.6	10.5	18.4	11.5	10.3	9.3	
18. <i>A. jaeckeli</i>	17.0	18.3	13.8	14.8	14.3	13.0	12.9	13.1	15.6	13.7	12.4	16.2	13.4	13.9	22.0	15.2	16.3		0.3	4.9	1.2	6.4	6.5	7.3	10.1	4.5	5.5	11.8	6.0	7.5	7.9	14.4	9.9	7.8	5.7	
19. <i>A. torticollis</i>	19.7	21.0	17.4	17.3	17.4	15.7	13.7	14.2	12.3	12.9	12.8	13.5	15.6	15.8	19.8	19.9	20.8	7.8		5.2	0.3	5.6	5.1	6.5	11.7	3.7	6.1	11.0	3.9	6.4	5.1	12.3	8.3	8.7	4.1	
20. <i>A. amalthea</i>	19.4	21.4	15.8	17.0	17.0	15.1	16.2	16.4	21.8	16.6	15.8	21.8	14.3	18.7	26.5	15.9	17.5	16.0	19.8		5.1	7.0	7.9	7.0	8.6	4.0	7.2	10.9	5.5	7.8	8.1	17.5	9.5	7.1	7.2	
21. <i>A. retusa</i>	18.2	19.4	12.6	13.5	14.6	10.7	13.6	13.1	15.1	13.5	13.3	16.4	11.2	18.1	18.7	13.6	17.7	14.1	12.5	16.7		6.2	6.8	7.2	11.1	4.0	5.5	12.2	6.1	7.7	7.9	13.2	9.8	7.3	5.7	
22. <i>A. spratti</i>	19.4	20.5	20.0	19.8	19.0	19.4	20.6	20.2	23.7	20.7	20.4	24.1	18.2	21.0	22.8	16.6	23.9	18.3	22.0	24.0	21.0		6.5	8.5	8.9	5.7	7.7	12.4	8.1	9.8	7.2	16.5	10.9	10.8	8.1	
23. <i>A. idaea</i>	15.2	17.4	12.6	12.6	12.1	13.0	13.9	12.9	17.8	15.2	15.0	21.8	12.2	14.7	19.5	11.8	17.0	14.0	18.2	18.5	13.2	12.5		9.9	9.7	7.9	7.3	10.2	7.4	9.0	1.3	17.7	9.7	13.1	7.8	
24. <i>A. corrugata</i>	17.7	18.3	15.5	15.9	15.5	16.8	15.9	15.6	18.9	15.9	17.2	23.3	14.1	16.1	19.3	15.5	19.4	16.5	19.1	19.3	18.2	18.0	14.0		9.1	6.2	8.5	11.3	3.5	9.6	10.6	18.1	10.4	11.1	9.3	
25. <i>A. wiesei</i>	15.1	15.9	12.8	13.5	13.9	15.1	14.9	14.2	19.9	16.1	15.4	21.8	11.6	14.8	18.8	11.2	17.1	15.4	17.5	16.2	15.2	16.3	11.0	9.4		8.3	9.1	11.6	10.4	11.3	9.2	17.9	8.5	10.0	10.6	
26. <i>A. violacea</i>	18.1	18.3	16.3	15.5	14.2	15.1	15.8	14.6	18.5	15.7	14.9	17.9	16.1	16.5	17.4	15.1	18.4	15.1	18.2	19.9	16.0	16.8	15.7	16.1	16.8		6.1	11.3	5.7	7.1	8.5	14.9	9.6	8.3	6.5	
27. <i>A. sublamellosa</i>	18.1	20.3	18.7	18.1	17.1	17.9	15.9	14.8	21.3	19.7	14.8	20.3	15.5	18.8	27.4	13.4	20.5	19.1	21.0	17.0	19.4	23.5	17.2	20.6	15.6	22.0		7.8	6.2	4.1	7.3	14.3	9.1	9.7	7.3	
28. <i>A. eburnea*</i>	16.2	19.1	15.1	15.1	16.1	14.2	17.0	15.0	21.4	16.6	15.6	20.7	14.9	15.4	20.3	14.3	18.1	15.2	16.9	17.7	17.8	22.0	16.9	17.9	12.6	21.3	14.7		12.1	10.3	12.2	19.5	14.5	12.7	12.7	
29. <i>A. li</i>	16.5	17.7	15.9	14.7	14.4	14.7	14.9	14.3	19.3	14.3	17.5	25.2	17.0	16.0	21.6	13.5	19.5	16.9	20.0	16.5	18.6	19.6	13.7	15.8	15.7	14.8	18.7	18.0		8.2	9.0	16.0	7.7	11.3	6.3	
30. <i>A. sphakiota</i>	18.2	20.1	14.7	13.5	13.4	16.6	16.2	14.5	21.8	16.6	15.8	20.8	14.7	19.9	23.3	15.2	17.9	17.9	22.2	19.6	19.3	23.1	16.5	19.6	15.4	21.4	17.1	15.7	19.4		10.2	17.0	11.1	10.7	9.0	
31. <i>A. hippolyti</i>	20.1	21.4	18.2	18.0	18.2	18.7	19.0	19.2	20.4	18.9	18.2	20.4	18.4	20.2	20.6	19.9	22.4	19.3	21.5	24.1	20.3	15.2	9.6	19.9	18.7	19.2	29.5	23.6	22.2	23.3		18.4	10.6	13.9	7.8	
32. <i>I. saxicola</i>	29.5	30.7	28.1	27.9	28.0	28.5	26.4	25.3	35.6	26.6	24.2	33.2	24.9	27.4	33.7	29.5	26.8	30.1	34.6	29.3	26.2	32.7	29.3	31.5	28.9	31.4	28.4	33.9	28.3	30.6	35.0		16.8	14.7	18.0	
33. <i>A. discolor</i>	21.8	24.0	15.7	15.1	15.4	13.1	15.4	13.4	18.5	15.3	13.9	19.4	16.8	19.5	22.9	15.1	18.1	18.0	20.0	19.7	13.8	27.6	21.4	23.6	21.9	19.8	19.9	21.6	20.2	20.5	27.5	29.9		11.0	6.4	
34. <i>A. caerulea</i>	17.3	18.0	13.1	11.4	12.1	11.9	12.6	12.2	16.1	14.7	15.0	20.6	12.7	15.1	16.5	13.5	14.7	12.6	17.3	17.0	15.6	16.8	12.2	14.5	11.4	16.0	15.5	16.5	17.2	17.7	18.1	27.2	16.7		10.5	
35. <i>A. turrita</i>	20.1	22.7	16.1	14.8	16.3	15.3	14.4	13.2																												

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

