

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

**Μελέτη της φυλογένεσης
του χερσαίου σαλιγκαριού *Albinaria* (Gastropoda: Clausiliidae)**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΚΑΡΑΚΑΣΗ ΔΑΝΑΗ

Τριμελής επιτροπή: Λαδουκάκης Ε., Μυλωνάς Μ., Πουλακάκης Ν.

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ) στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών: Περιβαλλοντική Βιολογία – Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Νίκος Πουλακάκης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Εξεταστική Επιτροπή:

Εμμανουήλ Λαδουκάκης (Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μωυσής Μυλωνάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Νίκος Πουλακάκης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Εισαγωγικό σημείωμα

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ). Η επιτυχή ολοκλήρωσή της ήταν αποτέλεσμα συνεργασίας ενός πλήθους ατόμων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Πρώτα και κύρια ευχαριστώ τον καθηγητή και επιβλέποντά μου Νίκο Πουλακάκη (Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης) για την υπόδειξη του θέματος και τη βοήθειά του όχι μόνο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας αλλά και τα προηγούμενα χρόνια συνεργασίας μας. Είναι για μένα ένας από τους πιο προωθητικούς και άξιους επιστημονικούς συμβούλους που είχα και στάθηκε δίπλα μου σε πειραματικά, εργαστηριακά, ερευνητικά θέματα και όχι μόνο, με έναν σπάνια ειλικρινή και ανθρώπινο τρόπο.

Ευχαριστώ τον Μωυσή Μυλωνα (Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης) και την Κατερίνα Βαρδινογιάννη (έφορος τμήματος Ασπονδύλων εκτός Αρθροπόδων, Μ.Φ.Ι.Κ.) για τη βοήθειά τους με τα δείγματα, τη μετάδοση των γνώσεων που έχουν για την *Albinaria* και τη στήριξή τους καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Ευχαριστώ την Σίλια Αντωνίου (Μεταδιδάκτωρ, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών) για τη βοήθειά της στην εργαστηριακή διαδικασία και στην ανάλυση των δεδομένων καθώς και την ακούραστη καθημερινή ψυχολογική και υλική υποστήριξή της ακόμα και με φουσκωμένη την κοιλιά, ακόμα και με το μικρό πλασματάκι Διώνη αγκαλιά.

Χωρίς τη βοήθεια των Αλέξανδρο Σταματάκη (Professor, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, Germany) και Diego Darriba (Dr., Scientific Computing (SCO) του Heidelberg Institute of Theoretical Studies) και ιδιαίτερα του Νίκου Ψωνη (Δρ. Βιολόγος του Πανεπιστημίου Κρήτης), δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση των φυλογενετικών αναλύσεων και τους ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Ευχαριστώ επίσης τον Σίνο Γκιώκα (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης) για τα δείγματα εκτός Κρήτης και τη βοήθειά του, καθώς και τον Μανώλη Νικολακάκη για τη βοήθεια στην κατασκευή των χαρτών.

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου καθώς και άτομα από τις πτέρυγες Ξ και Π, που πέρα από πρακτική αλληλεγγύη και βοήθεια, έδωσαν στις ατελείωτες ώρες στο εργαστήριο, το common room και το γραφείο μια πολύ ευχάριστη νότα. Θα ήθελα να εκφράσω ξεχωριστά την ευγνωμοσύνη και αγάπη μου στη Λουκία, τον Γιάννη και την Ελεάνα.

Δε θα μπορούσα τέλος να μην αναφερθώ με λύπη, στον μεγάλο αριθμό σαλιγκαριών που θανατώθηκαν στην εργασία αυτή.

Καρακάση Δανάη,
Ηράκλειο 2017

Περίληψη

Το Αρχιπέλαγος του Αιγαίου, που αποτελείται από μεγάλο αριθμό νησιών και νησίδων με μεγάλη ετερογένεια στις τοπογραφικές, ιστορικές και περιβαλλοντικές ιδιότητές του, προσφέρει ένα ιδανικό φυσικό εργαστήριο για τη μελέτη της οικολογίας, της εξέλιξης και της βιογεωγραφίας των οργανισμών. Τα σαλιγκάρια ως οργανισμοί θεωρούνται κατάλληλοι για τέτοιου είδους μελέτες, κυρίως γιατί έχουν περιορισμένη ικανότητα διασποράς. Το πνευμονοφόρο γένος σαλιγκαριού *Albinaria* Vest, 1867 εξαπλώνεται στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου με επίκεντρο το Αιγαίο και χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλό βαθμό γενετικής και μορφολογικής διαφοροποίησης. Έχουν περιγραφεί πάνω από 400 μορφολογικά taxa και ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών έχει προσπαθήσει να προσεγγίσει την ταξινόμηση του χερσαίου αυτού σαλιγκαριού. Το αποτέλεσμα είναι να έχουν γίνει τουλάχιστον τρεις συνολικές αναθεωρήσεις του γένους και πολλές επιμέρους, στις οποίες είτε αυξάνεται είτε μειώνεται ο αριθμός των ειδών ανάλογα με τις υποκειμενικές τάσεις του εκάστοτε μελετητή να συγχωνεύει ή να διαχωρίζει τάξα. Σήμερα, μετά από περισσότερα από 100 χρόνια μορφολογικών και μοριακών αναλύσεων, δεν έχουν ακόμα επιλυθεί τα συστηματικά προβλήματα του γένους. Στην παρούσα μελέτη επιχειρείται η επίλυση των προβλημάτων αυτών μέσω της μελέτης της φυλογένεσης της *Albinaria*, χρησιμοποιώντας τη Νέας Γενιάς Αλληλούχισης μέθοδο ddRADseq, η οποία έχει καταφέρει σε αντίστοιχες περιπτώσεις να δώσει απαντήσεις. Χρησιμοποιώντας 204 άτομα από το μεγαλύτερο μέρος της κατανομής του γένους, που αντιστοιχούν σε 64 από τα 101 είδη της σημερινής ταξινομικής κατάταξης, παράχθηκαν χιλιάδες γενετικοί τόποι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου. Τα αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη 15 διακριτών κλάδων με σχετικά σαφή γεωγραφικά δομή: Β. Ελλάδα, Ιόνιο, Πελοπόννησος (2), Κύθηρα, Τουρκία, Κυκλάδες/Δωδεκάνησα, Σκύρος, Σίφνος και Κρήτη (6) που περιλαμβάνουν ο καθένας από 1 έως 9 μορφολογικά είδη.

Λέξεις κλειδιά

Albinaria, Ανατολική Μεσόγειος, Αιγαίο Αρχιπέλαγος, ddRADseq, Φυλογένεση

Abstract

The Aegean archipelago, comprising numerous islands and islets with great heterogeneity in topographic, geological, historical and environmental properties, offers an ideal natural laboratory for ecological and evolutionary research. Land snails have been considered as ideal organisms for such studies mainly because of their low active dispersal ability. The pulmonate land snail of the genus *Albinaria* Vest, 1867 is distributed around the north-eastern coasts of the Mediterranean and is characterized by a high degree of morphological and molecular differentiation, especially in the south Aegean. More than 400 morphological taxa have been named and many evolutionists and taxonomists have tried to approach its taxonomy. As a consequence, several revisions have been made in which the number of species is varying according the taxonomist preference as a splitter or a lumpers. Today, after 100 years of morphological and molecular research, the taxonomic tasks of this genus have not been resolved. This study, is a try to overcome these problems through a molecular phylogenetic approach, using the Next Generation Sequencing method ddRADseq, which is characterized as very promising for difficult phylogenetic tasks. Two-hundred-four specimens collected from sites covering a large part of its range which correspond to 64 of the 101 nominal species – according to the current taxonomy-, were used. Thousands genetic loci containing numerous SNP`s were produced and used to build a phylogenetic tree. The results show the presence of 15 discrete clades with relatively clear geographic structure: N. Greece, Ionian islands, Peloponissos (2), Kythera, Turkey, Cyclades/Dodecanese, Skyros, Sifnos and Crete (6) which include from 1 to 9 nominal species.

Key words:

Albinaria, Snail, Western Mediterranean, Aegean Archipelago, ddRADseq, Phylogeny

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΑΓΓΛΙΚΗ	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ <i>ALBINARIA</i>	8
<i>Βιολογία και Ποικιλότητα</i>	8
<i>Κατανομή</i>	9
<i>Ταξινομική</i>	10
1.2 ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	12
<i>Παλαιογεωγραφία</i>	13
1.3 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ-ΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ	15
1.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ – ddRADseq.....	16
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	17
2.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	19
<i>Εξαγωγή DNA</i>	19
<i>Προετοιμασία «βιβλιοθήκης» ddRADseq και αλληλούχιση Illumina</i>	19
2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	21
2.4 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	24
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	24
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ	25
3.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ	25
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
4.1 ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΤΑΧΑ ΤΗΣ <i>ALBINARIA</i>	39
<i>Κρήτη</i>	39
<i>Αιγαίο</i>	44
<i>Πελοπόννησος - Ιόνιο</i>	45
<i>Γιάννενα - Ευρυτανία</i>	46
4.2 ΓΕΝΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ.....	46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	55
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	68

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μεταξύ διάφορων ομάδων οργανισμών, τα χερσαία σαλιγκάρια είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι οργανισμοί κι έχουν πολλές φορές αποτελέσει μοντέλα για οικολογικές (Παρμακέλης, 2003), βιογεωγραφικές (Μυλωνάς, 1982; Τριάντης, 2002), εξελικτικές και φυλογενετικές (Ayoutanti, Krimbas, Mylonas, *et al.*, 1993; Douris, Cameron, *et al.*, 1998; Uit De Weerd, 2004) μελέτες, για διάφορους λόγους, κύριοι των οποίων είναι η περιορισμένη ικανότητα ενεργής διασποράς και η σχετική ευκολία στη συλλογή τους (Γκιώκας, 1996). Το γένος *Albinaria*, με το οποίο ασχολείται η παρούσα διατριβή, έχει χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες τέτοιες εργασίες (Ayoutanti *et al.*, 1987; Gittenberger, 1991; Douris *et al.*, 1995, 2007; Douris, Cameron, *et al.*, 1998; Douris, Giokas, *et al.*, 1998; Giokas *et al.*, 2000, 2005, 2010; Giokas and Mylonas, 2002; Uit De Weerd and Gittenberger, 2005, 2013; Meshner and Welter-Schultes, 2008; Welter-Schultes, 2010; Dimoroulou *et al.*, 2017) καθώς η διαφοροποίησή της κέντρισε το ενδιαφέρον πολυάριθμων εξελικτικών βιολόγων.

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ *ALBINARIA*

Βιολογία και Ποικιλότητα

Η *Albinaria* (Vest, 1867) είναι ένα γένος χερσαίων πνευμονοφόρων γαστερόποδων που ανήκει στην οικογένεια Clausiliidae η οποία χαρακτηρίζεται από λεπτά ατρακτοειδή κελύφη και την παρουσία μιας πολύπλοκης δομής ελασμάτων, ένα από τα οποία διαφοροποιήθηκε σε μια προστατευτική, σα θύρα, κατασκευή στην τελευταία περιέλιξη του κελύφους (clausilial apparatus)(Uit De Weerd, 2004). Δεν υπάρχει καταγεγραμμένος στη διεθνή βιβλιογραφία κανένας συναπομορφικός μορφολογικός χαρακτήρας που να διαχωρίζει το γένος *Albinaria* από τα υπόλοιπα γένη της οικογένειας. Τα άτομα της *Albinaria* είναι ενεργά κατά τη διάρκεια της υγρής περιόδου (Νοέμβριος-Απρίλιος) ενώ την περίοδο του καλοκαιριού, διαπαύουν (Giokas and Mylonas, 2002). Ζουν πάνω σε βράχους ή κάτω από πέτρες τρώγοντας βρύα και λειχήνες και σε κατάλληλες συνθήκες, δημιουργούν συναθροίσεις που μπορεί να φτάσουν το μέγεθος αρκετών δεκάδων ατόμων (Γκιώκας, 1996). Τα περισσότερα είδη χρειάζονται την παρουσία ασβεστολίθου, έχουν πολύ μικρή δυνατότητα ενεργητικής διασποράς (κάποια άτομα μπορεί να περάσουν ολόκληρους μήνες πάνω σε έναν και μόνο βράχο), στοιχεία που υποδεικνύουν την άμεση συσχέτισή τους με συγκεκριμένες οικολογικές συνθήκες και παραμέτρους (Welter-Schultes, 2000). Αυτή η εξάρτηση από τους ασβεστόλιθους καθώς και η πολύ χαμηλή ικανότητα διασποράς, έχει υποστηριχθεί ότι έχει παίξει ρόλο στην ειδογένεση και τη μορφολογική διαφοροποίηση εντός της *Albinaria* (Nordsieck, 1997).

Ένα βασικό στοιχείο που τη χαρακτηρίζει είναι η εξαιρετικά υψηλή μορφολογική διαφοροποίηση (Εικόνα 1) και φαίνεται, από όσα είναι γνωστά μέχρι στιγμής, ότι αυτή δε σχετίζεται με αντίστοιχη οικολογική διαφοροποίηση. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, στην ανάπτυξη μιας θεωρίας μη-προσαρμοστικής διάσπασης (non-adaptive radiation) (Gittenberger, 1991). Έχουν ωστόσο διατυπωθεί και διαφορετικές απόψεις όπως αυτή που υποστηρίζει ότι φυσικά επιλεγμένα εξωτερικά χαρακτηριστικά της *Albinaria* σχετίζονται με οικολογικούς, συνήθως μη-ανιχνεύσιμους, παράγοντες και ότι πολλά είδη είναι μόνο οικολογικές μορφές και όχι βιολογικά είδη (Mylonas *et al.* 1987).



Εικόνα 1. Μορφολογική διαφοροποίηση στην *Albinaria*. Στην εικόνα εμφανίζονται με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά τα εξής είδη: *A. spratti*, *A. broemmei*, *A. teres*, *A. praeclara*, *A. cretensis*, *A. eburnea*, *A. edmundi*, *A. violacea*, *A. thisseae*, *A. sublamellosa*.

Κατανομή

Εξαπλώνεται στην Ελλάδα, την Κύπρο, τμήματα της Νότιας Αλβανίας και τα παράλια της Μικράς Ασίας (Εικόνα 2). Μέχρι πρόσφατα, στην κατανομή της συμπεριλαμβανόταν και ο Λίβανος με τις *A. nadimi* Tohme & Tohme, 1988, *A. hedenborgi* Pfeiffer, 1850 και *A. staudingeri* (Boettger, 1890). Το 2005 ωστόσο, οι Uit De Weerd και Gittenberger υποστήριξαν πως τα taxa αυτά ανήκουν στο γένος *Carinigera* και συνεπώς ο Λίβανος βγαίνει εκτός κατανομής της *Albinaria*.

Τα περισσότερα είδη εντοπίζονται στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στο Νότιο Αιγαϊακό Τόξο με τον αριθμό τους να αντιπροσωπεύει το 15% της ελληνικής χερσαίας μαλακοπανίδας (Giokas and Mylonas, 2002; Uit De Weerd, 2004; Welter-Schultes, 2010). Η Κρήτη αποτελεί την περιοχή με τη μεγαλύτερη ποικιλότητα καθώς σε αυτήν εντοπίζονται 31 από τα 101 περιγραμμένα είδη (Welter-Schultes, 2010), όλα εκ των οποίων είναι ενδημικά της (Douris, Cameron, *et al.*, 1998).

Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της κατανομής της είναι η γενική έλλειψη γεωγραφικής επικάλυψης (συμπατρίας) έτσι ώστε σε κάθε τοποθεσία συνήθως βρίσκεται μόνο ένα είδος, σπάνια δύο και σπανιότατα τρία (Γκιώκας, 1996). Κανόνας είναι η παραπάτρια κατανομή (Douris, Cameron, *et al.*, 1998).

Η πληθυσμιακή δομή που συνήθως παρατηρείται στην *Albinaria* είναι μικροί απομονωμένοι δήμοι μέσα σε μεγαλύτερους πληθυσμούς σε κατακερματισμένα ενδιαιτήματα (Giokas and Mylonas, 2004; Giokas *et al.*, 2010; Kornilios *et al.*, 2015).



Εικόνα 2. Χάρτης εξάπλωσης της *Albinaria* (Uit De Weerd and Gittenberger, 2005), τροποποιημένος έτσι ώστε να είναι κίτρινο ο Λίβανος αφού από την ίδια εργασία προκύπτει ότι τα είδη της *Albinaria* που κατανέμονται εκεί, ανήκουν πλέον στο γένος *Cristataria*.

Ταξινομική

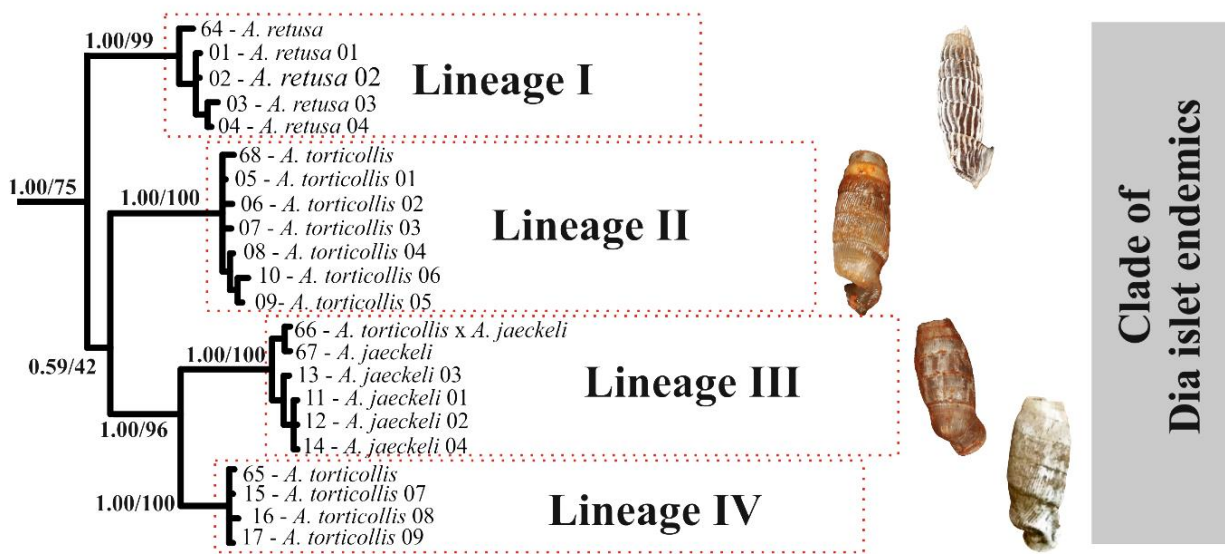
Επειδή η ταξινόμηση της *Albinaria* βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και δεδομένου ότι το γένος διαθέτει μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία, μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 400 περίπου διαφορετικά taxa (Douris *et al.*, 2007) εκ των οποίων πάνω από 140 είναι στο επίπεδο του είδους (Dimoroulou *et al.*, 2017).

Στα τέλη του 19ου αιώνα γίνεται η πρώτη περιγραφή του γένους από τον Von Vest (1867) και λίγα χρόνια αργότερα γίνεται η πρώτη αναθεώρησή του από τον Boettger (1878), ο οποίος περιγράφει πολλά είδη, μορφές και ποικιλίες, στηριζόμενος σε κελυφικούς χαρακτήρες. Λίγο αργότερα γίνεται η δεύτερη όπου τα είδη ταξινομούνται με βάση το αναπαραγωγικό σύστημα και το ξύστρο (Wagner, 1923, 1924). Ο Nordsieck (1977, 1999) ωστόσο, θεωρώντας ότι το αναπαραγωγικό σύστημα δεν παρέχει πληροφορίες, αναθεωρεί την ταξινόμηση αυτή βασιζόμενος σε κελυφικούς χαρακτήρες. Κατά τη διάρκεια αυτή, δημοσιεύονται διάφορες επιμέρους εργασίες που περιγράφουν νέα είδη (Tomlin, 1935; Gittenberger, 1979; Gittenberger *et al.*, 1988; Wiese, 1989; Kemperman and Gittenberger, 1990; Schilthuizen and Gittenberger, 1991; Neubert, 1993, 1998; Nordsieck, 1997) καθώς επίσης και εργασίες που αμφισβητούν την ταξινομική κατάσταση του γένους ή/και τους χαρακτήρες που έχουν χρησιμοποιηθεί γι' αυτήν (Ayoutanti *et al.*, 1987; Kemperman, 1992; Douris *et al.*, 1995; Schilthuizen *et al.*, 1995; Gittenberger and Schilthuizen, 1996; Γκιώκας, 1996; Douris, Giokas, *et al.*, 1998; Giokas, 2000). Χαρακτηριστική είναι η άποψη των Mylonas *et al.* (1987) που στην εργασία τους με τίτλο "*The genus Albinaria Vest. Is there any true species?*" θεωρούν ότι ο πραγματικός αριθμός των ειδών της *Albinaria* είναι πολύ μικρότερος. Αυτό βέβαια το ερώτημα για το αν υπάρχουν πραγματικά είδη ή απλώς εμφανίζεται γεωγραφική ποικιλότητα στο πλαίσιο του είδους, έχει τεθεί για την *Albinaria* ήδη από τον Boettger το 1883. Και όπως αναφέρει ο Γκιώκας το 1996 στη διδακτορική του διατριβή, φαίνεται πως

πάνω από 100 χρόνια ταξινομικών προσεγγίσεων δεν ήταν αρκετά για την επίλυση των συστηματικών προβλημάτων του γένους.

Η ταξινόμηση της *Albinaria* έχει γίνει χρησιμοποιώντας μη-διαγνωστικούς κελυφικούς χαρακτήρες οι οποίοι δεν αποτελούν συναπομορφίες (Uit De Weerd and Gittenberger, 2005). Οι μορφολογικοί χαρακτήρες που έχουν χρησιμοποιηθεί, ποσοτικοί και ποιοτικοί, κελύφους και γεννητικού συστήματος, δεν έχουν συνεισφέρει στο διαχωρισμό ομολογιών και ομοπλασιών (Douris *et al.*, 1995) και η αξιολόγησή τους δεν ακολουθεί κάποιο συνεπές κριτήριο (Douris, Giokas, *et al.*, 1998). Έτσι, η διάκριση των ειδών μεταξύ τους είναι συχνά αμφίβολη (Gittenberger and Schilthuizen, 1996) και οι ταξινομικές ιεραρχήσεις δεν μπορούν να αντικατοπτρίζουν το υπόβαθρο των φυλογενετικών σχέσεων.

Από τα τέλη της δεκαετίας του '80, ερευνητές και ερευνήτριες προσπαθούν να προσεγγίσουν τη φυλογένεση και τη φυλογεωγραφία της *Albinaria* χρησιμοποιώντας πιο σύγχρονα εργαλεία (βιοχημικά δεδομένα: αρχικά με χρήση αλλοενζύμων, έπειτα με χρήση DNA) (Mylonas, Krimbas, Sourdis, *et al.*, 1987; Kemperman and Degenaars, 1992; Schilthuizen and Lombaerts, 1994; Douris *et al.*, 1995, 2007; Douris, Cameron, *et al.*, 1998; Douris, Giokas, *et al.*, 1998; Schilthuizen *et al.*, 2004; Uit De Weerd and Gittenberger, 2005; Giokas *et al.*, 2010). Τα αποτελέσματα δείχνουν ασυμφωνία με τα μορφολογικά δεδομένα με taxa τα οποία διακρίνονται ξεκάθαρα μορφολογικά να μην ξεχωρίζουν μοριακά [π.χ. *A. caerulea* (Douris *et al.*, 2007)] και είδη να εμφανίζονται πολυφυλετικά [π.χ. *A. cretensis*, (Schilthuizen & Gittenberger 1999)] ή παραφυλετικά (βλ. παράδειγμα στην Εικόνα 3). Ωστόσο, παραμένουν σημαντικά προβλήματα και ασυμφωνίες μεταξύ των αποτελεσμάτων των βιοχημικών αναλύσεων [βλ. ανασκόπηση του Giokas (2000)]. Το σύνολο των εργασιών αυτών αφορούν μερικά μόνο από τα taxa μιας συγκεκριμένης περιοχής της κατανομής του γένους (Douris, Giokas, *et al.*, 1998). Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι δείκτες που έχουν μέχρι τώρα χρησιμοποιηθεί ενδεχομένως να μην είναι αρκετά πληροφοριακοί ή αρκετοί, έχει ως αποτέλεσμα να μην έχει καταφέρει ούτε αυτή η προσέγγιση να ξεκαθαρίσει την ταξινόμηση και τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών της *Albinaria*.



Εικόνα 3. Στο φυλογενετικό δέντρο της εικόνας εμφανίζονται τα 3 ενδημικά είδη της Δίας. Η *A. torticollis*, η οποία αποτελεί ένα μορφολογικό είδος, εμφανίζεται παραφυλετική σε σχέση με την *A. jaeckeli* καθώς μια ομάδα της *A. torticollis* (Lineage

IV) φαίνεται να είναι πιο συγγενική με τη *A. jaeckeli* σε σχέση με μία δεύτερη γενεαλογική γραμμή της *A. torticollis* (Lineage II), παρόλο που μεταξύ τους οι 2 ομάδες δεν διακρίνονται μορφολογικά ενώ με την *A. jaeckeli* διαφέρουν (Dimopoulou *et al.*, 2017).

Είναι σημαντικό να τονιστεί, πως το πρόβλημα της ταξινόμησης δεν αφορά μόνο αυτό το γένος της οικογένειας Clausiliidae. Τα γένη *Albinaria*, *Cristataria*, *Isabellaria*, *Sericata* και *Carinigera* συνδέονται μεταξύ τους με την έννοια ότι είναι δύσκολο να διαχωριστούν μεταξύ τους μορφολογικά και βιογεωγραφικά (Uit De Weerd, 2004). Η μονοφυλία κανενός από αυτά τα γένη δεν είναι σίγουρη και για το λόγο αυτό δεν είναι δυνατό να γνωρίζουμε εάν τα είδη που περιλαμβάνει κάθε ένα από αυτά μοιράζονται μια κοινή εξελικτική ιστορία και διαφορετική από αυτή των άλλων υποτιθέμενων γενών. Για παράδειγμα, εργασίες έχουν δείξει πως τα γένη *Isabellaria* και *Cristataria* είναι πολυφυλετικά (Schilthuizen *et al.*, 1995; Douris, Giokas, *et al.*, 1998; Uit De Weerd *et al.*, 2004; Uit De Weerd and Gittenberger, 2013). Η ελλιπής περιγραφή και η αβέβαιη μονοφυλία του κάθε γένους, παρακωλύει τις μελέτες της εξελικτικής τους ιστορίας (Uit De Weerd, 2004).

Το σίγουρο είναι ότι όλοι οι ερευνητές και ερευνήτριες, ανεξάρτητα από τις μεθόδους που έχουν χρησιμοποιήσει και από την τάση τους να συγχωνεύουν ή να διαχωρίζουν είδη, συμφωνούν ότι η τρέχουσα ταξινόμηση της *Albinaria* είναι ασαφής και προβληματική [υπάρχουν περιπτώσεις όπου η διάκριση μεταξύ ειδών ή ακόμα και γενών είναι πολύ δύσκολη (Εικόνα 4)] και συνεπώς δεν ανταποκρίνεται στις φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών. Η αξιόπιστη ταξινομική (με την έννοια της διάκρισης των taxa), είναι προαπαιτούμενη για τη αποσαφήνιση των παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη της κατανομής των οργανισμών και των εξελικτικών τους σχέσεων.



Εικόνα 4. Κελύφη σαλιγκαριών από διαφορετικά γένη της οικογένειας Clausiliidae. Στην εικόνα εμφανίζονται με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά τα εξής είδη: *Agathylla biloba*, *Agathylla regularis*, *Sericata calabacensis*, *Sericata tantilla*, *Sericata lutracana*, *Alopiā bagatensis*, *Alopiā maciana*, *Carinigera drenovoensis*, *Isabellaria thessalonica*.

1.2 ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

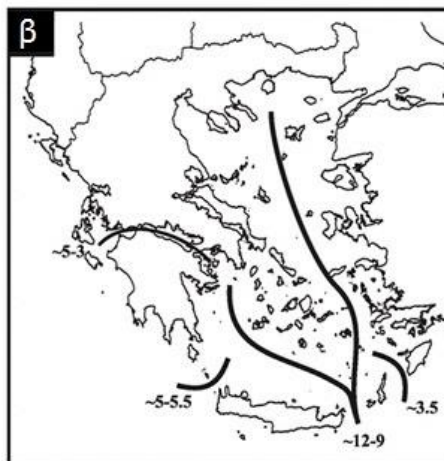
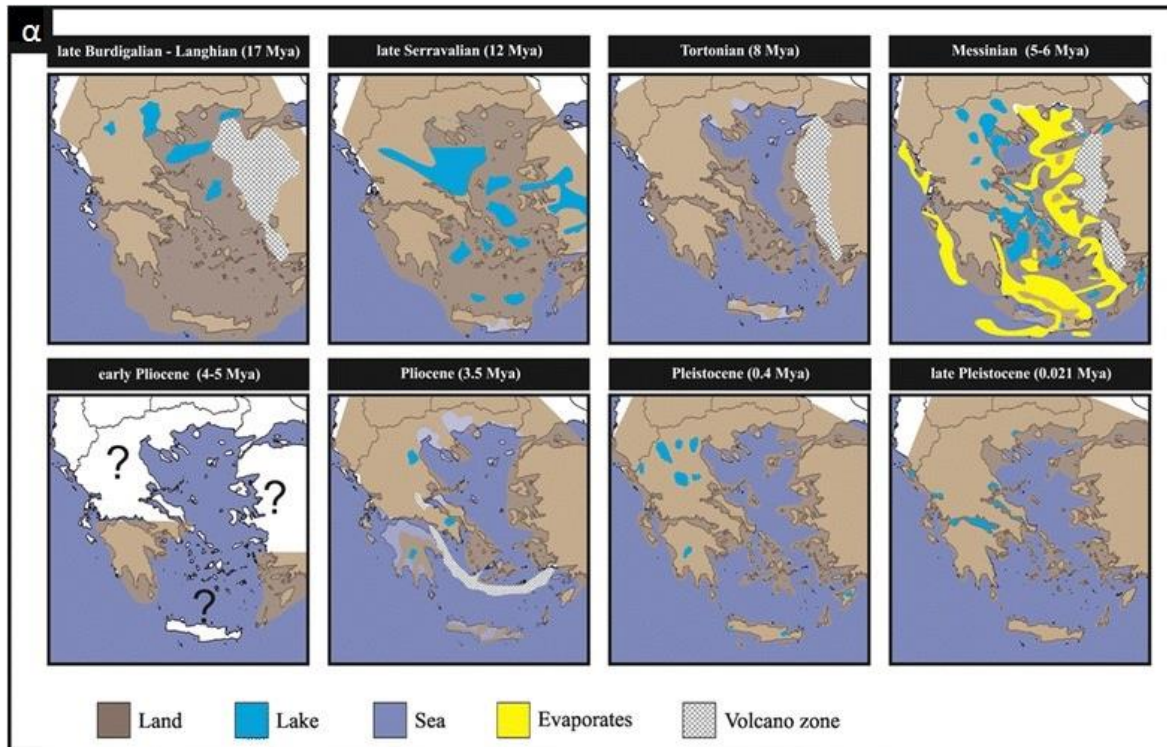
Η περιοχή στην οποία κατανέμεται η *Albinaria* (Εικόνα 2) και ιδιαίτερα το αρχιπέλαγος του Αιγαίου προσφέρει ένα ιδανικό περιβάλλον για τη μελέτη οικολογικών και εξελικτικών διεργασιών λόγω των πολυάριθμων νησιών και νησίδων που περιλαμβάνει τα οποία διακρίνονται από μεγάλη

ποικιλότητα σε τοπογραφικά, γεωλογικά, ιστορικά και περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά (Sfenthourakis and Triantis, 2017). Η παλαιογεωγραφία και παλαιοοικολογία της περιοχής έχει υπάρξει πολύ δυναμική με κύριες δυνάμεις την τεκτονική, ηφαιστειακά φαινόμενα και τον ευστατισμό (σε Douris et al. 2007) οι οποίες έχουν ανυψώσει, συγχωνεύσει και κατακερματίσει τη χέρσο, δημιουργώντας εκτεταμένες οροσειρές, πολυάριθμα νησιά και νησίδες, απομονώνοντας πληθυσμούς ή δίνοντάς τους ευκαιρίες διασποράς (Rouiakakis et al., 2015). Οι μεγάλες αυτές γεωλογικές και κλιματικές αλλαγές από τα τέλη του Τριτογενούς, ήταν υπεύθυνες σε μεγάλο βαθμό για τη διαφοροποίηση των οργανισμών. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη για την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ιστορίας των οργανισμών στο αρχιπέλαγος του Αιγαίου, είναι η παρουσία του ανθρώπου. Τα ελληνικά νησιά έχουν υποστεί έντονη ανθρώπινη επίδραση για περισσότερα από 8.000 χρόνια η οποία έχει συμβάλει σημαντικά στη διαμόρφωση του σημερινού τοπίου. Επομένως η παρουσία του ανθρώπου και οι μεταφορές οργανισμών για τις οποίες είναι υπεύθυνος, έχουν τροποποιήσει τα πρότυπα κατανομής διάφορων οργανισμών (Rouiakakis et al., 2015).

Παρακάτω περιγράφεται με συντομία η παλαιογεωγραφία του Αιγαίου.

Παλαιογεωγραφία

Η Αιγηίδα διαμορφώθηκε στη βόρεια ακτή της Τηθύος πριν από περίπου 23 εκ. χρόνια και συνεχίζει μέχρι και σήμερα να τροποποιείται εξαιτίας δύο κύριων τεκτονικών γεγονότων: της βύθισης της Αφρικανικής πλάκας κάτω από την Ευρασιατική και της ανατολικής μετατόπισης της μικροπλάκας της Ανατολίας η οποία προκαλεί μία βενταλωτή επέκταση του Αιγαίου προς το νότο (Lymberakis and Rouiakakis, 2010). Η παλαιογεωγραφική εξέλιξη του Ελλαδικού χώρου κατά τη διάρκεια αυτή περιγράφεται στην Εικόνα 5α από οκτώ παλαιογεωγραφικούς χάρτες που δείχνουν την κατανομή της ξηράς και της θάλασσας.



Εικόνα 5. (α) Η παλαιογεωγραφική εξέλιξη του ελλαδικού χώρου από το ανώτερο Βουρδιγάλιο – Λάγγιο (17 εκ. χρόνια πριν) έως το ανώτερο Πλειστόκαινο (20.000 χρόνια πριν από σήμερα), με βάση τη σημερινή γεωγραφία (βλ. βιβλιογραφία σε Poulakakis et al. 2015). (β) Οι κύριοι γεωλογικοί φραγμοί του Αιγαίου. Τα νούμερα είναι σε εκατομμύρια χρόνια πριν.

Σηματοδοτείται από τρία γεωλογικά γεγονότα που δημιούργησαν σημαντικούς γεωλογικούς φραγμούς (Εικόνα 5β) οι οποίοι μείωσαν τις ευκαιρίες διασποράς των οργανισμών με χαμηλή ικανότητα απομακρυσμένης διασποράς: 1) τη δημιουργία του φράγματος του Αιγαίου, 2) την απομόνωση της Κρήτης από την Πελοπόννησο μετά την κρίση του Μεσσηνίου και 3) το διαχωρισμό Κάσου και Καρπάθου από τη Ρόδο κατά το Πλειόκαινο. Στο Ανώτερο και Μέσο Μειόκαινο (23-12 εκ. χρόνια), το Αιγαίο αποτελούσε μια ενιαία μάζα ξηράς την Αιγιίδα. Ο σχηματισμός του φράγματος του Αιγαίου ξεκίνησε (12 εκ. χρόνια) και ολοκληρώθηκε (10 εκ. χρόνια) το Μειόκαινο, προκαλώντας το διαχωρισμό του Κεντρικού Αιγαίου από το Ανατολικό (Creutzburg, 1963; Dermitzakis and Papanikolaou, 1981). Κατά το Μεσσηνίο, η Μεσόγειος θάλασσα έκλεισε και απομονώθηκε από τον Ατλαντικό ωκεανό

(κρίση αλμυρότητας του Μεσσηνίου, 5.96-5.33 εκ. χρόνια), με αποτέλεσμα να αποξηραθεί (Krijgsman *et al.*, 1999). Τότε, τα νησιά της Μεσογείου μετατράπηκαν σε βουνά που περικλείονταν από στέπες ή ερήμους αλατιού επιτρέποντας έτσι σε κάποιους οργανισμούς να διασπαρούν. Ωστόσο η Κρήτη, παρέμεινε απομονωμένη από την υπόλοιπη περιοχή του Αιγαίου από εκτεταμένες ερήμους αλατιού ή αλμυρές λίμνες. Ένας παρόμοιος φραγμός παρέμεινε κατά τη διάρκεια της κρίσης αλμυρότητας και στο φράγμα του Αιγαίου. Το ξανα-άνοιγμα της Μεσογείου από την πλευρά του Ατλαντικού οδήγησε στην επαναπλήρωση της λεκάνης της Μεσογείου, με αποτέλεσμα την οριστική απομόνωση της Κρήτης από την Ανατολία, την Πελοπόννησο και τις Κυκλάδες και τη μονιμοποίηση του φράγματος του Αιγαίου. Κατά το Πλειόκαινο, το Αιγαίο κατακερματίστηκε σε πολυάριθμα νησιά. Στο Πλειστόκαινο, όλα τα σημερινά νησιά είχαν περίπου την ίδια θέση με τη σημερινή, και η περιοχή του Αιγαίου χαρακτηρίζεται από έντονες ορογενετικές, ευστατικές και ηφαιστειακές διεργασίες. Τα περισσότερα νησιά του Ιονίου απομονώθηκαν από την ηπειρωτική χώρα κυρίως κατά τη διάρκεια αυτή του Πλειστοκαίνου. Οκτώ χιλιάδες χρόνια πριν, η διαμόρφωση των ακτών ήταν σχεδόν όπως είναι και σήμερα (Perissoratis and Conispoliatis, 2003).

1.3 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ-ΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ

Το πρότυπο ειδογένεσης και διαφοροποίησης της *Albinaria* έχει χαρακτηριστεί πολύπλοκο (Douris, Giokas, *et al.*, 1998) καθώς οι εξελικτικές διεργασίες δεν ακολουθούν ένα σταθερό και ενιαίο (χρονικά και χωρικά) πρότυπο (Giokas, 2000). Στις διάφορες μελέτες που έχουν γίνει ως επί το πλείστον σε πολύ μικρό αριθμό ειδών ή σε συγκεκριμένες μόνο περιοχές, έχουν γίνει πολλές υποθέσεις για την εξέλιξή της. Αφορούν κυρίως το ρόλο που έχουν παίξει η διασπορά, ο βικαριανισμός, οι δευτερογενείς επαφές, ο υβριδισμός, η παθητική διασπορά κ.α. στο πρότυπο κατανομής των taxa που βλέπουμε σήμερα. Είναι πέρα από τους σκοπούς της παρούσας εργασίας να συζητηθούν αναλυτικά οι μικροεξελικτικές αυτές διεργασίες για τις οποίες μπορεί να ανατρέξει κανείς στη διεθνή βιβλιογραφία (Mylonas *et al.* 1987; Ayoutanti *et al.* 1993; Douris *et al.* 1998; Welter-Schultes 2000; Giokas 2000; Welter-Schultes 2001; Douris *et al.* 2007; Welter-Schultes 2010; Dimopoulou *et al.* 2017). Η πρώτη υπόθεση που αφορά τη διαφοροποίηση της *Albinaria* εν γένει, είναι αυτή του Gittenberger (1991) που υποστηρίζει ότι η *Albinaria* έχει διαφοροποιηθεί καταλαμβάνοντας πάνω κάτω τα ίδια ή πολύ παρόμοια ενδιαιτήματα. Η μορφολογική διαφοροποίηση δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη οικολογική διαφοροποίηση ή οι παρατηρούμενες διαφορές των ειδών, δεν αποτελούν προσαρμογές σε περιβαλλοντικές μεταβλητές, προτείνοντας συνεπώς την υπόθεση της μη-προσαρμοστικής διάσπασης (non-adaptive radiation). Η υπόθεση αυτή βέβαια, γίνεται με την παραδοχή ότι όλα τα μορφολογικά είδη της *Albinaria* αποτελούν «πραγματικά» είδη, γεγονός που άλλοι ερευνητές έχουν αμφισβητήσει, θεωρώντας ότι πολλά από τα είδη της *Albinaria* αποτελούν μόνο οικολογικές μορφές (Mylonas *et al.* 1987). Κοινά αποδεκτό από όλους μέχρι στιγμής πάντως φαίνεται να είναι το ότι η ειδογένεσή της είναι αλλοπάτρια. Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που δυσχεραίνει την κατανόηση της εξέλιξής της είναι το ότι δεν έχουν βρεθεί απολιθωμένα κελύφη (Welter-Schultes, 2000) τουλάχιστον όχι παλαιότερα των 15.000 χρόνων (Gittenberger and Goodfriend, 1993; Βαρδινογιάννη, 1994).

Είναι ίσως χρήσιμο να αναφερθεί πως η *Albinaria* δεν είναι η μόνη περίπτωση οργανισμού στο Αιγαίο για τον οποίο έχει διατυπωθεί η υπόθεση της μη-προσαρμοστικής διάσπασης. Αυτός ο μηχανισμός διαφοροποίησης, έχει διατυπωθεί για τα φυτά του είδους *Nigella arvensis* (Bittkau and Comes, 2005, 2009; Comes *et al.*, 2008), τα χερσαία γένη σαλιγκαριών *Mastus* (Parmakelis *et al.*, 2005)

και *Xerocrassa* (Sauer and Hausdorf, 2009, 2010) καθώς και για το ισόποδο *Armadillo tuberculatus* (Kamilari and Sfenthourakis, 2009).

1.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ – ddRADseq

Η διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων γίνεται μέσω φυλογενετικών μεθόδων (phylogenetic inference) που αξιολογούν παρατηρούμενα κληρονομικά χαρακτηριστικά όπως είναι οι μορφολογικοί χαρακτήρες ή οι αλληλουχίες DNA. Το αποτέλεσμα των παραπάνω αναλύσεων είναι η φυλογένεση ή το φυλογενετικό δέντρο, η οποία αποτελεί μια υπόθεση της πραγματικής ιστορίας των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών. Έχει ήδη αναλυθεί σε παραπάνω κεφάλαιο η προβληματική στη χρήση μορφολογικών δεδομένων για την ταξινόμηση και φυλογένεση της *Albinaria*. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας επιλέχθηκε σαν δείκτης φυλογένεσης το DNA, συνεπώς υπάγεται στον κλάδο της Μοριακής Φυλογένεσης.

Η Μοριακή Φυλογένεση βασίζεται στη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες. Μεταξύ άλλων, στα πλεονεκτήματα των μοριακών μεθόδων φυλογένεσης έναντι των μορφολογικών συμπεριλαμβάνονται η κληρονομησιμότητα του DNA, η έλλειψη υποκειμενικότητας στην περιγραφή των χαρακτήρων, η (σχεδόν) καθολικότητα του γενετικού κώδικα και η ευκολία παραγωγής (άρα και αφθονία) δεδομένων (Psonis, 2017).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν γίνει άφθονες μελέτες για την *Albinaria* με χρήση γενετικών δεικτών. Όλες ωστόσο οι μοριακές αναλύσεις που έχουν γίνει μέχρι στιγμής, αφορούν έναν ή ελάχιστους γενετικούς τόπους και συνήθως γονίδια του mtDNA. Είναι αλήθεια πως το mtDNA έχει συμβάλει σημαντικά στη φυλογεωγραφία (Avisé, 2000). Ωστόσο, η πιθανότητα το mtDNA να μην ανταποκρίνεται την εξελικτική ιστορία ειδών είναι σχετικά υψηλή σε περιπτώσεις ραγδαίας ή/και πρόσφατης διαφοροποίησης, όπως στην περίπτωση της *Albinaria*. Είναι επομένως σημαντικό να γίνεται άντληση δεδομένων από πολλαπλούς τόπους έτσι ώστε να εκτιμάται η ιστορία του οργανισμού και όχι μόνο ενός τόπου του. Έτσι, η αξιολόγηση της βιογεωγραφικής ιστορίας των οργανισμών θα είναι περισσότερο αξιόπιστη (Parent *et al.*, 2008). Επειδή λοιπόν ένα από τα προβλήματα στην ταξινόμηση και φυλογεωγραφία της *Albinaria* είναι η έλλειψη αρκετών και πολλαπλών μοριακών δεδομένων, χρησιμοποιήσαμε μια μέθοδο η οποία έχει χαρακτηριστεί ως μια από τις πολλά υποσχόμενες στην επίλυση δύσκολων φυλογενετικών ερωτημάτων -έχει δώσει λύση δηλαδή σε αντίστοιχες περιπτώσεις [πχ *Partula* (Haronski *et al.*, 2017)]-, την double digested Restriction Associated DNA sequencing (ddRADseq) που χρησιμοποιεί τεχνολογίες Νέας Γενιάς Αλληλούχισης και έχει τη δυνατότητα να παράγει σε γρήγορο χρόνο και με χαμηλό κόστος, πολλά δεδομένα –SNPs– που προέρχονται από όλο το μήκος του γονιδιώματος.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

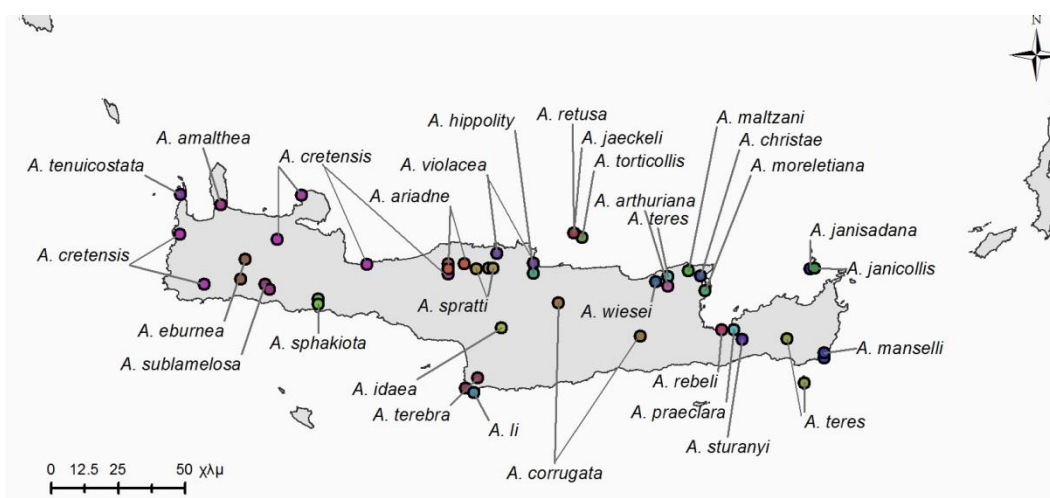
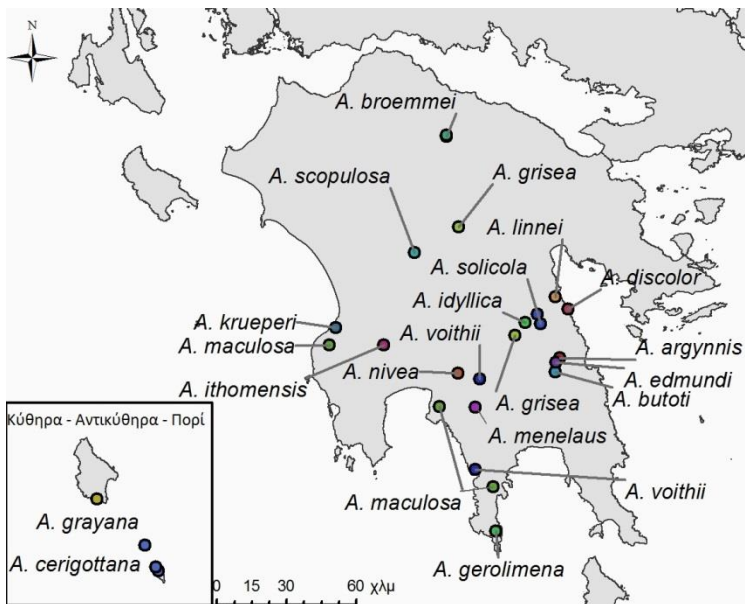
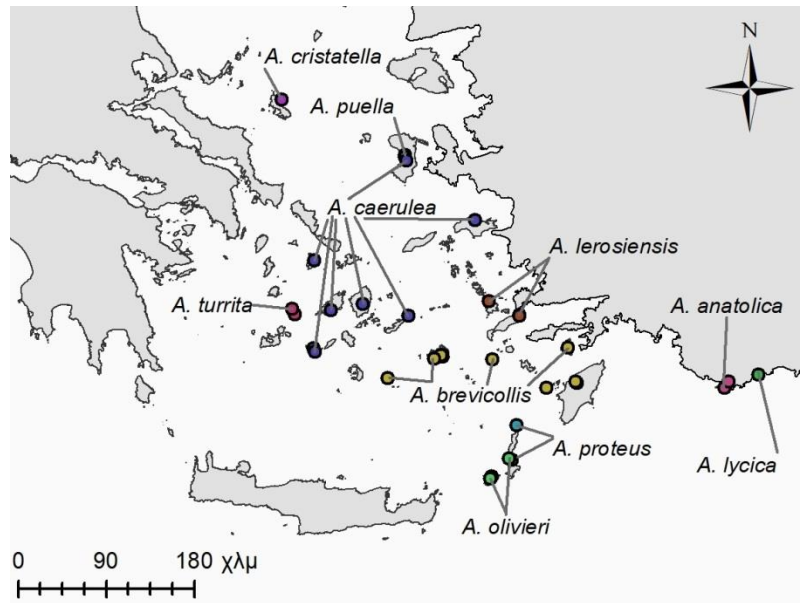
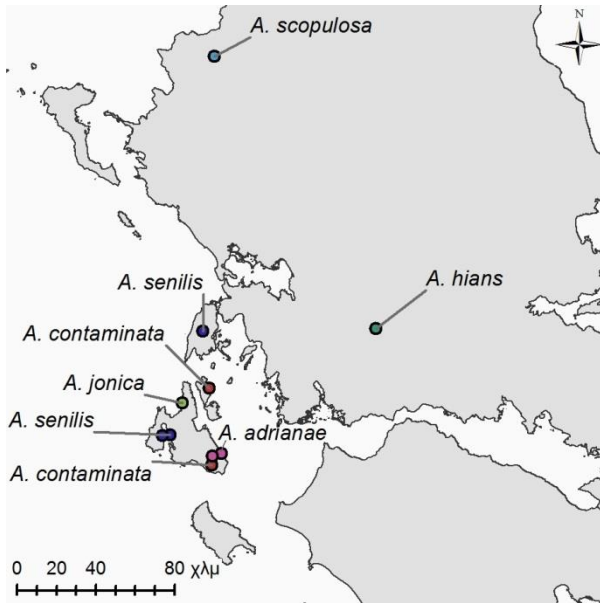
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών του γένους *Albinaria*. Η μελέτη δηλαδή της εξελικτικής της ιστορίας και η ανασύσταση των εξελικτικών σχέσεων –ή αλλιώς της συγγένειας– μεταξύ των διαφορετικών της taxa κάνοντας χρήση μοριακών δεικτών γενωμικών δεδομένων τύπου ddRADseq σε ένα σύνολο δειγμάτων που αντιπροσωπεύει την πλειονότητα (64 από τα 101) των μορφολογικά περιγεγραμμένων ειδών της *Albinaria*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Το τελικό σύνολο των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αποτελείται από 204 άτομα από 130 περιοχές της Ελλάδας και Τουρκίας. Τα δείγματα αυτά, αντιστοιχούν σε 64 από τα 101 μορφολογικά είδη που έχει περιγράψει ο Welter-Schultes (2012). Αντιπροσωπεύουν 63 από τα 80 μορφολογικά είδη που κατανέμονται στην Ελλάδα καθώς και ενός (*A. lycica* Nordsieck, 1993) που κατανέμεται στα παράλια της Τουρκίας (Εικόνα 6). Το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (Παράρτημα Ι), προέρχεται από τις συλλογές του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (Μ.Φ.Ι.Κ.) του Πανεπιστημίου Κρήτης και αφορά δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των ερευνητικών αποστολών των ερευνητών του Μουσείου καθώς και ορισμένα δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν από ερευνητές του Πανεπιστημίου Πάτρας (Αναπληρωτής Καθηγητής Σ. Γκιώκας κ.α.) και κατατέθηκαν στις συλλογές του Μ.Φ.Ι.Κ.

Η πλειοψηφία των δειγμάτων φωτογραφήθηκε και τα κελύφη αυτών που δεν καταστράφηκαν ολοσχερώς από τη διαδικασία εξαγωγής του DNA, φυλάχτηκαν στις συλλογές του Μ.Φ.Ι.Κ.



Εικόνα 6. Χάρτης κατανομής των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις. Πάνω αριστερά απεικονίζονται τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα νησιά του Ιονίου και την ηπειρωτική Ελλάδα, ακριβώς από κάτω αυτά που συλλέχθηκαν από την Πελοπόννησο τα Κύθηρα, το Πορτί και τα Αντικύθηρα. Πάνω δεξιά απεικονίζονται τα δείγματα που συλλέχθηκαν στα νησιά του Αιγαίου, τα νότια παράλια της Τουρκίας και το Καστελόριζο ενώ κάτω απεικονίζονται τα δείγματα που συλλέχθηκαν από το νησί της Κρήτης και τις γύρω βραχονησίδες.

2.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Όλες οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του Μ.Φ.Ι.Κ. εκτός από το τελευταίο στάδιο της αλληλούχισης. Εκατόν ένα από τα 204 δείγματα είχαν ήδη αλληλουχηθεί από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου το 2015. Συνεπώς οι εργαστηριακές αναλύσεις που περιγράφονται στο κεφάλαιο αυτό αφορούν τα υπόλοιπα 103 άτομα αν και η διαδικασία που ακολουθήθηκε και στις δύο περιπτώσεις είναι ίδια.

Εξαγωγή DNA

Το πρώτο βήμα των εργαστηριακών αναλύσεων ήταν η εξαγωγή DNA από τα δείγματα τα οποία ήταν διατηρημένα είτε σε 100% αλκοόλη είτε στους -20°C. Για την εξαγωγή χρησιμοποιήθηκε όλος ο μαλακός ιστός του ζώου αφού αυτός υπέστη πλύση με Tris-HCl (10 Mm). Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το τυπικό πρωτόκολλο Ammonium Acetate, το ειδικό πρωτόκολλο της Invitrogen (Genomic DNA Mini Kit) ή το ειδικό πρωτόκολλο εξαγωγής DNA CTAB. Έγιναν συνολικά εξαγωγές από 351 δείγματα και από αυτά επιλέχθηκαν 130 με ποσότητα DNA πάνω από 500ng, για τη δημιουργία «βιβλιοθήκης» ddRADseq. Τα 130 αυτά δείγματα, αραιώθηκαν ή συμπυκνώθηκαν αναλόγως, ώστε να περιέχουν όλα 500 ng DNA σε τελικό όγκο 43μl (απαραίτητος όγκος για το πρωτόκολλο).

Προετοιμασία «βιβλιοθήκης» ddRADseq και αλληλούχιση Illumina

Για την προετοιμασία «βιβλιοθηκών» ddRADseq ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην εργασία του Peterson και των συνεργατών του (2012). Τα βήματα είναι τα εξής:

Πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Επιλέχθηκαν τα MspI και SbfI. Το MspI «κόβει» συχνά επιτρέποντας «δειγματοληψία» πολλών γενετικών τόπων σε κάθε άτομο αλλά σε μικρό αριθμό ατόμων ενώ το SbfI που «κόβει» λιγότερο συχνά επιτρέπει τη «δειγματοληψία» σε λιγότερους γενετικούς τόπους, αλλά σε περισσότερα άτομα. Η πέψη έγινε με overnight επώαση στους 37 °C και η επιτυχία της ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης κάνοντας σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων στα οποία έγινε πέψη, των αρχικών DNA εξαγωγών τους και βαθμονομημένου μάρτυρα.

Αναδιευθέτηση δειγμάτων. Καθαρισμός δειγμάτων με μαγνητικά σφαιρίδια, ποσοτικοποίηση του DNA με τη συσκευή Qubit και αναδιευθέτησή τους στην πλάκα PCR με αύξουσα σειρά, όσον αφορά την ποσότητα του DNA. Αυτό γίνεται ώστε σε επόμενο βήμα, όπου ενώνονται δείγματα με διαφορετικό sequence barcode στο ίδιο διάλυμα, να μην υπάρχει υπερκερασμός ποσοτικά κάποιου δείγματος έναντι άλλου.

Δημιουργία και προσθήκη προσαγωγέων. Οι προσαγωγείς είναι συμπληρωματικοί με τα sticky end άκρα των θραυσμάτων που δημιουργήθηκαν από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού. Οι προσαρμογείς P1 φέρουν το sequence barcode (μοριακός ταυτοποιητής λίγων βάσεων που ταυτοποιεί μοναδικά κάθε άτομο) και είναι συμπληρωματικοί με τον SbfI, ενώ ο προσαρμογέας P2 είναι συμπληρωματικός με τον MspI, κοινός για όλα τα άτομα και φέρει μια δομή διχάλας στο ένα άκρο του.

Ο κάθε προσαρμογέας αποτελείται από δύο κατάλληλα σχεδιασμένες, μερικώς συμπληρωματικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (oligos) ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα συμπληρωματικά άκρα με τα ένζυμα περιορισμού και η κατάλληλη δομή διχάλας. Η συγκόλληση των oligos προς δημιουργία των προσαρμογέων γίνεται με επώαση στους 97,5 °C για λίγα λεπτά και βαθμιαία ψύξη 3 °C ανά λεπτό μέχρι τη θερμοκρασία των 21 °C. Η συγκόλληση των προσαρμογέων στα θραύσματα γίνεται χρησιμοποιώντας το ένζυμο T4 DNA λιγάση με επώαση στους 37°C για 30 λεπτά, θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου (heatkill) με επώαση στους 65°C για 10 λεπτά και σταδιακή ψύξη 2°C ανά 90 δευτερόλεπτα μέχρι τη θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Κάθε οριζόντια σειρά της πλάκας PCR αντιστοιχίζεται και με διαφορετικό προσαρμογέα P1, άρα και διαφορετικό sequence barcode.

Ένωση δειγμάτων. Τα δείγματα κάθε στήλης της πλάκας PCR που περιέχουν το καθένα από ένα διαφορετικό sequence barcode, ενώνονται για τη δημιουργία διαλυμάτων (pools). Στη συνέχεια αυτά περνούν σε άλλο ένα διπλό στάδιο καθαρισμού με μαγνητικά σφαιρίδια.

Διαλογή θραυσμάτων βάσει μεγέθους. Η διαλογή θραυσμάτων σε κάθε ένα από τα pools έγινε αυτόματα χρησιμοποιώντας τη συσκευή Pippin (Sage Science, Beverly, MA, USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως «παράθυρο» επιλογής θραυσμάτων επιλέχθηκε το εύρος 415–515ζ.β. (Leaché et al., 2015), ενώ το τελικό διάλυμα ποσοτικοποιήθηκε με χρήση της συσκευής Qubit.

Αντίδραση PCR. Σε αυτό το βήμα προστίθενται τα μοναδικά Illumina indices χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών, όπου ο εκκινητής P2 περιέχει το index και ο εκκινητής P1 είναι κοινός. Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται διαφορετικοί εκκινητές P2, ώστε τελικά κάθε μία από τις κάθετες στήλες της πλάκας PCR να έχει το ίδιο index και κάθε μία από τις οριζόντιες γραμμές να έχει το ίδιο barcode, καταλήγοντας, εντέλει, όλα τα άτομα να είναι διαφορετικά σημασμένα. Στην αντίδραση της PCR, λόγω του ότι ο προσαρμογέας P2 είναι διχαλωτός στο ένα άκρο του, στον πρώτο κύκλο γίνεται πρόσδεση μόνο του εκκινητή P1 και μέσω της επιμήκυνσης της αλυσίδας DNA ολοκληρώνεται ο προσαρμογέας P2. Σε αυτόν, από τον επόμενο κύκλο θα μπορεί να προσδεθεί ο εκκινητής P2 και να γίνει επιμήκυνση της αλληλουχίας στόχου και προσθήκη του index. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται αλληλούχιση μόνο των θραυσμάτων που έχουν και barcode και index. Οι συνθήκες της PCR ήταν οι ακόλουθες: αρχικό βήμα στους 98°C για 30 δευτερόλεπτα, δεύτερο βήμα 11 κύκλων και τριών σταδίων που αποτελείται από αποδιάταξη αλυσίδων DNA στους 98°C για 10 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα και τέλος ένα επιπλέον βήμα στους 72°C για 10 λεπτά και παραμονή στους 12°C. Την αντίδραση PCR ακολούθησε άλλο ένα στάδιο καθαρισμού με μαγνητικά σφαιρίδια και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του προϊόντος με χρήση της συσκευής Qubit.

Έλεγχος ποιότητας και τελική ποσοτικοποίηση. Γίνεται έλεγχος για την ποσότητα DNA και το μέγεθος θραυσμάτων που περιέχει το κάθε pool. Αυτό γίνεται αυτόματα κάνοντας χρήση της συσκευής Agilent 2100 Bioanalyser® (Agilent Technologies®, Santa Clara, California, USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το αποτέλεσμα δείχνει τόσο τη συγκέντρωση του DNA όσο και την κατανομή του μεγέθους των θραυσμάτων. Τέλος ενώθηκαν ισόποσα σε ένα διάλυμα όλα τα pool και δημιουργήθηκε η «βιβλιοθήκη» έτοιμη για αλληλούχιση βάσει των πρωτοκόλλων της Illumina.

Αλληλούχιση Illumina. Η Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς έγινε χρησιμοποιώντας τη συσκευή αλληλούχισης Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, California, USA) με το τελικό μήκος του προϊόντος να είναι 100 ζ.β. και κάνοντας αλληλούχιση μόνο της μιας αλυσίδας DNA (single-end) στις εγκαταστάσεις της STABVIDA (Campus FCT UNL, Lisbon, Portugal).

2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η επεξεργασία των ανακτηθέντων θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού pyRAD (Eaton, 2013). Ο διαχωρισμός (demultiplex) των δειγμάτων έγινε κάνοντας χρήση των μοναδικών sequence barcodes και Illumina indices, ενώ στο βήμα του αρχικού φιλτραρίσματος κάνοντας χρήση του ποιοτικού δείκτη Phred, οι νουκλεοτιδικές θέσεις με τιμή <20 μετατράπηκαν σε ακαθόριστη βάση (χαρακτήρας N) και τα θραύσματα με ≥ 14 N¹ απορρίφθηκαν. Κάθε τόπος μειώθηκε σε μήκος κατά πέντε θέσεις μετά την αφαίρεση των sequence barcodes. Στο σημείο αυτό, τα 130 αυτά άτομα ενώθηκαν με τα 101 άτομα που είχαν φτάσει στο βαθμό αυτό επεξεργασίας το 2015 (βλ κεφ 2.2). Τα φιλτραρισμένα θραύσματα των 231 πλέον ατόμων, ομαδοποιήθηκαν με βάση το λογισμικό VSEARCH v. 2.01 (<https://github.com/torognes/vsearch>) και στοιχήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού MUSCLE (Edgar, 2004). Σε αυτό το βήμα στοιχίζεται καθορίζεται η ομολογία μεταξύ των θραυσμάτων για κάθε άτομο (similarity threshold). Αποτελεί ουσιαστικά την κατώτερη τιμή ομοιότητας που επιτρέπεται να έχουν οι αλληλουχίες ενός τόπου για να εξακολουθεί να θεωρείται ένας τόπος. Επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικές τιμές (85%, 90%, 95%) ώστε να γίνει σύγκριση και να επιλεγθεί σε δεύτερο στάδιο καλύτερη από αυτές. Ως επιπλέον βήμα φιλτραρίσματος αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες τόπων που αποτελούνταν από μικρό αριθμό θραυσμάτων² (depth coverage<5), περίσσεια ακαθόριστων ή ετερόζυγων θέσεων (>5) ή πολλούς απλότυπους (>2 για διπλοειδία). Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους χρησιμοποιώντας το ίδιο όριο ομοιότητας με το προηγούμενο βήμα (85%, 90%, 95% αντίστοιχα). Ουσιαστικά, σε αυτό το βήμα καθορίζεται η ομολογία μεταξύ των ατόμων. Κάθε τόπος στοιχήθηκε με το λογισμικό MUSCLE και χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο για τον αποκλεισμό πιθανά παράλογων θέσεων, με την απόρριψη τόπων που χαρακτηρίζονται από περίσσεια κοινής ετεροζυγωτίας μεταξύ ατόμων. Αυτό βασίζεται στη θεώρηση ότι κοινά ετεροζυγωτικά SNPs μεταξύ ατόμων είναι πιο πιθανό να αντιπροσωπεύουν μια εγκαθιδρυμένη διαφορά μεταξύ παράλογων θέσεων αντί πραγματική κοινή ετεροζυγωτία εντός ομόλογων θέσεων μεταξύ ατόμων. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ένα φίλτρο που επιτρέπει το πολύ τρία άτομα να είναι ετερόζυγα σε μία συγκεκριμένη θέση (paralog = 3). Οι τελικοί ddRADseq γενετικοί τόποι στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας την τιμή «MinCov=4», η οποία καθορίζει τον ελάχιστο αριθμό ατόμων που απαιτείται να έχει δεδομένα παρόντα σε έναν τόπο ώστε να γίνει χρήση αυτού του τόπου στην τελική μήτρα δεδομένων. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας 27 από τα 231 άτομα αφαιρέθηκαν από το σύνολο των δεδομένων καθώς η ποιότητα των αλληλουχιών τους ήταν χαμηλή (πολύ μικρός αριθμός γενετικών τόπων).

¹ Ο αριθμός αυτός ισχύει για similarity threshold=0.85. Αλλάζει σε 9 και 4 για similarity threshold =0.90 και 0.95 αντίστοιχα.

² ο απαιτούμενος αριθμός πανομοιότυπων θραυσμάτων που ανακτήθηκαν για ένα συγκεκριμένο τόπο ώστε να θεωρηθεί έγκυρο το θραύσμα και ότι δεν αποτελεί τυχαίο «διάβασμα».

Επόμενο βήμα μετά την παραπάνω επεξεργασία των δεδομένων ήταν το περαιτέρω φιλτράρισμα, ώστε οι φυλογενετικές αναλύσεις της ενότητας που ακολουθεί να πραγματοποιηθούν αμερόληπτα ως προς την έλλειψη πληροφορίας. Στόχος ήταν να μειωθεί ο όγκος της ακαθόριστης πληροφορίας (missing data) και της μη χρήσιμης πληροφορίας όσον αφορά τη φυλογενετική συμπερασματολογία. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση των πανομοιότυπων αλληλουχιών ανά γενετικό τόπο και εφαρμόστηκαν δύο φίλτρα ώστε να χρησιμοποιηθεί ο ελάχιστος αριθμός πληροφοριακών (informative) και ποικιλόμορφων (variable) θέσεων που είναι ικανός να διαχωρίσει φυλογενετικά ένα συγκεκριμένο ελάχιστο αριθμό αλληλουχιών ανά τόπο (min_taxa). Η παράμετρος αυτή εξετάστηκε για ένα εύρος επτά διαφορετικών τιμών (4³, 5, 8, 12, 20 και 29) που είχαν ως αποτέλεσμα ο αριθμός των γενετικών τόπων να μειώνεται κάθε φορά κατά 20%. Δηλαδή δημιουργήθηκαν για κάθε μία από τις 3 τιμές similarity threshold, 6 διαφορετικά dataset τα οποία περιείχαν το 100%, 80%, 60%, 40%, 20% και 10% των φιλτραρισμένων γενετικών τόπων.

2.4 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Οι τελικές αναλύσεις⁴ για την κατασκευή φυλογενωμικών δέντρων πραγματοποιήθηκαν αφού έγινε ο έλεγχος της επιρροής της παραμέτρου similarity threshold καθώς και της παραμέτρου min_taxa στη φυλογένεση. Ο έλεγχος έγινε κάνοντας χρήση των δεκαοκτώ διαφορετικών συνόλων δεδομένων (αποτέλεσμα των τριών διαφορετικών τιμών similarity threshold επί των έξι διαφορετικών τιμών min_taxa) και μέσω της κατασκευής φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο Maximum Likelihood (ML) και τη στατιστική σύγκριση της τοπολογίας τους. Η κατασκευή των δέντρων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ExaML (Kozlov *et al.*, 2015) και η σύγκρισή τους έγινε με βάση το δείκτη RF distance⁵ (Robinson and Foulds, 1981), ο οποίος υπολογίστηκε κάνοντας χρήση του λογισμικού RAxML (Stamatakis, 2014). Για κάθε ένα από τα δεκαοκτώ σύνολα δεδομένων η ανάλυση ExaML πραγματοποιήθηκε 100 φορές (100 starting trees), εφαρμόζοντας το μοντέλο εξέλιξης Generalized time-reversible + gamma (+G) και το δέντρο με τη μέγιστη πιθανοφάνεια (best scoring tree) επιλέχθηκε για τη σύγκριση μεταξύ των συνόλων δεδομένων (σύγκριση μεταξύ των best scoring trees). Επιπλέον έγινε σύγκριση των 100 δέντρων εντός κάθε συνόλου για να ελεγχθεί η επιρροή του αρχικού δέντρου (starting tree) στην κατασκευή του ML δέντρου. Για το τελικό σύνολο δεδομένων που επιλέχθηκε έγινε στατιστικός έλεγχος με ταχείς ψευδο-επαναλήψεις bootstrap υπό το εξελικτικό μοντέλο GTRCAT. Ο απαιτούμενος αριθμός των επαναλήψεων υπολογίστηκε αυτόματα (επιλογή autoMRE).

Χρησιμοποιώντας το σύνολο δεδομένων που ήταν αποτέλεσμα της καταλληλότερης τιμής similarity threshold και min_taxa, έγινε επιπλέον κατασκευή δέντρου με βάση τη μέθοδο Bayesian Inference (BI). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό ExaBayes (Aberer *et al.*, 2014) υπό του μοντέλου GTR + G, χρησιμοποιώντας τέσσερις ανεξάρτητες «αλυσίδες αναζήτησης» (chains) και τουλάχιστον 500.000 «βήματα αναζήτησης/γενιές» (generations), ενώ αποθήκευση δέντρου γινόταν ανά 500 «γενιές». Επιπλέον εφαρμόστηκε το τεστ σύγκλισης ASDSF (όριο 5%), το οποίο μετά τις

³ Οι αριθμοί αυτοί ισχύουν για similarity threshold=0.85. Για similarity threshold=0.90 αλλάζουν σε: 4, 5, 7, 11, 18, 26 αντίστοιχα. Για similarity threshold=0.95 αλλάζουν σε: 4, 5, 7, 10, 15, 20 αντίστοιχα.

⁴ Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε συστοιχία υπολογιστών των εγκαταστάσεων του Heidelberg Institute of Theoretical Studies, Heidelberg, Germany.

⁵ Robinson-Foulds distance: η απόσταση (διαφορά) δύο ή περισσότερων φυλογενετικών δέντρων.

500.000 «γενιές» εξετάζει αν οι «αλυσίδες» έχουν φτάσει σε κατάσταση σταθερότητας γύρω από μια τιμή πιθανοφάνειας. Στην περίπτωση που κάτι τέτοιο δεν έχει επιτευχθεί, η ανάλυση συνεχίζει έως ότου αυτό πραγματοποιηθεί. Επίσης, το 25% των αρχικών εκτιμώμενων δέντρων απορρίφθηκε (burn-in). Το τελικό BI δέντρο (majority rule consensus tree) παρήχθη από την εκ των υστέρων κατανομή των παραγόμενων βέλτιστων δέντρων, ενώ για την στατιστική υποστήριξη της τοπολογίας χρησιμοποιήθηκαν οι εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities), οι οποίες υπολογίστηκαν ως το ποσοστό δειγμάτων (δέντρων) που έφερε μια συγκεκριμένη τοπολογία. Τιμές άνω του 95% υποδεικνύουν στατιστική σημαντικότητα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται στοιχεία των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχιση Illumina μετά από την επεξεργασία τους με το λογισμικό pyRAD και την εφαρμογή όλων των περαιτέρω φίλτρων.

Πίνακας 1. Αριθμός των τόπων (loci) και των μη-συνδεδεμένων πολυμορφικών θέσεων (unlinked bi-allelic SNPs) με τη χρήση τριών διαφορετικών ορίων ομοιότητας (similarity thresholds).

0.85	0.90	0.95
26971 loci, 22902 SNPs	31684 loci, 26678 SNPs	42773 loci, 34697 SNPs

Πίνακας 2. Αριθμός τόπων (loci) και αριθμού βάσεων (bp) για κάθε σύνολο δεδομένων, μετά την εφαρμογή φίλτρων.

Ποσοστό τόπων αρχικού σύνολο δεδομένων	Φίλτρα	0.85	0.90	0.95
100%	4_4_4*	11872loci/1123618bp	12922loci/1203551bp	10443loci/959328bp
80%	5_5_5	9891loci/942784bp	10648loci/997027bp	8084loci/746363bp
60%	8_7_7	6706loci/648184bp	8138loci/768266bp	6319loci/856339bp
40%	12_11_10	4897loci/478876bp	5104loci/488484bp	4053 loci/378943 bp
20%	20_18_15	2288loci/231508bp	2566loci/251557bp	2094 loci/199368 bp
10%	29_26_20	1224loci/127472bp	1279 loci/128328 bp	1019 loci/98931 bp

*οι τρεις αριθμοί αντιστοιχούν στο φίλτρο (τιμή min_taxa) για κάθε τιμή similarity thresholds αντίστοιχα.

Κατά την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο Maximum Likelihood για τον έλεγχο της επιρροής της παραμέτρου min_taxa στη φυλογένεση, διαπιστώθηκε ότι 12 άτομα του συνόλου των δεδομένων, μετά την εφαρμογή κάποιων φίλτρων, αποτελούνταν αποκλειστικά από μη-προσδιορισμένους χαρακτήρες, δηλαδή δεν περιείχαν καμία πληροφορία. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η κατασκευή δέντρων με δεδομένα από τα συγκεκριμένα φίλτρα να καταστεί αδύνατη. Τα άτομα αυτά υποδεικνύονται με ένα αστεράκι στον πίνακα του Παραρτήματος Ι. Τα σύνολα των δεδομένων που δε χρησιμοποιηθήκαν στις περεταίρω αναλύσεις είναι για similarity threshold=0.85 αυτά με τιμή min_taxa=12, 20 και 19, για similarity threshold=0.90 αυτά με τιμή min_taxa=11, 18 και 26 και για similarity threshold=0.95 αυτά με τιμή min_taxa=7, 10, 15 και 20.

Στον Πίνακα 3 φαίνεται ο αριθμός των διαφορετικών δέντρων από το σύνολο των δέντρων που προέκυψαν για κάθε σύνολο δεδομένων και η αντίστοιχη μέση σχετική τιμή RF distance. Επιπλέον, παρουσιάζεται η μέση σχετική τιμή RF distance του συνόλου των «καλύτερων» (best scoring) δέντρων.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα των αποστάσεων RF για κάθε φίλτρο (τιμή min_taxa) και για κάθε similarity threshold.

min_taxa	Ntrees ^α	RF ^β	RFscore ^γ (all)
similarity threshold 0.85			
4	93	0.102221	0.155887
5	97	0.132761	
8	83	0.114826	
similarity threshold 0.90			
4	80	0.123329	0.220564
5	91	0.130364	
7	97	0.126868	
similarity threshold 0.95			
4	96	0.09194	0.238806
5	98	0.053432	

^α ο αριθμός των μοναδικών δέντρων από 100 ExaML tree searches.

^β μέση σχετική τιμή RF distance μεταξύ των δέντρων.

^γ μέση σχετική τιμή RF distance μεταξύ των «καλύτερων» (best scoring) δέντρων.

Για τις περεταίρω αναλύσεις επιλέχθηκε το similarity threshold=0.85 αφού παρουσίασε τη χαμηλότερη τιμή RF, και το σύνολο δεδομένων με min_taxa=4 για τον ίδιο λόγο.

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

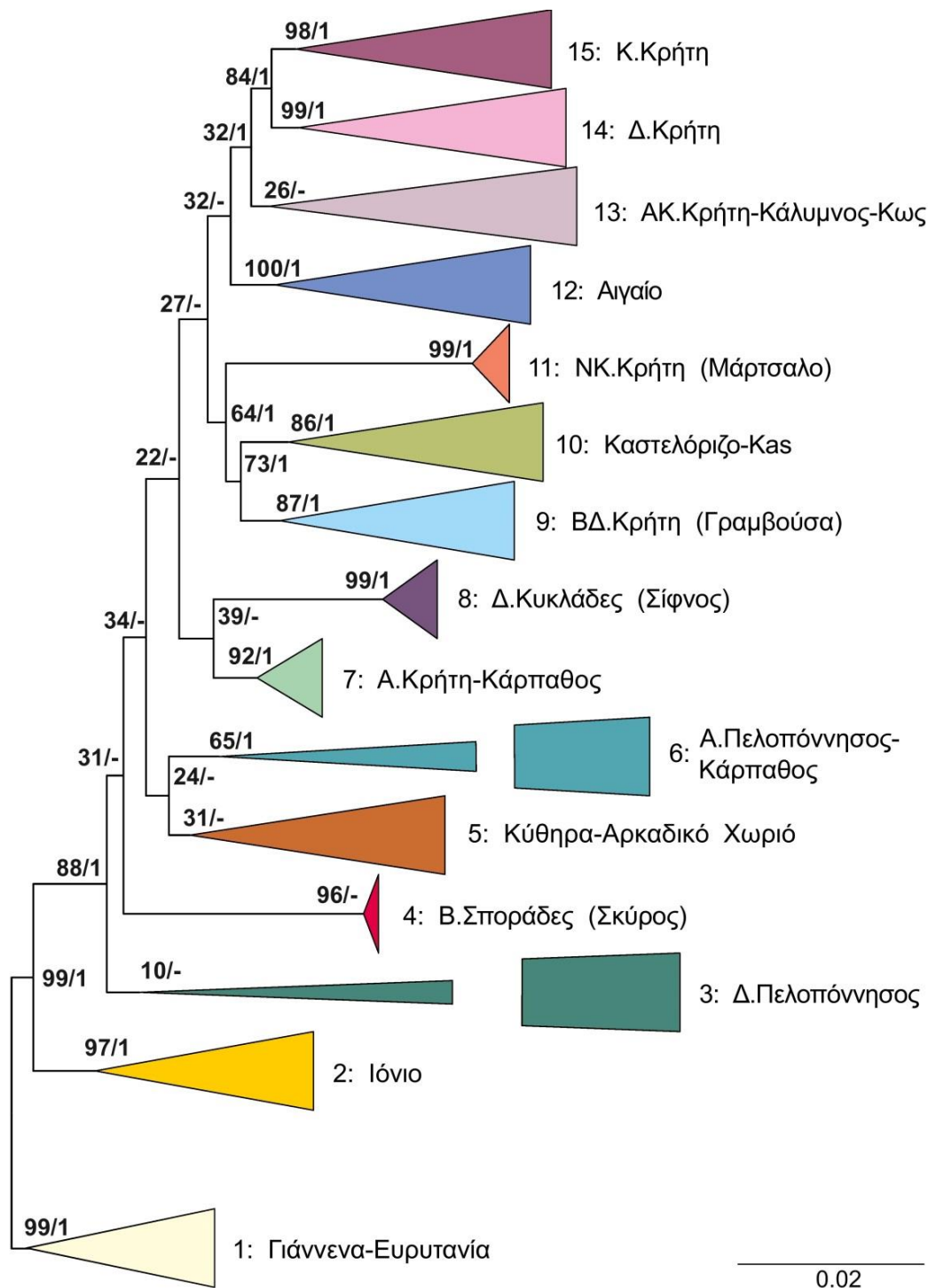
Η ανάλυση ML είχε ως τελικό αποτέλεσμα μία τοπολογία (εικόνα) με τιμή lnL=-3.265.240,87 (τελικές εκτιμήσεις παραμέτρων: συχνότητα βάσεων A=0,27, C=0,23, G=0,23, T=0,27, shape value (a)=0,31, A/C=1,00, A/G=2,04, A/T=0,87, C/G=0,74, C/T=2,08 και G/T=1).

Η ανάλυση BI ύστερα από περίπου >1.350.000 «γενιές» που απαιτήθηκαν για τη σύγκλιση των ανεξάρτητων αλυσίδων κατέληξε στην τοπολογία με μέση τιμή lnL=-3.262.466,95 και τιμές ESS>220.

3.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων, αφαιρέθηκαν, λόγω χαμηλής ποιότητας, στο σύνολό τους τα άτομα που είχαν επιλεχθεί να χρησιμοποιηθούν ως εξωομάδα και ανήκαν στα συγγενικά γένη *Idyla*, *Carinigera*, *Sericata* –κατά την τρέχουσα ταξινομική θεώρηση- της *Albinaria* (Παράρτημα I). Συνεπώς, το δέντρο που προέκυψε από τις αναλύσεις είναι άρριζο.

Για την περιγραφή της τοπολογίας και για τη συζήτηση των αποτελεσμάτων, θα αγνοηθούν τα 12 «προβληματικά» άτομα που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.1 καθώς έγινε φανερό από διάφορα δέντρα που προέκυψαν κατά τη διενέργεια των αναλύσεων από το πρόγραμμα ExaML, πως αυτά σε κάθε δέντρο εντοπιζόνταν σε διαφορετικούς κλάδους. Συνεπώς, η παρουσία τους στους συγκεκριμένους κλάδους του δέντρου που παρουσιάζεται εδώ είναι τυχαία. Είναι πιθανό η αφαίρεση των αλληλουχιών των ατόμων αυτών από το σύνολο των δεδομένων να αλλάξει σε κάποιο βαθμό την τοπολογία του φυλογενετικού δέντρου, αλλά αυτό μένει να ερευνηθεί.



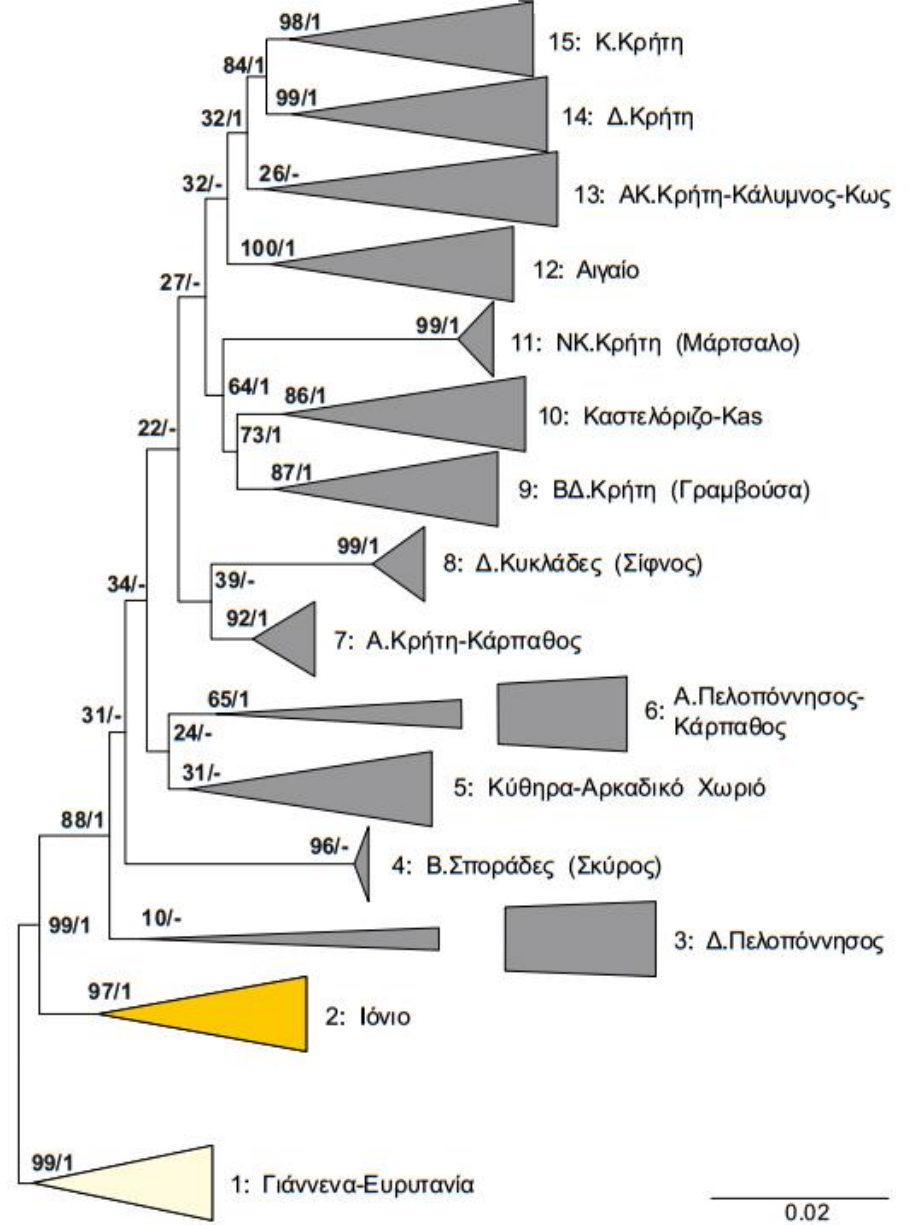
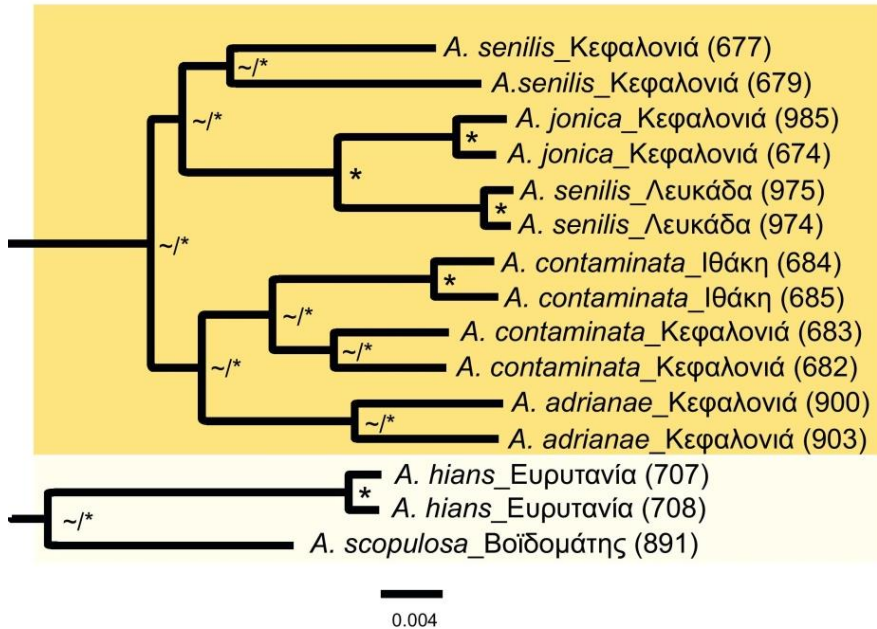
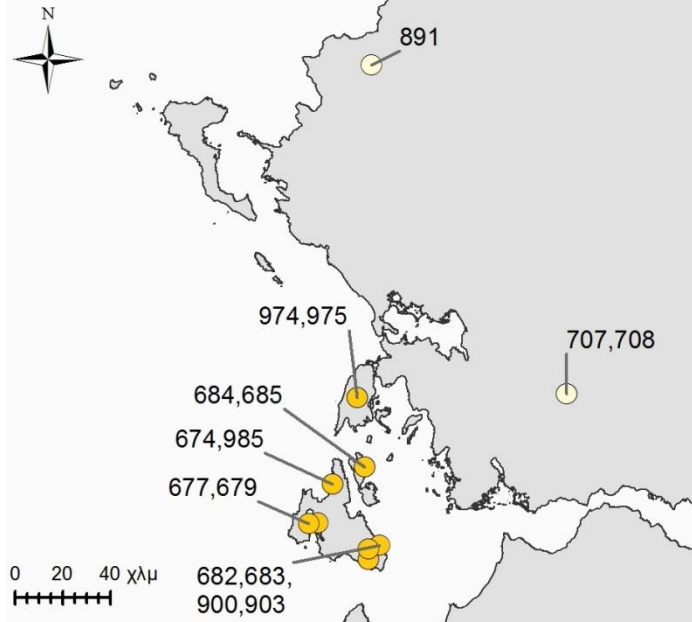
Εικόνα 7. Στην εικόνα απεικονίζεται το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από τις αναλύσεις. Οι αριθμοί πάνω ή δίπλα από κάθε κόμβο αντιστοιχούν στη στατιστική υποστήριξή τους και έχουν τη μορφή α/β, όπου α: ο αριθμός των bootstrap που προκύπτει από την ανάλυση Maximum Likelihood, και β: η εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability) που προκύπτει από την ανάλυση Bayesian Inference. Εάν κάποιος κλάδος δεν υποστηρίζεται από κάποια από τις αναλύσεις, αυτό υποδεικνύεται με μια πάυλα (-). Τα bootstrap =100 και οι εκ των υστέρων πιθανότητες =1, υποδεικνύονται με * ενώ τα bootstrap >95 και οι εκ των υστέρων πιθανότητες >0.95 υποδεικνύονται με ~. Η ύπαρξη ενός μόνο αστερίσκου (*) υποδεικνύει bootstrap=100 και εκ των υστέρων πιθανότητα=1.

Το δέντρο αποτελείται από 15 διακριτούς κλάδους και δείχνει να έχει μια σχετικά σαφή γεωγραφική δομή (Εικόνα 7). Ο πρώτος κλάδος (ανοιχτό κίτρινο) αποτελείται από δύο είδη με προέλευση από τα βόρεια όρια της σημερινής της κατανομής, στην Ευρυτανία και τα Γιάννενα. Ο δεύτερος (κίτρινο) αποτελείται από τέσσερα είδη των νησιών του Ιονίου και των γειτονικών ακτών της ηπειρωτικής Ελλάδας. Ο τρίτος (πράσινο) αποτελείται από οκτώ είδη με κατανομή στη Δυτική Πελοπόννησο. Στον τέταρτο κλάδο (κόκκινο) εμφανίζεται ένα είδος από τη Σκύρο, η *A. cristatella*, η οποία είναι ενδημική των Βόρειων Σποράδων. Ο πέμπτος κλάδος (καφέ) περιλαμβάνει τρία είδη με κατανομή σε Κύθηρα, Αντικύθηρα και το Αρκαδικό Χωριό στην Πελοπόννησο ενώ ο επόμενος (γαλαζοπράσινο), αποτελείται οκτώ είδη της Ανατολικής Πελοποννήσου και ένα είδος του συγκροτήματος Καρπάθου Σαρίας. Ο έβδομος (λαχανί), περιλαμβάνει επτά είδη εκ των οποίων τα έξι κατανέμονται στην Ανατολική Κρήτη, και ένα σε Κάσο και Κάρπαθο. Ο επόμενος κλάδος (μοβ) αποτελείται από ένα είδος το οποίο κατανέμεται στις Ανατολικές Κυκλάδες (τα άτομα που εμφανίζονται στο δέντρο έχουν συλλεχθεί από τη Σίφνο). Ο ένατος (γαλάζιο) και εντέκατος (λαχανί) περιέχουν τρία είδη από την Κρήτη. Συγκεκριμένα, ο ένατος περιλαμβάνει δύο είδη από το βορειοδυτικότερο άκρο της Κρήτης (Γραμβούσα-Ροδοπός) ενώ ο εντέκατος περιλαμβάνει ένα είδος από το νοτιοδυτικότερο άκρο του νομού Ηρακλείου. Μαζί με τον δέκατο κλάδο (λαχανί), ο οποίος περιλαμβάνει ένα είδος από το Καστελόριζο και το γειτονικό Κας της Τουρκίας καθώς και ένα από την περιοχή Ντέμρε της Τουρκίας, αποτελούν μια μονοφυλετική ομάδα, χωρίς όμως καλή στατιστική υποστήριξη. Ο δωδέκατος (μπλε) περιλαμβάνει τρία είδη τα οποία κατανέμονται στα νησιά του Αιγαίου. Ο τρεις τελευταίοι κλάδοι αποτελούν μία μονοφυλετική ομάδα ειδών με κατανομή στην Κρήτη. Ο κλάδος 13 (ανοιχτό ροζ) περιλαμβάνει οκτώ είδη με κατανομή στην κεντρική και ανατολική Κρήτη και ένα στην Κάλυμνο και Κω, ο κλάδος 14 (ροζ) περιλαμβάνει έξι είδη με κατανομή στη δυτική Κρήτη και ο κλάδος 15 (σκούρο ροζ) περιλαμβάνει επτά είδη με κατανομή στην κεντρική Κρήτη.

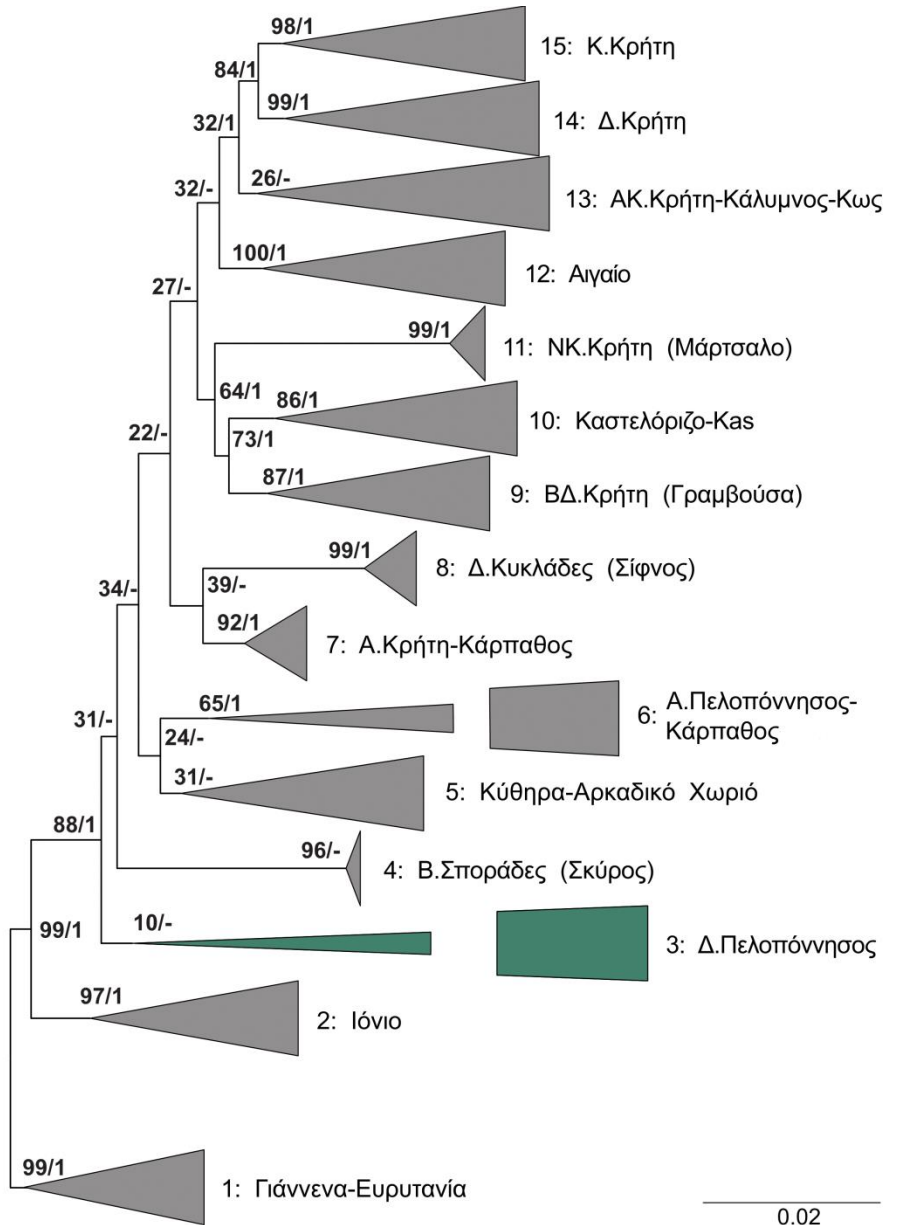
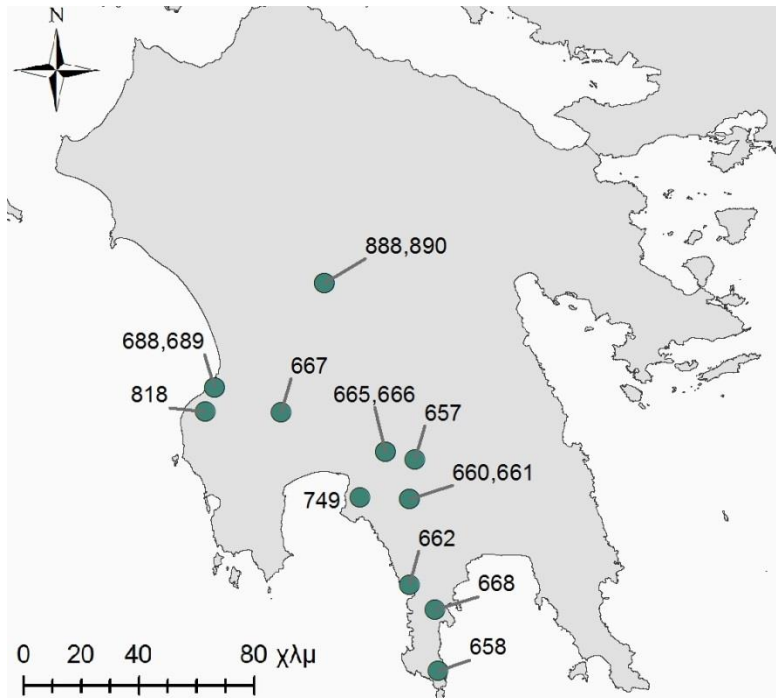
Πίνακας 4. Στον πίνακα φαίνονται τα μορφολογικά είδη που περιλαμβάνονται σε κάθε έναν από τους 15 κλάδους.

Κλάδος	Είδος
1	<i>A. hians</i> , <i>A. scopulosa</i>
2	<i>A. senilis</i> , <i>A. jonica</i> , <i>A. contaminata</i> , <i>A. adrianae</i>
3	<i>A. gerolimena</i> , <i>A. ithomensis</i> , <i>A. scopulosa</i> , <i>A. krueperi</i> , <i>A. maculosa</i> , <i>A. menelaus</i> , <i>A. nivea</i> , <i>A. voithii</i>
4	<i>A. cristatella</i>
5	<i>A. cerigottana</i> , <i>A. grayana</i> , <i>A. discolor</i>
6	<i>A. butoti</i> , <i>A. linnei</i> , <i>A. argynnis</i> , <i>A. solicola</i> , <i>A. broemmei</i> , <i>A. grisea</i> , <i>A. idyllica</i> , <i>A. edmundi</i> , <i>A. proteus</i>
7	<i>A. teres</i> , <i>A. manselli</i> , <i>A. sturanyi</i> , <i>A. rebeli</i> , <i>A. janisadana</i> , <i>A. janicollis</i> , <i>A. olivieri</i>
8	<i>A. turrita</i>
9	<i>A. tenuicostata</i> , <i>A. amalthea</i>
10	<i>A. lycica</i> , <i>A. anatolica</i>
11	<i>A. terebra</i>
12	<i>A. puella</i> , <i>A. brevicollis</i> , <i>A. caerulea</i>
13	<i>A. corrugata</i> , <i>A. wiesei</i> , <i>A. moreletiana</i> , <i>A. praeclara</i> , <i>A. arthuriana</i> , <i>A. li</i> , <i>A. christae</i> , <i>A. maltzani</i> , <i>A. lerosiensis</i>
14	<i>A. cretensis</i> , <i>A. sphakiota</i> , <i>A. sublamellosa</i> , <i>A. amalthea</i> , <i>A. eburnea</i> , <i>A. candida</i>
15	<i>A. jaeckeli</i> , <i>A. torticollis</i> , <i>A. violacea</i> , <i>A. spratti</i> , <i>A. idaea</i> , <i>A. hippolity</i> , <i>A. retusa</i>

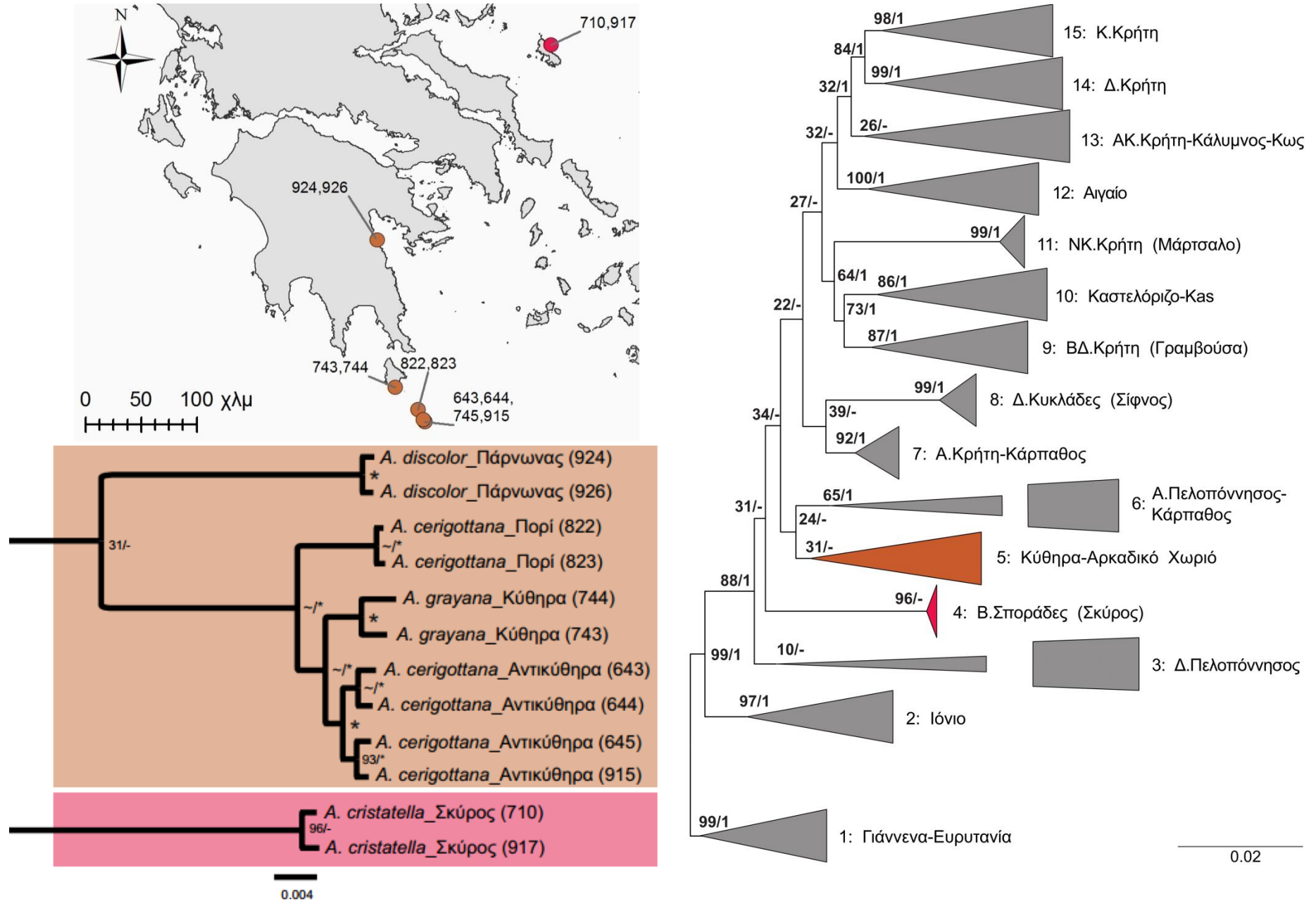
Στις εικόνες που ακολουθούν, εμφανίζονται αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που περιλαμβάνονται σε κάθε κλάδο μαζί με το χάρτη κατανομής τους.



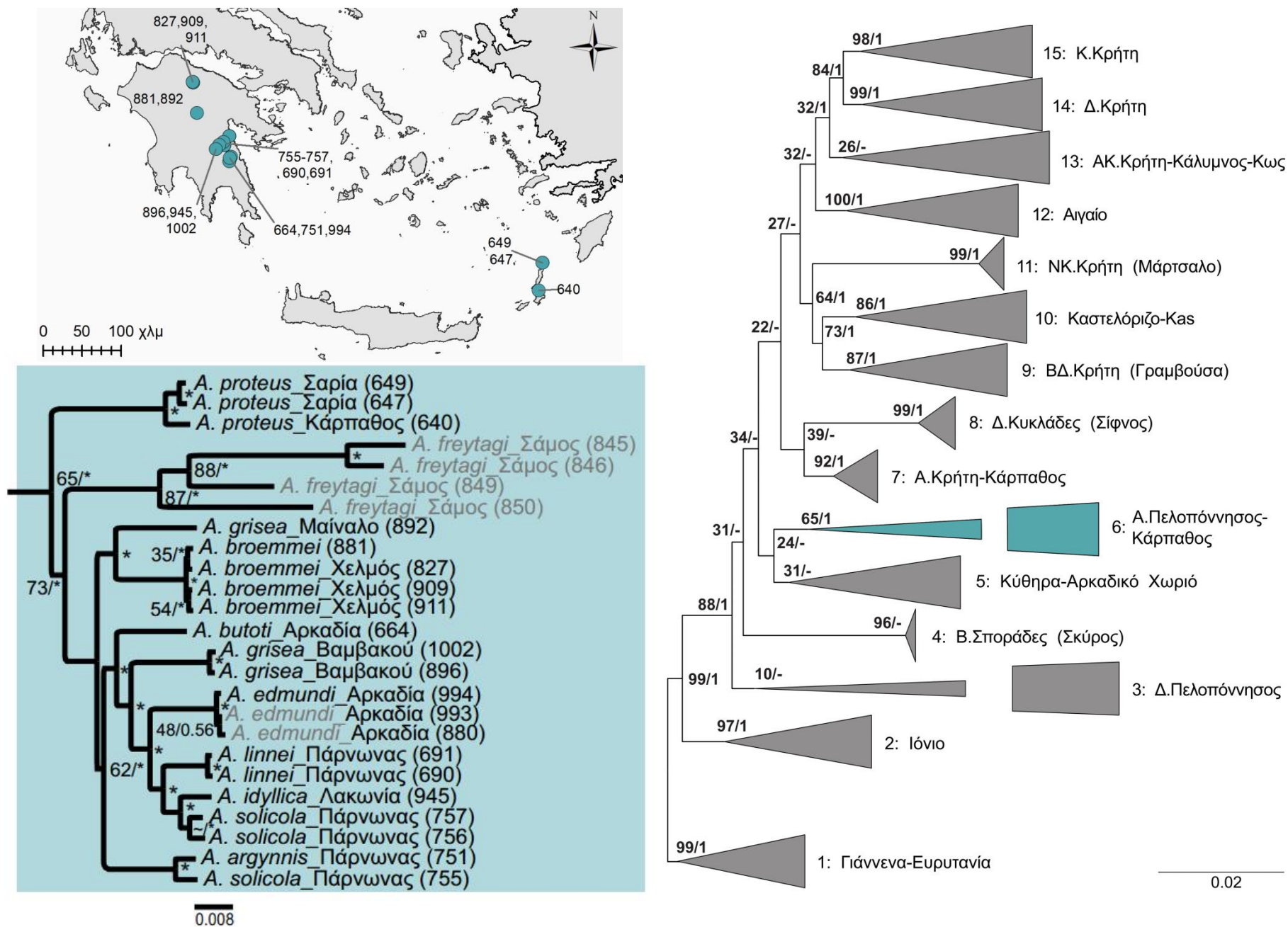
Εικόνα 8. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στους κλάδους 1 (ανοιχτό κίτρινο) και 2 (κίτρινο) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στους κλάδους 1 (ανοιχτό κίτρινο) και 2 (κίτρινο).



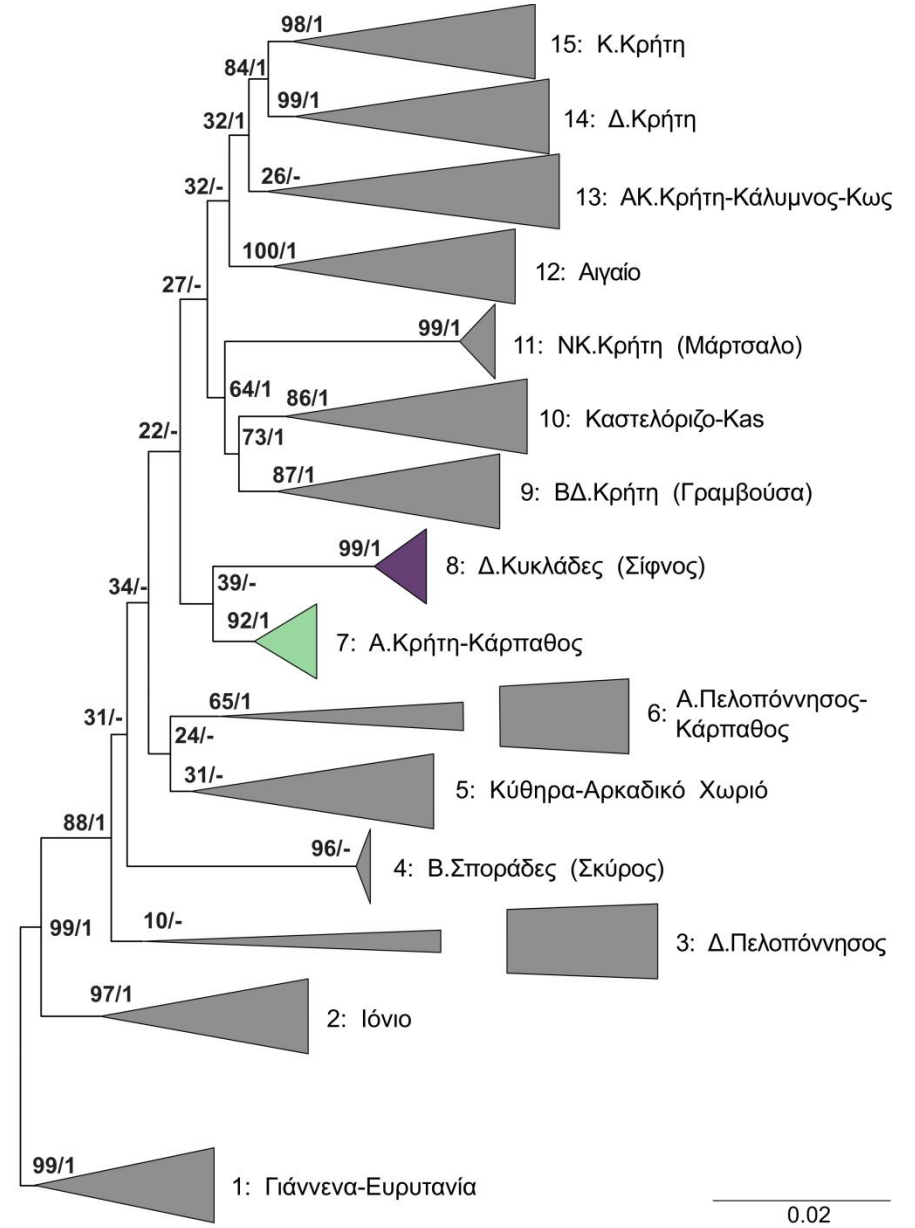
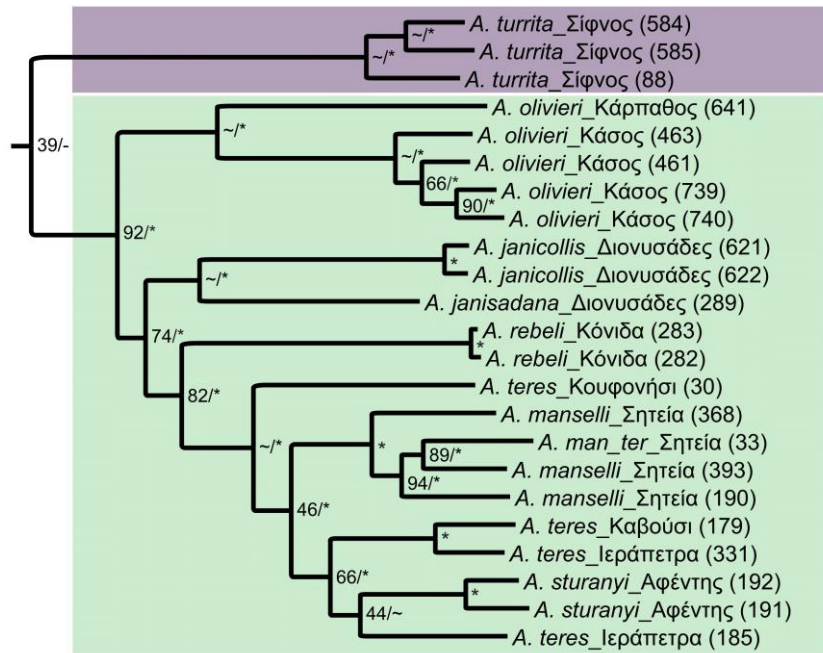
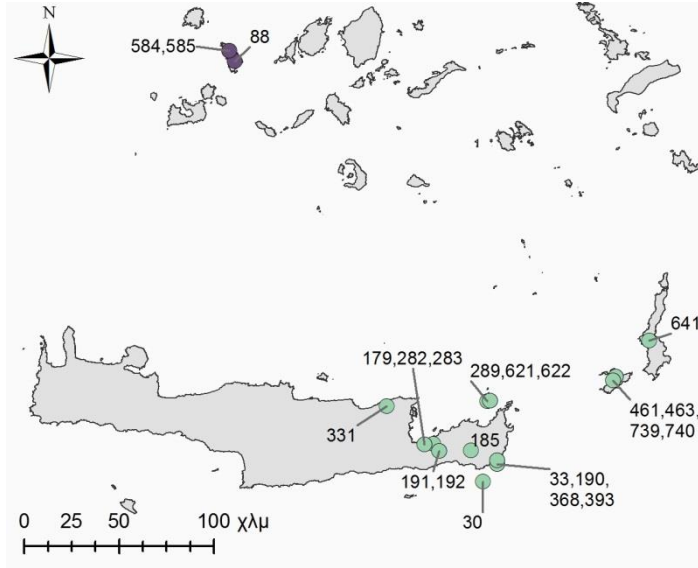
Εικόνα 9. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στον κλάδο 3 (πράσινο) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στον κλάδο 3.



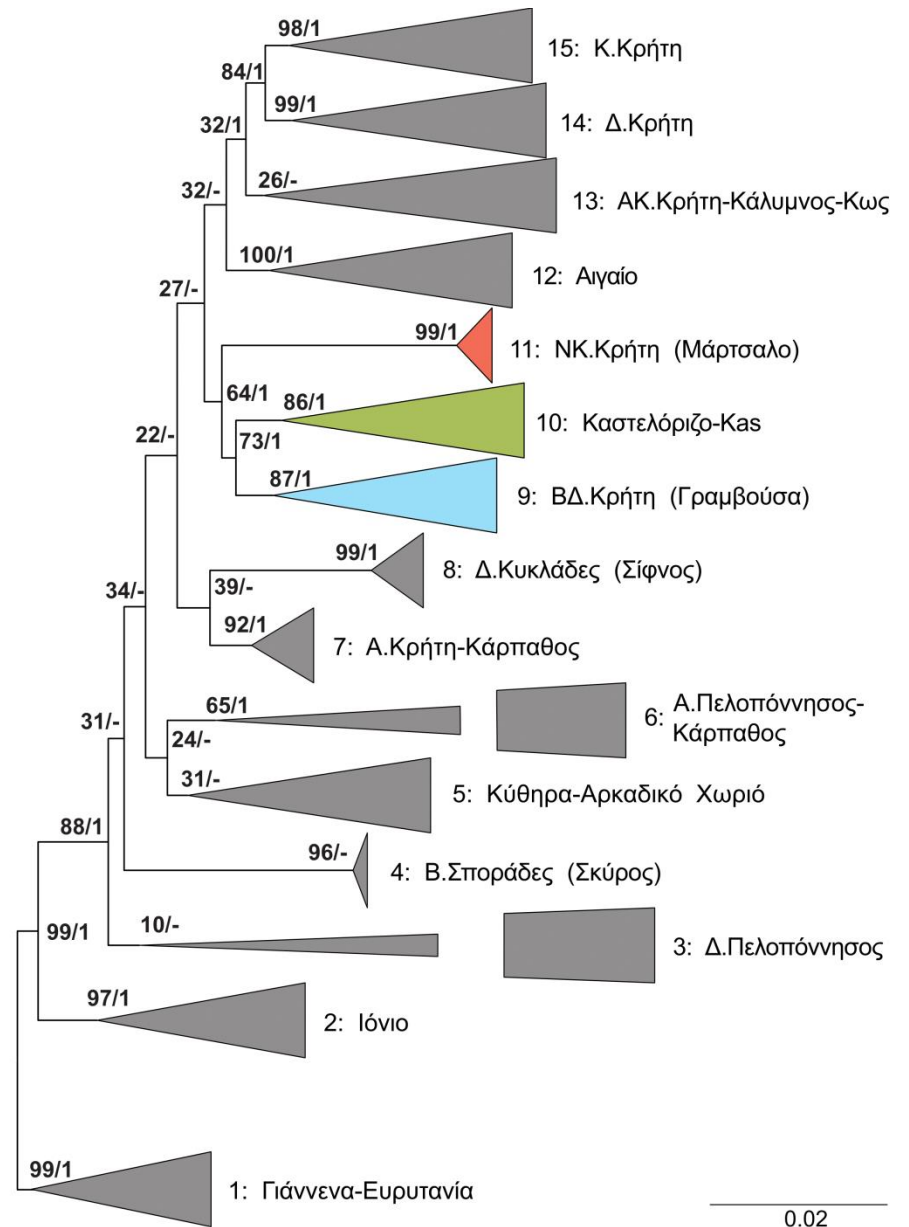
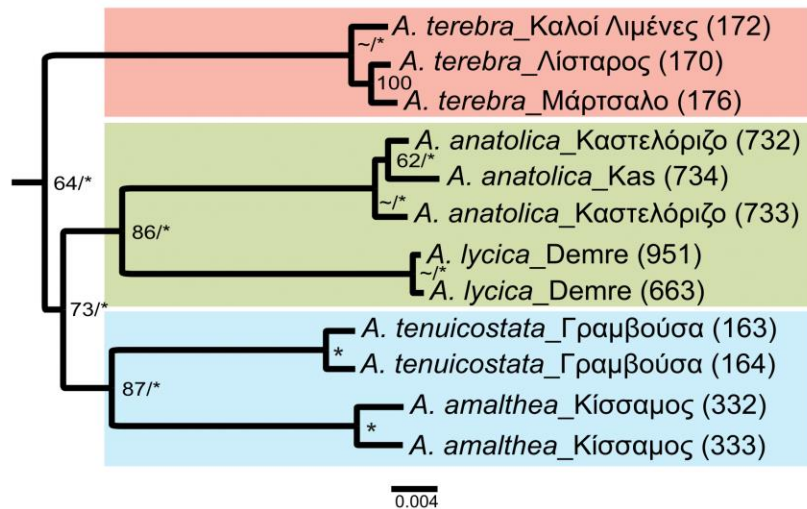
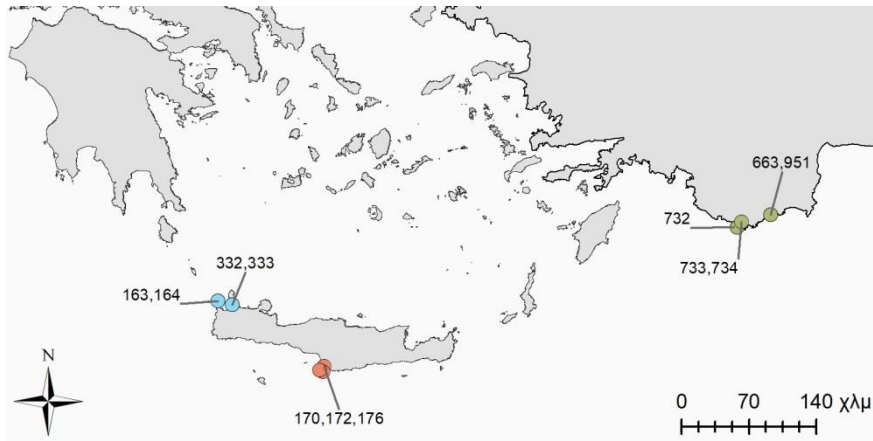
Εικόνα 10. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στους κλάδους 4 (κόκκινο) και 5 (καφέ) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στους κλάδους 4 (κόκκινο) και 5 (καφέ).



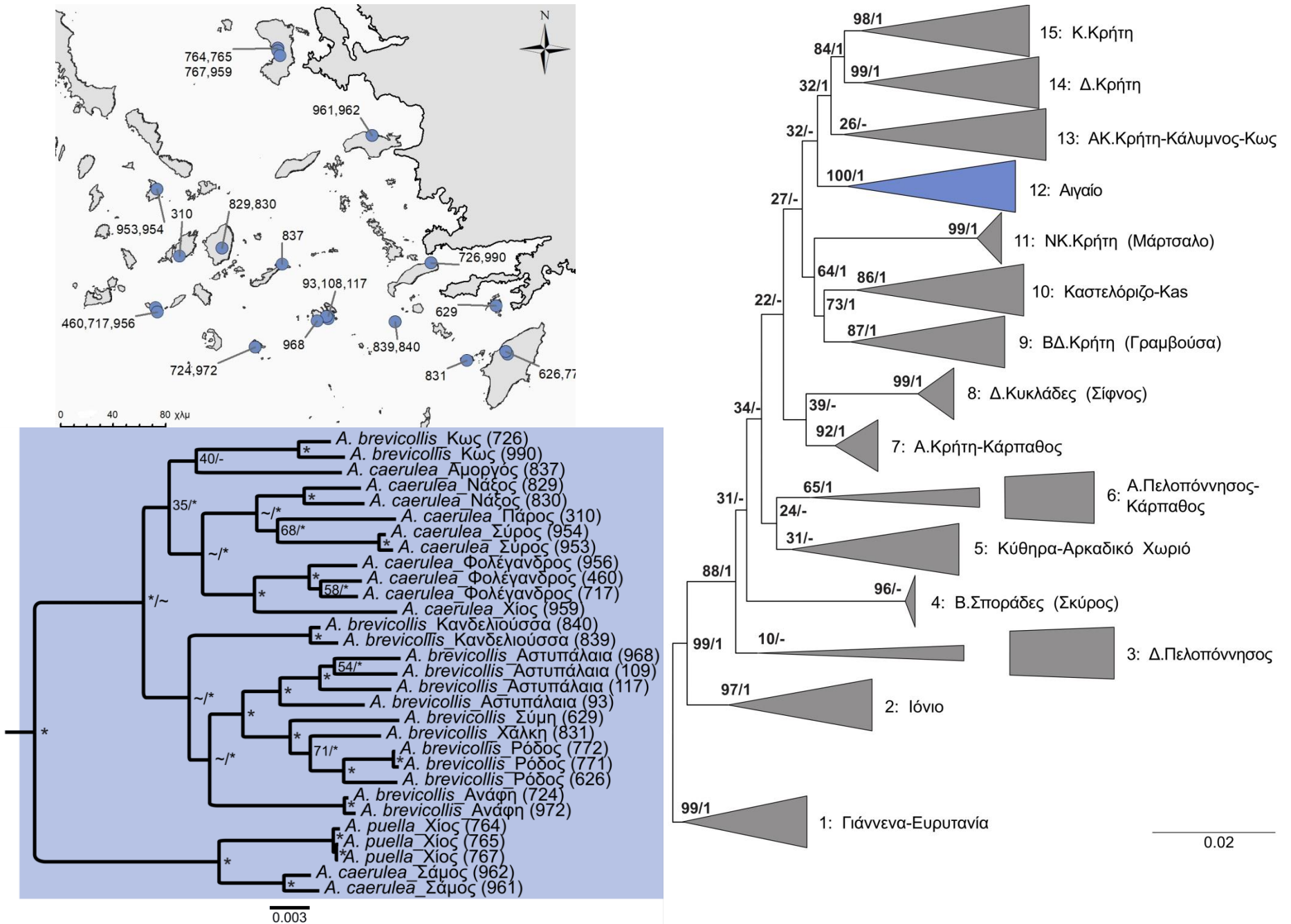
Εικόνα 11. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στον κλάδο 6 (γαλαζο-πράσινο) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στον κλάδο 6.



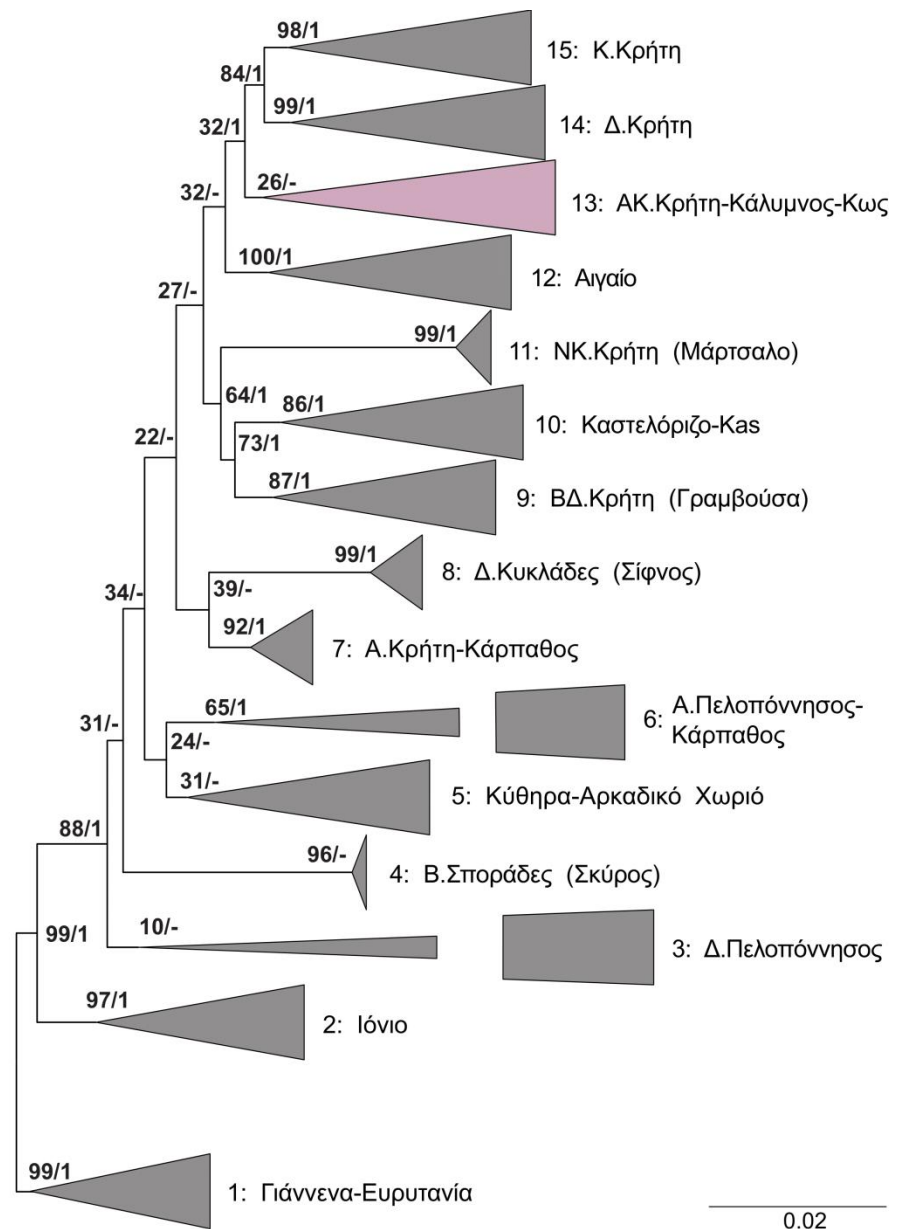
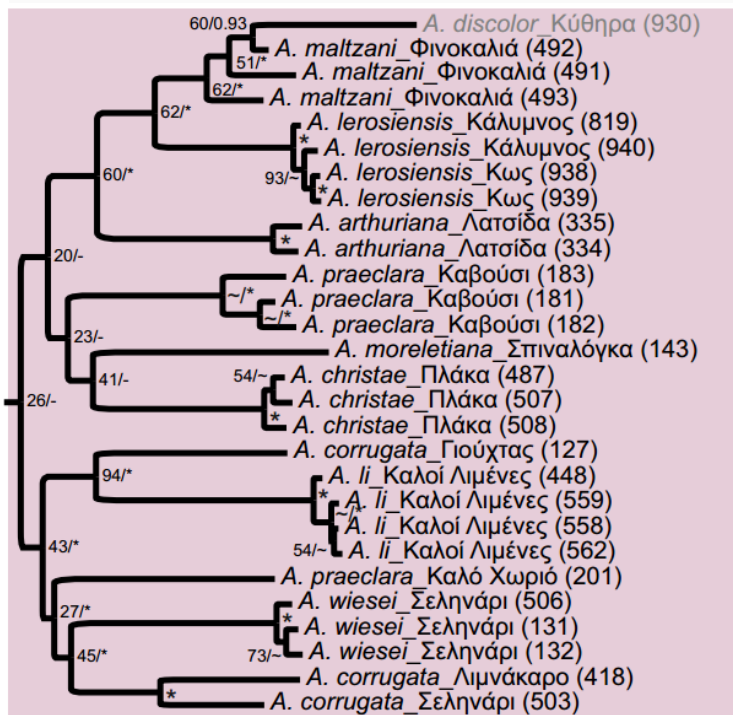
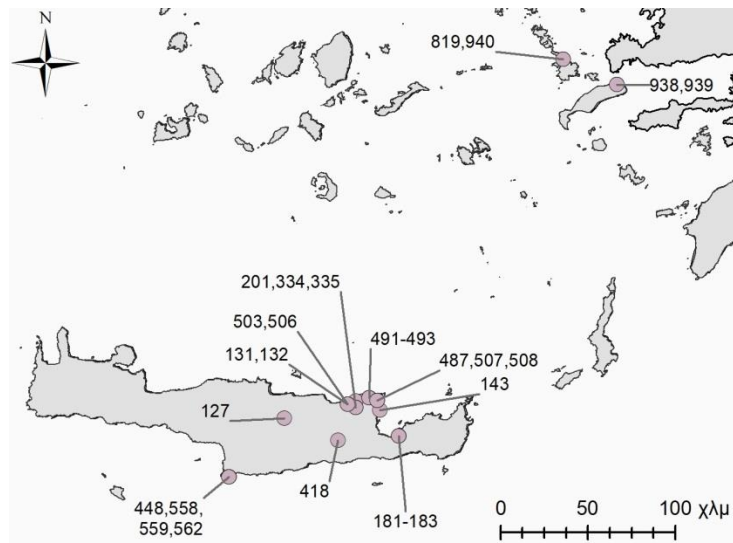
Εικόνα 12. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στους κλάδους 7 (λαχανί) και 8 (μωβ) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στους κλάδους 7 (λαχανί) και 8 (μωβ).



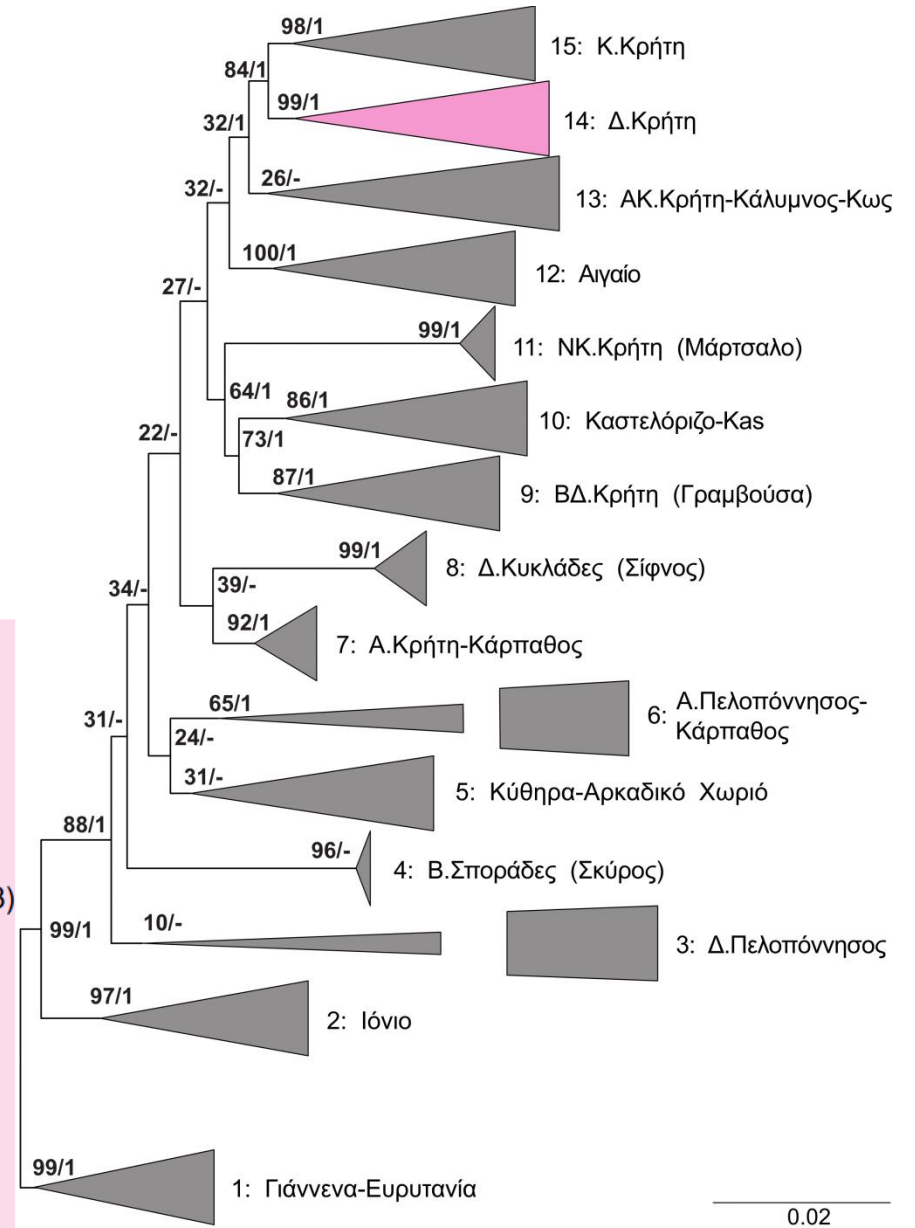
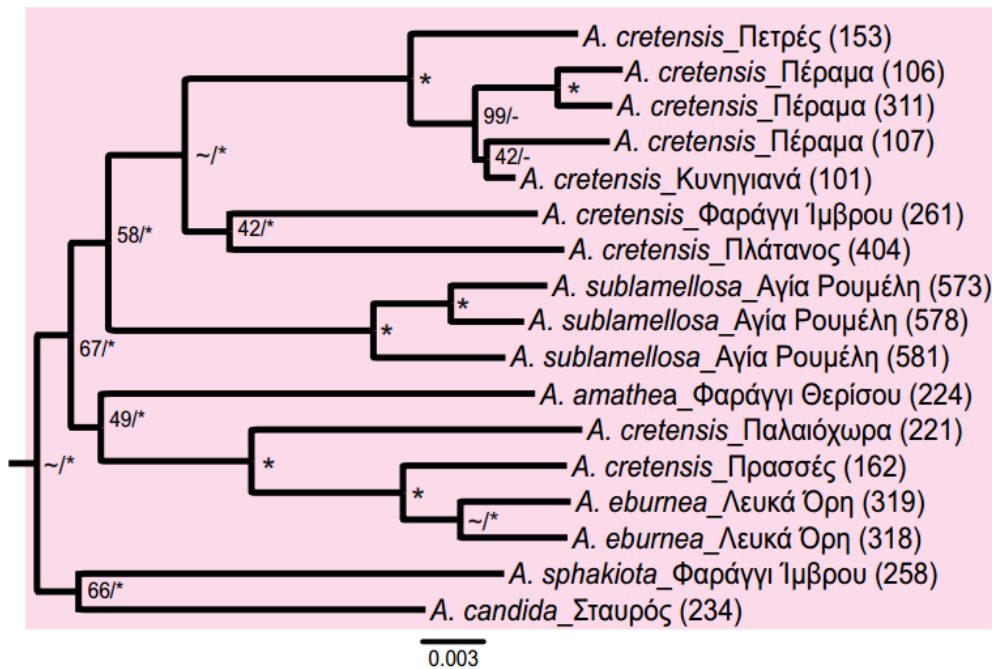
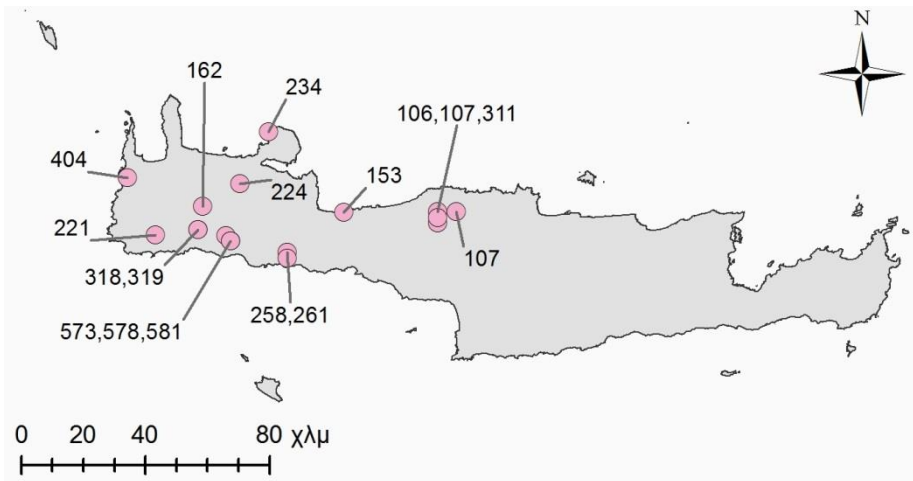
Εικόνα 13. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στους κλάδους 9 (γαλάζιο), 10 (πράσινο) και 11 (πορτοκαλί) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που εμφανίζονται στους κλάδους 9 (γαλάζιο), 10 (πράσινο) και 11 (πορτοκαλί).



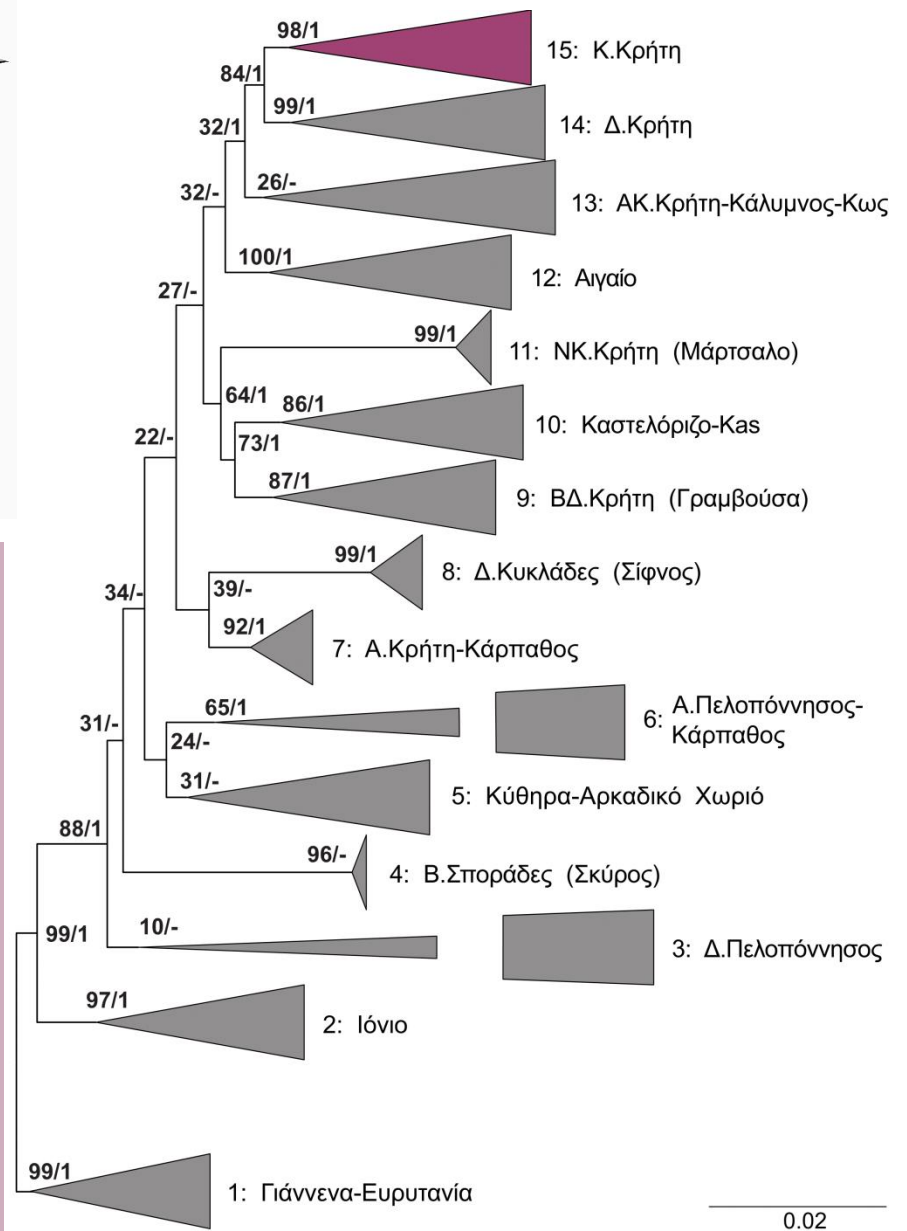
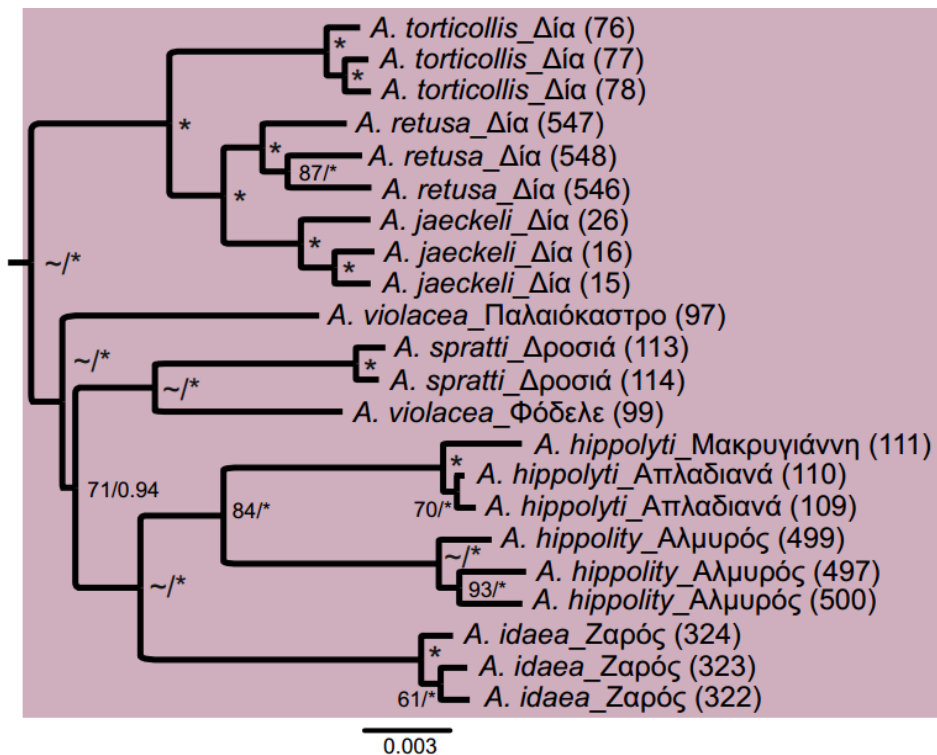
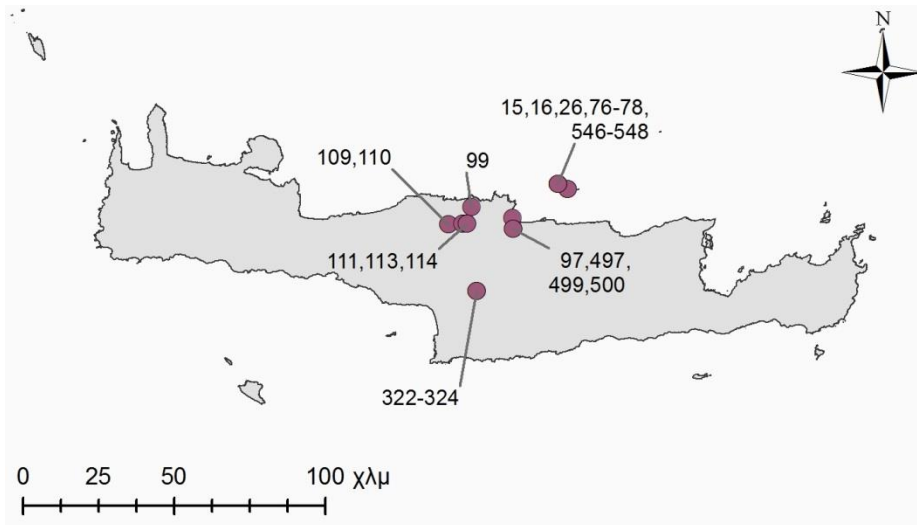
Εικόνα 14. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στον κλάδο 12 (μπλε) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στο κλάδο 12.



Εικόνα 15. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στον κλάδο 13 (ανοιχτό ροζ) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στον κλάδο 13.



Εικόνα 16. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στον κλάδο 14 (ροζ) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στον κλάδο 14.



Εικόνα 17. Δεξιά: φυλογενετικό δέντρο στο οποίο φαίνονται οι 15 κεντρικοί κλάδοι της *Albinaria* που προέκυψαν από τις αναλύσεις Maximum Likelihood και Bayesian Inference. Κάτω αριστερά: αναλυτικά οι σχέσεις των ατόμων που ανήκουν στον κλάδο 15 (σκουρό ροζ) του φυλογενετικού δέντρου. Για τις εξηγήσεις των στατιστικών υποστηρίξεων των κλάδων, βλ. λεζάντα στην εικόνα 7. Πάνω αριστερά: η κατανομή των δειγμάτων που ανήκουν στον κλάδο 15.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχει ήδη γίνει σαφές από την εισαγωγή αυτής της εργασίας πως η ταξινόμηση της *Albinaria* είναι πολύπλοκη, ο αριθμός των περιγεγραμμένων taxa είναι πολύ υψηλός, η βιβλιογραφία που υπάρχει για αυτά είναι μεγάλη και, εκτός από αντικρουόμενη, με πολλά και παραπλανητικά λάθη. Το γεγονός αυτό καθιστά την αναγνώριση των δειγμάτων ένα εξαιρετικά δύσκολο εγχείρημα. Εγώ προσωπικά δεν διαθέτω προς το παρόν τα εργαλεία και τη γνώση να το επιχειρήσω μόνη, συνεπώς έχω βασιστεί στις γνώσεις τριών καταξιωμένων ερευνητών⁶, οι οποίοι με τη χρόνια εμπειρία τους προσδιόρισαν τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις παρούσες φυλογενετικές αναλύσεις. Ο αναγνώστης προτρέπεται να είναι επιφυλακτικός και να μην θεωρεί απολύτως δεδομένα τα όσα περιγράφονται παρακάτω καθώς υπάρχει πάντα η πιθανότητα να έχει γίνει κάποιος λανθασμένος προσδιορισμός, ιδιαίτερα σε πολύ δύσκολες περιπτώσεις διάκρισης ειδών όπως πχ αυτές του συμπλέγματος *cretensis*.

Καθώς το δέντρο είναι άρριζο και καθώς οι υποστηρίξεις των κεντρικών κλάδων είναι πολύ χαμηλές ή συγκρουόμενες μεταξύ των δύο μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως λόγω των «προβληματικών» αλληλουχιών, θα ήταν άστοχο να συζητηθούν οι σχέσεις μεταξύ των κλάδων και των περιοχών που αντιπροσωπεύουν, κάνοντας δυστυχώς αδύνατη κάθε προσπάθεια βιογεωγραφικής ανάλυσης.

Όλοι οι κόμβοι στο δέντρο που προέκυψε από τη μέθοδο BI, πλην ελάχιστων εξαιρέσεων, έχουν υποστήριξη 1, γεγονός που παρατηρείται στη διεθνή βιβλιογραφία και σε άλλες περιπτώσεις (Griffin, Robin, *et al.*, 2011; Botero-Castro, Tilak, *et al.*, 2013; Fernandez, Hormiga, *et al.*, 2014; Prum, Berv, *et al.*, 2015) και δημιουργεί προβληματισμό. Είναι πιθανό να συμβαίνει επειδή ο όγκος των δεδομένων είναι πολύ μεγάλος και ίσως είναι ένδειξη ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι αρκετά αξιόπιστη για την ανάλυση τέτοιου τύπου δεδομένων.

4.1 ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΩΝ TAXA ΤΗΣ *ALBINARIA*

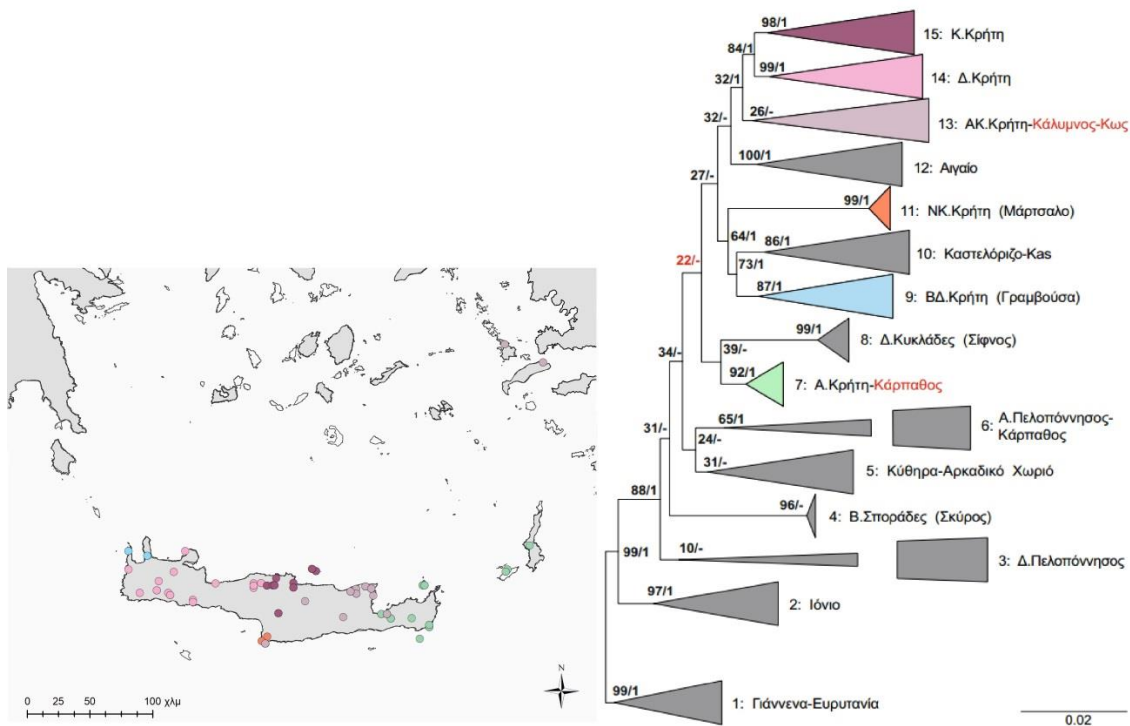
Παρακάτω θα συζητηθούν οι σχέσεις εντός των κλάδων ανάλογα με την ευρύτερη περιοχή στην οποία αυτοί ανήκουν.

Κρήτη

Η πιο πρόσφατη ταξινομική αναθεώρηση υποστηρίζει την ύπαρξη 31 ειδών στην Κρήτη και τις περιφερειακές της νησίδες (Welter-Schultes, 2010). Αυτό την καθιστά την περιοχή με το υψηλότερο ποσοστό (30%) ειδών της *Albinaria*. Είναι όλα ενδημικά της Κρήτης (Douris, Cameron, *et al.*, 1998) και είναι τα μόνα σαλιγκάρια της οικογένειας Clausiliidae που υπάρχουν στο νησί (Welter-Schultes 1998). Στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνονται 29 από τα 31 είδη (λείπουν η *A. pondika* Welter-Schultes, 2010 και η *A. ariadne* Schilthuizen & Gittenberger, 1991). Η μονοφυλετικότητα των κρητικών taxa είναι αμφιλεγόμενη. Είτε αμφισβητείται (Ayoutanti *et al.*, 1987; Douris, Cameron, *et al.*, 1998) είτε υποστηρίζεται (Schilthuizen and Gittenberger, 1996). Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ενισχύουν

⁶ Δρ Βιολόγος, Έφορος Ασπονδύλων εκτός Αρθροπόδων **Κ. Βαρδινογιάννη**, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Πάτρας **Σ. Γκιώκας**, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης **Μ. Μυλωνάς**.

την πρώτη περίπτωση. Από το φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει, είναι φανερό ότι τα taxa της Κρήτης δεν αποτελούν μία μονοφυλετική ομάδα (Εικόνα 18). Εμφανίζεται σε 6 από τους 15 κεντρικούς κλάδους (7,9,11,13,14,15), ομαδοποιημένους (χωρίς καλή στατιστική υποστήριξη) με τους κλάδους 8, 10 και 12 οι οποίοι περιλαμβάνουν taxa με κατανομή στη Σίφνο, το Καστελόριζο και την Τουρκία, και το Αιγαίο αντίστοιχα. Επίσης εντός του κλάδου 7, ο οποίος περιλαμβάνει είδη της Κρήτης, περιλαμβάνεται και η *A. olivieri* (Roth, 1839) ενδημική της Κάσου και Καρπάθου ενώ αντίστοιχα, εντός του κλάδου 13 περιλαμβάνεται η *A. lerosiensis* (Pfeiffer, 1841) ενδημική νησιών του ανατολικού Αιγαίου και των γειτονικών ακτών της Μ. Ασίας.



Εικόνα 18. Στην εικόνα φαίνονται οι κλάδοι που περιλαμβάνουν taxa της Κρήτης, αριστερά στο χάρτη και δεξιά στο φυλογενετικό δέντρο (υπάρχει αντιστοιχία χρωμάτων των κλάδων μεταξύ δέντρου και χάρτη). Με κόκκινο έχουν τονιστεί οι περιοχές που δείχνουν τη μη μονοφυλετικότητα των taxa της Κρήτης.

Κλάδος 15 – Κεντρική Κρήτη

Τα έξι από τα επτά μορφολογικά είδη που περιλαμβάνονται στον κλάδο αυτό είναι μονοφυλετικά. Εξάιρεση αποτελεί η *A. violacea* Schilthuizen & Gittenberger, 1990. Οι Schilthuizen και Gittenberger (1990), όταν πρωτοπεριέγραψαν την *A. violacea*, είχαν περιγράψει και άλλο ένα είδος, την *A. ulrikae*. Στην ταξινόμηση που χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία, δεν αναγνωρίζεται η ύπαρξη των δύο αυτών συγγενικών ειδών και η *A. ulrikae* θεωρείται κατά τον Welter-Schultes (2010) συνώνυμη της *A. violacea*. Σύμφωνα με τον Μυλωνά ο οποίος προσδιόρισε το κέλυφος με κωδικό 97, αυτό ανήκει σε αυτό που είχε αρχικά περιγραφεί ως *A. ulrikae*. Συνεπώς η παρούσα ανάλυση συμφωνεί με το διαχωρισμό της *A. ulrikae* από την *A. violacea*, επιβεβαιώνοντας αυτούς που τις περιέγραψαν καθώς και τον Nord sieck που στην αναθεώρησή του το 1999, θεώρησε τις δύο αυτές μορφές ξεχωριστές.

Τα τρία ενδημικά είδη της Δίας αποτελούν μια μονοφυλετική ομάδα. Η *A. teres* (Olivier, 1801), που είναι το τέταρτο είδος *Albinaria* που εμφανίζεται στη Δία, αν και δεν υπάρχει δείγμα συλλεγμένο από τη Δία, εμφανίζεται πολύ απομακρυσμένο, στον κλάδο 7. Συνεπώς τα είδη της Δίας δεν αποτελούν μια μονοφυλετική ομάδα και το νησί εποίκιστηκε από την *Albinaria* σε δύο ξεχωριστά γεγονότα.

Η *A. hippolyti* (Boettger, 1878), είναι μία από τις λίγες περιπτώσεις στην *Albinaria* που εμφανίζει συμπατρία με άλλα είδη στην περιφέρεια της κατανομής της. Έτσι, εμφανίζεται συμπατρία σε μια περιοχή κοντά στο Παλαιόκαστρο Ηρακλείου με την *A. ulrikae* ενώ σε μια λίγο νοτιοανατολικότερη περιοχή, εμφανίζεται συμπατρία με την *A. spratti* (Pfeiffer, 1846). Ο Schilthuizen (1994), σε μια εργασία του που μελετάει τα 3 αυτά taxa αναφέρει: *η κλασική ταξινομική θα θεωρούσε τις τρεις αυτές μορφές ως διακριτά είδη με βάση τις μορφολογικές τους διαφορές. Ωστόσο, με βάση τις κατανομές τους, που είναι κυρίως παραπάτριες με μικρές περιοχές επικάλυψης, και των αλλοενζυμικών τους διαφορών που είναι πολύ μικρές (προσωπικά δεδομένα), κάποιος θα μπορούσε να τα θεωρήσει ως γεωγραφικές ποικιλίες ενός είδους.* Για να λύσει αυτό το ζήτημα, ο ερευνητής μελέτησε με τη χρήση αλλοενζύμων, την αναπαραγωγική τους απομόνωση και κατέληξε ότι και στις δύο περιπτώσεις συμπατρίας, υπάρχει πλήρης αναπαραγωγική απομόνωση και άρα, σύμφωνα με τον βιολογικό ορισμό του είδους, οι τρεις αυτές μορφές αποτελούν ξεχωριστά είδη. Στο δέντρο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 17, φαίνεται η πολύ κοντινή συγγένεια των τριών αυτών μορφών. Δεν είναι σκοπός αυτής της εργασίας να πάρει θέση για το τι είναι είδος και τι όχι στην *Albinaria*. Το παράδειγμα αυτό, όπως και άλλα που αναφέρονται στο κείμενο, παρατίθενται για να έχει ο μη εξοικειωμένος αναγνώστης μια εικόνα για τις διάφορες προσεγγίσεις που έχουν γίνει και τις διαφορετικές τάσεις των ερευνητών για το ζήτημα αυτό.

Κλάδος 14 – Δυτική Κρήτη

Τα είδη που περιλαμβάνονται σε αυτόν τον κλάδο, έχουν συσχετιστεί μεταξύ τους στις διάφορες (ασαφείς θα τολμήσω να πω) αναθεωρήσεις που έχουν μέχρι στιγμής γίνει στην ταξινόμηση της *Albinaria*. Αρχικά, τέσσερα από αυτά τα είδη [εξαιρώντας την *A. candida* (Pfeiffer, 1850) και την *A. amalthea* (Westerlund, 1878)] συμπεριλαμβάνονταν σε μια ομάδα ειδών *-byzantina* group-προσδιορισμένη από τον Boettger το 1878, ενώ μετέπειτα ο Nordsieck (1977), προσδιόρισε μια παραπλήσια ομάδα με όνομα: *cretensis* group. Το σύμπλεγμα αυτό έχει χαρακτηριστεί από τον ίδιο ως η πιο «δύσκολη» ομάδα ειδών στην *Albinaria* κυρίως λόγω των μορφολογικών ομοιοτήτων των ειδών που την απαρτίζουν γεγονός που τον οδήγησε το 2004 να δημοσιεύσει ένα άρθρο αποκλειστικά για την ταξινομική αυτού του συμπλέγματος ειδών. Η πιο πρόσφατη ταξινόμηση, αυτή που ακολουθεί η παρούσα εργασία, του Welter-Scultes (2012) αντικατοπτρίζει αυτή τη δυσκολία στην ταξινόμηση των ειδών της δυτικής Κρήτης καθώς χρειάζονται διαφορετικοί μορφολογικοί χαρακτήρες για τη διάκριση των ειδών σε διαφορετικές περιοχές της κατανομής τους. Από την παρούσα εργασία, προκύπτει ότι η *A. cretensis* (Rossmässler, 1836) δεν αποτελεί μονοφυλετικό taxon. Θα μπορούσε ωστόσο να έχει γίνει λάθος προσδιορισμός του κελυφών με κωδικούς 162 και 221. Θα πρέπει για να ξεκαθαρίσουν αυτές οι σχέσεις να γίνει μια πιο εκτενής μελέτη, μορφολογική και μοριακή, με αντιπροσωπευτικά είδη περισσότερων πληθυσμών. Κάτι ακόμα που προκύπτει είναι η μακρινή εξελικτική σχέση των taxa του κλάδου αυτού με την *A. tenuicostata* (Pfeiffer, 1864) που εμφανίζεται στον κλάδο 9, η οποία μέχρι

πρότινος θεωρούνταν μέλος του συμπλέγματος *cretensis*, επιβεβαιώνοντας τον Welter-Scultes που το είχε προτείνει το 2010.

Ο Nordsieck (2004), τοποθέτησε την *A. candida*, την *A. amalthea* και την *A. xanthostoma* (Böttger, 1883), σε μια ομάδα ειδών με όνομα *candida* group. Αργότερα, ο Welter-Schultes (2010), προσέθεσε στην ομάδα αυτήν άλλο ένα καινούριο είδος την *A. pondika*, η οποία δεν υπάρχει στο παρόν σύνολο δεδομένων ενώ την *A. xanthostoma*, δεν την αναγνώρισε ως διακριτό είδος και τη θεώρησε συνώνυμη της *A. amalthea*. Η *A. candida* καθώς και ένα άτομο *A. amalthea* (224) από το φαράγγι Θερίσσου των Χανίων, εμφανίζονται σε αυτόν τον κλάδο όμως όχι ως πάρα πολύ συγγενικά. Άτομα ωστόσο της *A. amalthea* με κωδικούς 332 και 333 από τη Ροδωπού Χανίων, εμφανίζονται ξανά, αρκετά πιο απομακρυσμένα εξελικτικά, στον κλάδο 9. Τα συγκεκριμένα ωστόσο άτομα, έχουν προσδιοριστεί από τον Μυλωνά ως *A. xanthostoma*. Εάν θεωρήσουμε ότι έχει γίνει σωστός μορφολογικός προσδιορισμός, τότε αυτό που αναφέρει ο Welter-Schultes ως *A. amalthea*, είναι ένα πολυφυλετικό taxon. Εάν ακολουθήσουμε την ταξινόμηση του Nordsieck, τότε αίρεται η πολυφυλία αυτή, όμως τα τρία αυτά taxa δεν έχουν άμεση εξελικτική σχέση μεταξύ τους και μπλέκονται με το σύμπλεγμα ειδών *cretensis*.

Κλάδος 13

Ο κλάδος αυτός περιέχει επτά μορφολογικά είδη από την ανατολική Κρήτη εκ των οποίων δύο, η *A. praeclara* (Pfeiffer, 1853) και *A. corrugata* (Bruguière, 1792) δεν είναι μονοφυλετικά. Το ενδιαφέρον, αν και όχι καινούριο, στοιχείο που παρουσιάζει είναι η ύπαρξη ενός είδους, της *A. lerosiensis*, η οποία κατανέμεται εκτός Κρήτης, στα νησιά του ανατολικού Αιγαίου Κω, Κάλυμνο και Λέρο και τις γειτονικές τους ακτές στη Μικρά Ασία. Η ομοιότητα του είδους αυτού με είδη της Κρήτης ώθησε τον Nordsieck το 1977 να το τοποθετήσει στο κρητικό σύμπλεγμα ειδών *teres*. Ο Δουρής και οι συνεργάτες/τριες του (1998) όπως και ο Orstan (2001), υποστήριξαν ότι η απομακρυσμένη αυτή κατανομή μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανθρώπινης μεταφοράς από την Κρήτη σε κάποια από αυτές τις περιοχές και κατόπιν ο πληθυσμός εξελίχθηκε και εξαπλώθηκε στη σημερινή περιοχή κατανομής του. Ο Welter-Schultes (1998) είχε προτείνει ότι στην Κρήτη, κάποια είδη που διαθερίζουν σε βράχια έχουν παθητικά μεταφερθεί σε περιοχές όπου προηγουμένως δεν υπήρχαν, όταν οι άνθρωποι μετέφεραν πέτρες κυρίως για οικοδομικούς σκοπούς ενώ υπάρχει και μια διαφορετική υπόθεση πως η *A. lerosiensis* μεταφέρθηκε παθητικά πριν από δύο εκατομμύρια χρόνια όταν ακόμα η Κως, η Λέρος και η Κάλυμνος ήταν ενωμένες με τη Μ. Ασία (Douris et al., 1998).

Η υποστήριξη του κλάδου αυτού εμφανίζεται πολύ χαμηλή από τα bootstrap της ML. Υπάρχουν δύο μη αντιπαραθετικές εξηγήσεις για αυτό. Πρώτον στον κλάδο υπάρχει ένα άτομο *A. discolor* από τα Κύθηρα (930), το οποίο είναι ένα από τα δώδεκα «προβληματικά» άτομα που αναφέρονται παραπάνω. Δεύτερον, εμφανίζεται στον κλάδο αυτό η *A. moreletiana* (143), κάτι το οποίο δεν υποστηρίζεται από τη μέθοδο της BI, στην οποία το συγκεκριμένο άτομο εμφανίζεται στον κλάδο 7. Θεωρώ πως η απομάκρυνση της *A. discolor* (930) από το σύνολο των δεδομένων, θα διαλευκάνει την τοπολογία του δέντρου και την «πραγματική» θέση της *A. moreletiana* και θα αυξήσει την υποστήριξη του κλάδου.

Στον αντίστοιχο κλάδο που προέκυψε από τη μέθοδο της BI όπου λείπει η *A. moreletiana*, η υποστήριξη (εκ των υστέρων πιθανότητα) είναι 1. Αυτό βέβαια ίσως να μην είναι αντιπροσωπευτικό

αφού όπως συζητείται παραπάνω, σχεδόν όλες οι υποστηρίξεις πάνω στο δέντρο είναι ίσες με τη μονάδα.

Κλάδος 11

Η *A. terebra* (Pfeiffer, 1853), είναι ένα από τα λίγα μορφολογικά είδη στην Κρήτη με σχετικά ευρεία εξάπλωση. Καταλαμβάνει μια περιοχή στη νότια κεντρική Κρήτη γύρω από την πεδιάδα της Μεσσαράς. Στη συγκεκριμένη ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα από τρεις κοντινούς πληθυσμούς στο πιο νότιο άκρο της κατανομής της. Φαίνεται ότι οι πληθυσμοί αυτοί είναι αρκετά διαφοροποιημένοι και αποτελούν μια απομονωμένη εξελικτική γραμμή σε σχέση με τα υπόλοιπα taxa της Κρήτης που υπάρχουν στο δέντρο.

Κλάδος 9

Το ίδιο συμβαίνει και με τα δύο είδη του κλάδου 9. Η περίπτωση των *A. tenuicostata* και *A. amalthea* που κατά πάσα πιθανότητα είναι αυτή που περιέγραψε ο Böttger το 1883 ως *A. xanthostoma* περιγράφηκαν στον κλάδο 14.

Κλάδος 7

Τα τέσσερα από τα επτά είδη που εμφανίζονται σε αυτόν τον κλάδο, ανήκουν σύμφωνα με τον Nordsieck (1999) σε μια ομαδοποίηση ειδών με το όνομα *teres*. Τα υπόλοιπα είδη αυτής της ομαδοποίησης εμφανίζονται εδώ στους κλάδους 13 (5 είδη) και 15 (3 είδη). Η *A. teres* (Olivier, 1801) είναι η *Albinaria* με την πιο ευρεία εξάπλωση στην Κρήτη και διαθέτει υψηλή μορφολογική διαφοροποίηση χωρίς όμως, σύμφωνα με τον Welter-Schultes (2010), σαφείς εκφράσεις χαρακτήρων σε κάθε περιοχή κάτι που τον οδήγησε στο να μην αποδεχτεί το διαχωρισμό του είδους σε πολλά υποείδη που είχε προτείνει ο Nordsieck (1977) και ο Zilch (1977). Ωστόσο όπως φαίνεται από το δέντρο στην Εικόνα 12, η *A. teres*, δεν εμφανίζεται ως μια μονοφυλετική ομάδα. Για την *A. manselli* (Boettger, 1883) υπήρχε διαφωνία για το αν θεωρείται υποείδος της *A. teres* (Nordsieck 1977, 1999) ή ανεξάρτητο είδος (Wiese, 1990). Μορφολογικά, δεν μπορεί να διακριθεί από κάποιους απομακρυσμένους πληθυσμούς της *A. teres*, αλλά τοπικά φαίνεται να είναι αναπαραγωγικά απομονωμένες (Welter-Schultes, 2010). Η *A. sturanyi* Wagner, 1924 η οποία καταλαμβάνει μια μικρή περιοχή στο όρος Θρυπητή της ανατολικής Κρήτης, έχει παραπάτρια κατανομή με την *A. teres*, με την οποία διασταυρώνεται στη φύση δημιουργώντας μια ζώνη υβριδισμού (Welter-Schultes, 2010). Επομένως, σύμφωνα με έναν αυστηρό βιολογικό ορισμό του είδους, η *A. sturanyi* θα μπορούσε να θεωρηθεί υποείδος της *A. teres* (Nordsieck, 1999; Welter-Schultes, 2010). Για να λυθεί η πολυφυλία της *A. teres*, θα πρέπει λοιπόν είτε οι διαφορετικές εξελικτικές γραμμές της, να ονομαστούν διαφορετικά είτε η *A. manselli* και η *A. sturanyi* να θεωρηθούν *A. teres*.

Άλλο ένα σημαντικό στοιχείο αυτού του κλάδου, είναι η στενή συγγενική σχέση των ειδών της Κρήτης με την *A. olivieri* (Roth, 1839) του συγκροτήματος Κάσου-Καρπάθου. Υπάρχει κι άλλο παράδειγμα χερσαίου σαλιγκαριού που υποστηρίζει αυτή τη σχέση, του *Deroceras lasithionense* Wiktor, Vardinoyannis & Mylonas, 1994 (Wiktor *et al.*, 1994).

Αιγαίο

Στα taxa του Αιγαίου συμπεριλαμβάνονται η *A. turrita* (Pfeiffer, 1850) της Σίφνου, η *A. cristatella* (Küster, 1861) της Σκύρου η *A. brevicollis* (Pfeiffer, 1850), η *A. caerulea* (Deshayes, 1835) και η *A. puella* (Pfeiffer, 1850). Οι τρεις τελευταίες αποτελούν μια μονοφυλετική ομάδα (κλάδος 12) συγγενική με τα Κρητικά taxa.

Κλάδος 12

Τα τρία αυτά taxa, είναι τα μοναδικά που εντοπίζονται στις Κυκλάδες και στα περισσότερα Δωδεκάνησα. Ήδη από το 1988 όταν ξεκινούσαν οι μοριακές αναλύσεις στην *Albinaria*, είχε υποστηριχτεί ότι τα τρία αυτά taxa θα μπορούσαν να αποτελούν ένα βιολογικό είδος και είχε αμφισβητηθεί η ταξινομική τους θέση (Agoutanti et al. 1987; 1993). Ο Δουρής και οι συνεργάτες του (2007), υποστήριξαν πως ούτε η *A. brevicollis* ούτε η *A. caerulea* αποτελούν μονοφυλετικά taxa κάτι που έχουν υποστηρίξει και άλλες εργασίες (Γκιώκας, 1996; Van Moorsel, 2001). Το ίδιο υποστηρίζει και το παρόν φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 14).

Κλάδος 10

Ο κλάδος αυτός αποτελείται από δύο Τούρκικα taxa και φαίνεται να είναι συγγενικός με δύο κλάδους της Κρήτης (Εικόνα 13). Η τοπολογία αυτή ωστόσο ενδέχεται να αλλάξει, όταν αφαιρεθούν από το σύνολο των δεδομένων τα 12 «προβληματικά» άτομα και συνεπώς δε συζητείται εδώ.

Κλάδος 8

Η *A. turrita*, εμφανίζεται τοπολογικά σε διαφορετικό σημείο στα δύο φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν. Με την ML μέθοδο (Εικόνα 12), εμφανίζεται συγγενική με τα taxa του κλάδου 7 (Κρήτη-Κάρπαθος), με χαμηλή στατιστική υποστήριξη. Με τη BI μέθοδο, εμφανίζεται μέσα στον κλάδο 5 συγγενική με τα taxa του συγκροτήματος Κύθηρα – Αντικύθηρα – Πορί (το δέντρο δεν απεικονίζεται στην εργασία).

Κλάδος 5

Η *A. cerigottana* (Boettger, 1894) είναι το πιο κοινό σαλιγκάρι στο νησί των Αντικυθέρων και εντοπίζεται σε μια ποικιλία ενδιαιτημάτων. Είναι το μόνο πρόσφατο taxon στα Αντικύθηρα που έχει πιο συγγενικές σχέσεις με τα Κύθηρα από ότι με την Κρήτη (Nordsieck 1977; σε Gittenberger & Goodfriend 1993). Στο παρόν δέντρο (Εικόνα 10) εμφανίζεται παραφυλετική ως προς την *A. grayana* (Pfeiffer, 1846). Αποτελούν μαζί μια μονοφυλετική ομάδα η οποία σύμφωνα με τη μέθοδο της ML, είναι συγγενική με την *A. discolor* (Pfeiffer, 1846) από το Αρκαδικό Χωριό της Πελοποννήσου. Αυτή η

συγγένεια βέβαια έχει πολύ χαμηλή στατιστική υποστήριξη. Με τη μέθοδο της BI, «μπαίνει» μέσα στον κλάδο και η *A. turrita* της Σίφνου (το δέντρο δεν απεικονίζεται στην εργασία).

Κλάδος 4

Η *A. cristatella* φαίνεται να αποτελεί μια ανεξάρτητη εξελικτική γραμμή εντός του γένους *Albinaria*.

Πελοπόννησος - Ιόνιο

Η Πελοπόννησος είναι επίσης μια περιοχή με υψηλή διαφοροποίηση της *Albinaria*. Εικοσιεννέα από τα 101 μορφολογικά είδη της εξαπλώνονται σε αυτή την περιοχή. Αρκετά βέβαια από αυτά τα είδη δεν είναι ενδημικά της Πελοποννήσου αλλά εξαπλώνονται και σε Εύβοια, Αττική, Κύθηρα, Ιόνιο και Ν. Αλβανία. Οκτώ από τα 29 αυτά είδη, δεν συμπεριλαμβάνονται στο παρόν σύνολο δεδομένων. Η πλειοψηφία των ειδών που περιλαμβάνονται, χωρίζονται στους κλάδους 6 και 3 αντιπροσωπεύοντας την Ανατολική και τη Δυτική Πελοπόννησο αντίστοιχα.

Κλάδος 6

Από τα οκτώ taxa της Πελοποννήσου, τα επτά έχουν πολύ εντοπισμένη κατανομή ενώ η *A. grisea* (Deshayes, 1835) έχει ευρεία εξάπλωση σχεδόν σε όλη την Πελοπόννησο. Ο Welter-Schultes (2012), ανέφερε την ύπαρξη μιας πολυτυπικής και τοπικά πολυποίκιλης ομάδας που την παρομοιάζει με το σύμπλεγμα ειδών *cretensis*. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι *A. grisea*, *A. butoti* (Nordsieck, 1984), *A. campylauchen* (Boettger, 1883) και *A. confusa* (Boettger, 1878)⁷. Από το δέντρο (Εικόνα 11) φαίνεται πως η *A. grisea* δεν είναι ένα μονοφυλετικό taxon. Αξίζει επίσης να ειπωθεί πως η *A. edmundi* (Gittenberger, 1987), ανήκε μέχρι το 1998 στο γένος *Isabellaria*.

Είμαι επιφυλακτική σε σχέση με τη συγγένεια των Πελοποννησιακών taxa με την *A. proteus* (Boettger, 1889) από την Κάρπαθο και τη Σαρία που φαίνεται στο δέντρο, καθώς η ύπαρξη των «προβληματικών» ατόμων *A. freytagi* (Boettger, 1889) στον κλάδο, μπορεί να καθιστά τη συγγένεια αυτή, μη πραγματική.

Κλάδος 3

Ο Nordsieck (1984), ταξινόμησε την *A. ithomensis* ως διακριτό είδος συγγενικό της *A. scorulosa* (Charpentier, 1852). Η *A. scorulosa*, σύμφωνα με τον Welter-Schultes (2012), δεν εξαπλώνεται στην Πελοπόννησο, ωστόσο στην εργασία των Schilthuizen και Gittenberger (1996) αναφέρεται στη Στεμνίτσα της Αρκαδίας η *A. scorulosa macrodera*, αναγνωρισμένη από τον Gittenberger το 1990. Στην περιοχή εξαπλώνεται το υποείδος *A. hians macrodera*, συνεπώς τα άτομα με κωδικό 888 και 890 θα μπόρσε να είναι *A. hians* και όχι *A. scorulosa*. Κάποιοι ερευνητές (Hausdorf 1987) θεωρούν ότι υπάρχει μια διαβάθμιση μεταξύ *A. scorulosa* και *A. hians*, και θεωρούνται ως ένα είδος (*A. scorulosa*).

⁷ Τα δύο τελευταία δεν συμπεριλαμβάνονται στο παρόν σύνολο δεδομένων.

Όποια από τις δύο και να είναι η περίπτωση, προκύπτει ένα ταξινομικό και φυλογενετικό χάος καθώς και τα δύο αυτά taxa, εμφανίζονται ξανά στον κλάδο 1.

Τα taxa *A. voithii* (Rossmässler, 1836), *A. menelaus* (Martens, 1873) και *A. gerolimena* Nordsieck, 1974 αποτελούσαν ένα taxon (*A. voithii*), ωστόσο στην αναθεώρηση του 1999 ο Nordsieck τα διέκρινε σε τρία διαφορετικά. Τα τρία αυτά taxa, είναι τα μόνα σαλιγκάρια σε ολόκληρο το γένος της *Albinaria* με δεξιόστροφη περιέλιξη κελύφους. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έρχονται σε διαφωνία με τα αποτελέσματα των Kornilios et al. (2015) τα οποία υποστηρίζουν ότι η αναστροφή της περιέλιξης στην *Albinaria* εμφανίστηκε σε περισσότερα του ενός εξελικτικά γεγονότα. Η μονοφυλετικότητα των τριών αυτών taxa στο παρόν δέντρο (Εικόνα 9) υποδεικνύει πως η δεξιόστροφη περιέλιξη εμφανίστηκε μία φορά στην *Albinaria*.

Είναι ενδιαφέρον να ειπωθεί πως η *A. krueperi* (Pfeiffer, 1866) έχει βρεθεί να δημιουργεί ζώνη υβριδισμού με την *A. grisea* (Neubert, 1998), η οποία στο παρόν φυλογενετικό δέντρο εμφανίζεται, απομονωμένη εξελικτικά, στον κλάδο 6.

Κλάδος 2

Από τα τέσσερα μορφολογικά είδη που εμφανίζονται στον κλάδο, τα δύο είναι ενδημικά της Κεφαλονιάς (*A. jonica* (Pfeiffer, 1866) και *A. adrianae* Gittenberger, 1979) ενώ τα υπόλοιπα δύο εξαπλώνονται και στις απέναντι ακτές της ηπειρωτικής Ελλάδας. Η *A. senilis* φαίνεται από το δέντρο (Εικόνα 8) ότι αποτελεί ένα παραφυλετικό taxon σε σχέση με την ενδημική της Κεφαλονιάς *A. jonica* (Pfeiffer, 1866).

Γιάννενα - Ευρυτανία

Κλάδος 1

Η *A. scorulosa* και *A. hians*, θεωρούνταν όπως ειπώθηκε παραπάνω ως ένα είδος (*A. scorulosa*). Διακρίθηκε σαν ξεχωριστό είδος το 1999 στην αναθεώρηση του Nordsieck καθώς υπέθεσε ότι τα δύο taxa ζουν συμπάτρια στην Κλεισούρα της Αιτωλοακαρνανίας. Όπως συζητήθηκε και παραπάνω, η ταξινόμηση των δύο αυτών ειδών, είναι προβληματική και χρειάζεται μια πιο λεπτομερή μελέτη των ποικίλων πληθυσμών που και τα δύο taxa περιλαμβάνουν.

4.2 ΓΕΝΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Ένα πολύ ενδιαφέρον στατιστικό στοιχείο που προκύπτει από τα αποτελέσματα είναι το ποσοστό των μορφολογικών ειδών που δεν είναι μονοφυλετικά, το οποίο ξεπερνάει το 24% (Παράρτημα II). Αυτός ο αριθμός αυξάνεται, αν λάβουμε υπόψη πως στις περισσότερες περιπτώσεις όπου το είδος αντιπροσωπεύεται από 2 μόνο άτομα (που αποτελεί την πλειοψηφία των περιπτώσεων), αυτά τα δύο άτομα είναι πολύ πιθανό ότι έχουν συλλεχθεί από τον ίδιο πληθυσμό και συνεπώς είναι προφανές ότι θα είναι πολύ συγγενικά. Για να έχουμε την πραγματική εικόνα, θα πρέπει να γίνει δειγματοληψία που να αντιπροσωπεύει μεγαλύτερο αριθμό πληθυσμών, ειδικά των ειδών εκείνων που είναι πολυτυπικά ή/και έχουν ευρεία εξάπλωση με υψηλό βαθμό μορφολογικής διαφοροποίησης.

Όπως και να `χει, το ποσοστό αυτό παραμένει αρκετά υψηλό και αντιστοιχεί στο 13% όλων των ειδών της *Albinaria* [έτσι όπως περιγράφονται με βάση τον Welter-Schultes (2012)] και είναι απόδειξη πως δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ της μορφολογικής και μοριακής προσέγγισης.

Για να ολοκληρωθεί η ανάλυση των μοριακών δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, θα πρέπει αρχικά να αφαιρεθούν από το σύνολο των αλληλουχιών εκείνες οι δώδεκα (Κεφ. 3.1) που χαρακτηρίζονται από μεγάλη έλλειψη δεδομένων. Έπειτα θα είναι εφικτή η «οριοθέτηση ειδών» (species delimitation). Η εύρεση δηλαδή των διακριτών μονάδων εντός του φυλογενετικού δέντρου, κάτι που επιτυγχάνεται μέσω της μεθόδου mPTP (Karli *et al.*, 2017). Με βάση αυτές, θα μπορεί να κατασκευαστεί ένα δέντρο ειδών και σε δεύτερο στάδιο να γίνει χρονολόγηση του δέντρου αυτού έτσι ώστε να υπάρχει μια εικόνα για το πότε άρχισε η διαφοροποίηση στην *Albinaria*, κάτι για το οποίο σήμερα δεν υπάρχουν αξιόπιστες ενδείξεις.

Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα των μοριακών αυτών αναλύσεων, θα μπορεί να γίνει μια νέα προσέγγιση στην ανάλυση της μορφολογίας του γένους. Να γίνει μια προσπάθεια να βρεθούν καινούριοι χαρακτήρες που να έχουν ιστορική και εξελικτική σημασία και σε συνδυασμό με τη μελέτη της βιολογίας και της οικολογίας του οργανισμού, να γίνει μία ακόμα αναθεώρηση στην ταξινομική της *Albinaria*. Από τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει μέχρι στιγμής και με τη γνώση που υπάρχει ήδη στη βιβλιογραφία, προσωπικά θεωρώ ότι ο αριθμός των ειδών θα πρέπει να μειωθεί. Το ταξινομικό σύστημα που εφαρμόζεται μέχρι σήμερα, είτε είναι αυτό του Welter-Schultes είτε του Nordsieck και των «οπαδών» τους, είναι σαφέστατα αντιπαραγωγικό. Η ονοματολογία θα πρέπει να είναι σαφής και ακριβής έτσι ώστε να διευκολύνει τους ερευνητές να συγκεντρώνονται σε μικρότερα κομμάτια ξέροντας ότι μπορούν να αποκλείσουν άλλα. Θα πρέπει κατά τη γνώμη μου οι ομάδες σαλιγκαριών που θα ονομαστούν σε επίπεδο είδους, να αποτελούν χρήσιμες και ουσιαστικές βιολογικές και εξελικτικές μονάδες που να προκύπτουν από μονοφυλετικές φυλογενετικές σχέσεις.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να υπενθυμίσω, ότι το πρόβλημα της ταξινόμησης δεν αφορά αποκλειστικά και μόνο το γένος της *Albinaria*. Για να είναι ολοκληρωμένη η μελέτη, θα πρέπει να αποσαφηνιστούν οι σχέσεις της με τα taxa των γενών *Cristataria*, *Isabellaria*, *Sericata* και *Carinigera* με τα οποία συσχετίζεται μορφολογικά και γεωγραφικά.

Έτσι, σε συνδυασμό με δεδομένα παλαιογεωγραφίας και παλαιοοικολογίας, θα είναι δυνατή η ανάλυση της βιογεωγραφίας της και θα μπορούν να ελεγχθούν ή και να αναπτυχθούν υποθέσεις για τις εξελικτικές διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την εντυπωσιακή διαφοροποίηση που παρατηρείται σήμερα στην *Albinaria*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aberer, Kobert and Stamatakis (2014) 'ExaBayes: Massively Parallel Bayesian Tree Inference for the Whole-Genome Era', *Molecular Biology and Evolution*. doi: 10.1093/molbev/msu236.
- Avice (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Ayoutanti, Krimbas, Mylonas, Papathanasopoulou and Sourdís (1993) 'Inbreeding and population structure of taxa of the genus *Albinaria* in the Aegean region', *Biol. Gallo-Hellenica*, 20, pp. 25–29.
- Ayoutanti, Krimbas, Sourdís and Mylonas (1993) 'Geographic structure of the genus *Albinaria* in the Aegean region as revealed by electrophoretic genetic data', *Biol. Gallo-Hellenica*, 20, pp. 19–23.
- Ayoutanti, Krimbas, Tsakas and Mylonas (1987) 'Genetic differentiation and speciation in the Greek Archipelago: the genus *Albinaria*', *Biologia Gallo-hellenica*, 13, pp. 55–160.
- Bittkau and Comes (2005) 'Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA', *Molecular Ecology*, 14, pp. 4065–4083.
- Bittkau and Comes (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*. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.02003.x.
- Boettger (1878) 'Monographie der Clausiliensection *Albinaria* v. VEST', *PFEIFFER, L.: Novitates Conchologicae*, 5, pp. 39–173.
- Boettger (1883) 'On new Clausiliae from the Levant, collected by Vice-Admiral T. Spratt', in *Proceedings of the Zoological Society of London*, pp. 324–343.
- Botero-Castro, Tilak, Justy, Catzeflis, Delsuc, and Douzery (2013). Next-generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats (Phyllostomidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(3), 728-739.
- Comes, Tribsch and Bittkau (2008) 'Plant speciation in continental island floras as exemplified by *Nigella* in the Aegean Archipelago', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2008.0063.
- Creutzburg (1963) 'Paleogeographic evolution of Crete from Miocene till our days', *Cretan Annals*, 15(16), pp. 336–342.
- Daams and Van Der Weerd (1980) 'Early Pliocene small mammals from the Aegean island of Karpathos (Greece) and their paleogeographic significance', *Geol Mijnbouw*, 59, pp. 327–331.
- Dermitzakis (1990) 'Paleogeography, geodynamic processes and event stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area', *Atti Convegno Lincei*, 85, pp. 263–288.
- Dermitzakis and Papanikolaou (1981) 'Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene', *Annales geologiques des pays helleniques*, 30.
- Dimopoulou, Antoniou, Mylonas, Vardinoyiannis and Poulakakis (2017) 'Systematics and Biodiversity

Inferring phylogenetic patterns of land snails of the genus *Albinaria* on the island of Dia (Crete, Greece)', *Systematics and Biodiversity*, pp. 1–17. doi: 10.1080/14772000.2016.1271368.

Douris, Cameron, Rodakis and Lecanidou (1998) 'Mitochondrial Phylogeography of the Land Snail *Albinaria* in Crete: Long-Term Geolgoical and Short-Term Vicariance Effects', *Evolution*, 52, pp. 116–125.

Douris, Giokas, Lecanidou, Mylonas and Rodakis (1998) 'Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA and morphological characters suggest a need for taxonomic re-evaluation within the Alopiniinae (Gastropoda: Clausiliidae)', *Journal of Molluscan Studies*, 64, pp. 81–92.

Douris, Giokas, Thomaz, Lecanidou and Rodakis (2007) 'Inference of evolutionary patterns of the land snail *Albinaria* in the Aegean archipelago: Is vicariance enough?', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, pp. 1224–1236. doi: 10.1016/j.ympev.2007.01.004.

Douris, Rodakis, Giokas, Mylonas and Lecanidou (1995) 'Mitochondrial DNA and morphological differentiation of *Albinaria* populations (Gastropoda: Clausiliidae)', *Journal of Molluscan Studies*, 61, pp. 65–78.

Eaton (2013) 'PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses'. doi: 10.1101/001081.

Edgar (2004) 'MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput', *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkh340.

Fernández, Gustavo and Giribet (2014). "Phylogenomic analysis of spiders reveals nonmonophyly of orb weavers." *Current Biology* 24.15, pp. 1772-1777.

Giokas (2000) 'Congruence and conflict in *Albinaria*(Gastropoda, clausiliidae). A review of morphological and molecular phylogenetic approaches', *Belgian Journal of Zoology*, 130, pp. 93–100.

Giokas and Mylonas (2002) 'Spatial distribution, density and life history in four *Albinaria* species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae)', *MALACOLOGIA*, 44(1), pp. 33–46.

Giokas and Mylonas (2004) 'Dispersal patterns and population structure of the land snail *Albinaria caerulea* (Pulmonata: Clausiliidae)', *Journal of Molluscan Studies*, 70, pp. 107–116.

Giokas, Mylonas and Sotiropoulos (2000) 'Gene flow and differential mortality in a contact zone between two *Albinaria* species (Gastropoda; Clausiliidae)', *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, pp. 755–770.

Giokas, Pafilis and Valakos (2005) 'Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (pulmonata: Clausiliidae)', *Journal of Molluscan Studies*. doi: 10.1093/mollus/eyi001.

Giokas, Thomaz, Douris, Lecanidou and Rodakis (2010) '5000 years of molecular evolution in a population of the land snail *Albinaria caerulea* transported by humans', *Journal of Molluscan Studies*. doi: 10.1093/mollus/eyp041.

Gittenberger (1979) 'Eine neue *Albinaria*-Art (Gastropoda: Clausiliidae) der Insel Kephallinia', *Zoologische Mededelingen*, 54(5), pp. 83–85.

Gittenberger (1991) 'What about non-adaptive radiation?', *Biological Journal of the Linnean Socieg*, 43, pp. 263–272.

Gittenberger, Flach and Reitsma (1988) 'Drei neue Albinaria-Arten von Kreta, Nomos Lasithiou (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae)', *Basteria*, 52, pp. 111–116.

Gittenberger and Goodfriend (1993) 'Land snails from the last glacial maximum on Andikithira, southern Greece and their palaeoclimatic implications', *Journal of Quaternary Science*. doi: 10.1002/jqs.3390080203.

Gittenberger and Schilthuizen (1996) 'ratus (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae)', *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca (J. Taylor, ed.)*, pp. 235–300.

Griffin, Robin, and Hoffmann (2011). A next-generation sequencing method for overcoming the multiple gene copy problem in polyploid phylogenetics, applied to *Poa* grasses. *BMC biology*, 9(1), 19.

Haponski, Lee and Foighil (2017) 'Moorean and Tahitian *Partula* tree snail survival after a mass extinction: New genomic insights using museum specimens', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, pp. 151–157. doi: 10.1016/j.ympev.2016.09.021.

Kamilari and Sfenthourakis (2009) 'A morphometric approach to the geographic variation of the terrestrial isopod species *armadillo tuberculatus* (Isopoda: Oniscidea)', *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. doi: 10.1111/j.1439-0469.2008.00510.x.

Kapli, Lutteropp, Zhang, Kobert, Pavlidis, Stamatakis and Flouri (2017) 'Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo.', *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btx025.

Kemperman (1992) *Systematics and evolutionary history of the Albinaria species from the Ionian islands of Kephallinia and Ithaka (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae)*. University of Leiden.

Kemperman and Degenars (1992) 'Allozyme frequencies in *Albinaria* (Gastropoda: Pulmonata: Clausiliidae) from the Ionian islands of Kephallinia and Ithaka', *Malacologia*, 34(1–2), pp. 33–61.

Kemperman and Gittenberger (1990) 'Two new *Albinaria* subspecies (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae) from the Ionian island of Kephallinia', *Basteria*, 54.1(1–3), pp. 143–150.

Kornilios, Stamatakis and Giokas (2015) 'Multiple reversals of chirality in the land snail genus *Albinaria* (Gastropoda, Clausiliidae)', *Zoologica Scripta*. doi: 10.1111/zsc.12125.

Kozlov, Aberer and Stamatakis (2015) 'ExaML version 3: A tool for phylogenomic analyses on supercomputers', *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btv184.

Krijgsman, Hilgen, Raffi, Sierro and Wilson (1999) 'Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis', *Nature*, 400, pp. 652–655.

Leaché, A.D., Chavez, A.S., Jones, L.N., Grummer, J.A., Gottscho, A.D., Linkem (2015) 'Phylogenomics of Phrynosomatid Lizards: Conflicting Signals from Sequence Capture versus Restriction Site Associated DNA Sequencing', *Genome Biol. Evol.*, 7, pp. 706–719.

Lymberakis and Poulakakis (2010) 'Three continents claiming an archipelago: The evolution of Aegean's herpetofaunal diversity', *Diversity*. doi: 10.3390/d2020233.

Meshner and Welter-Schultes (2008) 'Studies on range expansion, predation pressure and insolation in *Albinaria* on the island of Dia (Greece), focused on a recently introduced species (Gastropoda:

Clausiliidae)', *Species, Phylogeny and Evolution*, 1, pp. 129–140.

Meulenkamp (1985) 'Aspects of the Late Cenozoic evolution of the Aegean region', *Springer New York*, (Geological evolution of the Mediterranean basin), pp. 307–321.

Van Moorsel (2001) *Molecular phylogenetics of a speciose group: Albinaria and the search for homology. Ph.D. thesis*. University of Leiden.

Mylonas, Krimbas, Sourdis and Ayoutanti (1987) 'Morphological differentiation In Albinaria populations (Gastropoda, Pulmonata) from the Aegean Region', in *Rapp. Comm. into Mer Medit.*, p. 132.

Mylonas, Krimbas, Tsakas and Ayoutanti (1987) 'The genus Albinaria Vest (Clausiliidae, Gastropoda). Is there any true species?', *Biologia gallo-hellenica*, 13, pp. 161–164.

Neubert (1993) 'Two new taxa of the Clausiliidae from the east Mediterranean area', *Zoology in the Middle East*, 9, pp. 93–96.

Neubert (1998) 'New data on the fauna of Clausiliidae of Greece, in particular on Albinaria from Attica and the Peloponnese (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae)', *Basteria*, 62, pp. 125–155.

Nordsieck (1977) 'Zur Anatomie und systematik der Clausilien, XVII. Taxonomische revision des Genus Albinaria Vest.', *Arch. Molluskenk.*, 109((4/6)), pp. 285–307.

Nordsieck (1997) 'Phylogeny of and within the Albinaria - Isabellaria group (Gastropoda: Pulmonata: Clausiliidae)', *Heldia*, 4(5), pp. 53–61.

Nordsieck (1999) 'Annotated check-list of the species of the Albinaria - Isabellaria group (Gastropoda: Stylommatophora: Clausiliidae)', *Mitt. dt. malak. Ges.*, 62/63, pp. 1–21.

Nordsieck (2004) 'Albinaria cretensis group: definition of the species and subspecies, with the description of new taxa', *BASTERIA*, 68, pp. 51–70.

Orstan (2001) 'A preliminary survey of Albinaria populations around Kusadasi bay, Turkey', *Triton*, 4, pp. 42–44.

Parent, Caccone and Petren (2008) 'Colonization and diversification of Galá pagos terrestrial fauna: a phylogenetic and biogeographical synthesis', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1508), pp. 3347–3361. doi: 10.1098/rstb.2008.0118.

Parmakelis, Pfenninger, Spanos, Papagiannakis, Louis and Mylonas (2005) 'Inference of a radiation in Mastus (Gastropoda, Pulmonata, Enidae) on the island of Crete', *Evolution*. doi: 10.1554/04-489.

Perissoratis and Conispoliatis (2003) 'The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe)', *Marine Geology*. doi: 10.1016/S0025-3227(03)00047-1.

Peterson, Weber, Kay, Fisher and Hoekstra (2012) 'Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0037135.

Poulakakis, Kapli, Lymberakis, Trichas, Vardinoyiannis, Sfenthourakis and Mylonas (2015) 'A review of phylogeographic analyses of animal taxa from the aegean and surrounding regions', *Journal of*

Zoological Systematics and Evolutionary Research. doi: 10.1111/jzs.12071.

Prum, Berv, Dornburg, Field, Townsend, Lemmon, and Lemmon (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526(7574), 569.

Psonis (2017) *Molecular Phylogeny and Phylogeography of the 'Podarcis tauricus' (Sauria: Lacertidae) Species Subgroup*. University of Crete, Department of Biology, Natural History Museum Crete.

Robinson and Foulds (1981) 'Comparison of phylogenetic trees', *Mathematical Biosciences*, 53, pp. 131–147.

Sauer and Hausdorf (2009) 'Sexual selection is involved in speciation in a land snail radiation on crete', *Evolution*. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00751.x.

Sauer and Hausdorf (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(1), p. 299.

Schilthuizen (1994) 'Reproductive isolation in snails of the genus *Albinaria* (Gastropoda: Clausiliidae)', *Biological Journal of the Linnean Society*, 52, pp. 317–324. doi: 10.1111/j.1095-8312.1994.tb00994.x.

Schilthuizen and Gittenberger (1990) 'Zur Formenbildung und Verbreitung der *Albinaria*-Arten von Kreta; Der 'gruppe Der *Candida* ', *Taxa (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae)*', *BASTERIA*, 54, pp. 131–142.

Schilthuizen and Gittenberger (1991) 'A new *Albinaria* species from Central Crete (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae)', *Basteria*, 55(4–6), pp. 111–114.

Schilthuizen and Gittenberger (1996) 'Allozyme variation in some Cretan *Albinaria* (Gastropoda): paraphyletic species as natural phenomena', *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*, pp. 301–311.

Schilthuizen, Gittenberger and Gulyaev (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, pp. 457–462.

Schilthuizen, Gutteling E, Van Moorsel C, Welter-Schultes F, Haase M and Gittenberge E (2004) 'Phylogeography of the land snail *Albinaria hippolyti* (Pulmonata: Clausiliidae) from Crete, inferred from ITS-1 sequences', *Biological Journal of the Linnean Society*, 83(3), pp. 317–326.

Schilthuizen and Lombaerts (1994) 'Population structure and levels of gene flow in the Mediterranean land snail *Albinaria corrugata* (Pulmonata: Clausiliidae)', *Evolution*, 48(3), pp. 577–586.

Sfenthourakis and Triantis (2017) 'The Aegean archipelago: A natural laboratory of evolution, ecology and civilisations', *Journal of Biological Research (Greece)*. doi: 10.1186/s40709-017-0061-3.

Stamatakis (2014) 'RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies', *Bioinformatics*, 30(9), pp. 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.

Tomlin (1935) 'A new *Albinaria* from Cyprus', *Journal of Conchology*, 20, pp. 164–165.

Von Vest (1867) 'Ueber den Schliess-apparat der Clausilien', *Verhandlungen und Mittheilungen der Siebenbürgischen Vereins für Naturwissenschaften*, 18, pp. 5–18, 161–174, 188–196.

Wagner (1923) 'Ergänzungen und Erläuterungen zur Systematik der Clausiliiden. II. Neue Formen und Arten des Genus *Albinaria* ex rect. mea', *Prace Zoologiczne Polskiego Panstwowego Muzeum Przyrodniczego*, 2(1), pp. 1–8.

Wagner (1924) 'Ergänzungen und Erläuterungen zur Systematik der Clausiliiden. II. Neue Formen und Arten des Genus *Albinaria* ex rect. mea', *Prace Zoologiczne Polskiego Panstwowego Muzeum Przyrodniczego*, 2(2), pp. 9–23.

Uit De Weerd (2004) *Molecular phylogenetic history of eastern Mediterranean Aloiinae, a group of morphologically indeterminate land snails*. University of Leiden, the Netherlands.

Uit De Weerd and Gittenberger (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(143), pp. 531–542.

Uit De Weerd and Gittenberger (2013) 'Phylogeny of the land snail family Clausiliidae (Gastropoda: Pulmonata)', *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.ympev.2013.01.011.

Uit De Weerd, Piel and Gittenberger (2004) 'Widespread polyphyly among Aloiinae snail genera: When phylogeny mirrors biogeography more closely than morphology', *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.ympev.2004.07.010.

Welter-Schultes, F. W. (1998) '*Albinaria* in central and eastern Crete: distribution map of the species (Gastropoda: Clausiliidae)', *Journal of Molluscan Studies*, 64, pp. 275–279.

Welter-Schultes, F. (1998) 'Human-dispersed land snails in Crete, with special reference to *Albinaria* (Gastropoda: Clausiliidae)', *Biologia Gallo-hellenica*, 24(2), pp. 83–106.

Welter-Schultes (2000) 'The paleogeography of late Neogene central Crete inferred from the sedimentary record combined with *Albinaria* land snail biogeography', *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. doi: 10.1016/S0031-0182(99)00176-5.

Welter-Schultes (2001) 'Paleontological Society Spatial Variations in *Albinaria terebra* Land Snail Morphology in Crete (Pulmonata: Clausiliidae): Constraints for Older and Younger Colonizations? Spatial variations in *Albinaria terebra* land snail morphology in Crete (Pulmonata: Clausiliidae): constraints for older and younger colonizations?', *Author Paleobiology*, 27(272), pp. 348–368. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2666078>.

Welter-Schultes (2010) 'Revision of the genus *Albinaria* in Crete (Greece): presence of geographically variable monotypic and polytypic species (Gastropoda: Clausiliidae)', *Archiv Molluskenk*, 139, pp. 143–245.

Welter-Schultes (2012) *European Non-Marine Molluscs, a Guide for Species Identification: Bestimmungsbuch für europäische Land-und Süßwassermollusken*. Edited by Planet Poster Editions.

Wiese (1989) 'Die Gattung *Albinaria* auf Kreta. II Clausilien auf der Insel Dia', *Schr. Malakozool*, 2, pp. 39–55.

Wiese (1990) 'Die Gattung *Albinaria* auf Kreta: V. Eine neue Unterart aus Stidostkreta', *Schriften zur Malakozoologie*, 3, pp. 48–50.

Zilch (1977) 'Die Typen und Typoide des Natur-Museums Senckenberg, 57: Mollusca: Clausiliidae (4): Aloiinae (2): Aloiini (1)', *Archiv für Molluskenkunde*, 107, pp. 309–363.

Βαρδινογιάννη (1994) *Βιογεωγραφία των χερσαίων μαλακίων στο νότιο νησιωτικό αιγαίο τόξο*. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Γκιώκας (1996) *Η διαφοροποίηση του γένους *Albinaria* στον Ελλαδικό χώρο*. ΕΚΠΑ, Τμήμα Βιολογίας.

Μυλωνάς (1982) *Μελέτη πάνω στην Ζωογεωγραφία και Οικολογία των χερσαίων μαλακίων των Κυκλάδων*. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Παρμακέλης (2003) *Η διαφοροποίηση του γένους *Mastus* (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae) στον Ελλαδικό χώρο. Μια συγκριτική μελέτη με μεθόδους οικολογίας, μορφομετρίας και μοριακής ανάλυσης*. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.

Τριάντης (2002) *Βιογεωγραφία, συστηματική και οικολογία των χερσαίων μαλακίων στο αρχιπέλαγος της Σκύρου*. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.

Παράρτημα Ι

κωδικός δείγματος ^α	όνομα είδους	περιοχή / τοποθεσία	κωδικός περιοχής FC ^β	ddRAD ^γ
15+	<i>A. jaeckeli</i>	Κρήτη - Δία	11966	2015
16+	<i>A. jaeckeli</i>	Κρήτη - Δία	11966	2015
26+	<i>A. jaeckeli</i>	Κρήτη - Δία	11963	2015
30+	<i>A. teres</i>	Κρήτη - Λασιθι - Κουφονήσι	533	2015
33+	<i>A. teres</i>	Κρήτη - Σητεία - Καβάλοι	8087	2015
76+	<i>A. torticollis</i>	Κρήτη - Δία	12421	2015
77+	<i>A. torticollis</i>	Κρήτη - Δία	12421	2015
78+	<i>A. torticollis</i>	Κρήτη - Δία	12421	2015
88+	<i>A. turrita</i>	Κυκλάδες - Σίφνος	4466	2015
93+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αстуπάλαια - Χόνδρος	7796	2015
97+	<i>A. violacea</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Παλαιόκαστρο	13279	2015
99+	<i>A. violacea</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Φόδελε, Σίσεσ	13280	2015
101+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Κυνηγιανά	13281	2015
106+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Μαργαρίτες	13283	2015
107+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Πέραμα	13284	2015
108+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αстуπάλαια - Αγ. Κυριακή	7798	2015
109+	<i>A. hippolyti</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Κάμπος Απλαδιανών	13285	2015
110+	<i>A. hippolyti</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Κάμπος Απλαδιανών	13285	2015
111+	<i>A. hippolyti</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Μακρυγιάννης	13286	2015
113+	<i>A. spratti</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Δροσιά	13287	2015
114+	<i>A. spratti</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Δροσιά	13287	2015
117+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αстуπάλαια - Λιγνό	7797	2015
127+	<i>A. corrugata</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Γιούχτας	14011	2015
131+	<i>A. wiesei</i>	Κρήτη - Λασιθι - Αγ. Γεώργιος Σεληνάρι	14012	2015
132+	<i>A. wiesei</i>	Κρήτη - Λασιθι - Αγ. Γεώργιος Σεληνάρι	14012	2015
143+	<i>A. moreletiana</i>	Κρήτη - Λασιθι - Σπιναλόγκα	14017	2015
153+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Πετρέσ	14021	2015
162+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Χανιά - Πρασές	14025	2015
163+	<i>A. tenuicostata</i>	Κρήτη - Χανιά - Γραμβούσα	14026	2015
164+	<i>A. tenuicostata</i>	Κρήτη - Χανιά - Γραμβούσα	14026	2015
170+	<i>A. terebra</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Λίσταρος	14031	2015
172+	<i>A. terebra</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Καλοί Λιμένες	14032	2015
176+	<i>A. terebra</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Μάρτσαλο	14033	2015
179+	<i>A. teres</i>	Κρήτη - Λασιθι - Φαράγγι Χαυγά	14035	2015
181+	<i>A. praeclara</i>	Κρήτη - Λασιθι - Φαράγγι Χαυγά	14035	2015
182+	<i>A. praeclara</i>	Κρήτη - Λασιθι - Φαράγγι Χαυγά	14035	2015
183+	<i>A. praeclara</i>	Κρήτη - Λασιθι - Φαράγγι Χαυγά	14035	2015
185+	<i>A. teres</i>	Κρήτη - Λασιθι - Ιεράπετρα	14036	2015

190+	<i>A. manselli</i>	Κρήτη - Σητεία - Άμπελος	14038	2015
191+	<i>A. sturanyi</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Αφέντης Σταυρωμένος	14039	2015
192+	<i>A. sturanyi</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Αφέντης Σταυρωμένος	14039	2015
201+	<i>A. praeclara</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Καλό Χωριό	14043	2015
221+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Χανιά - Παλαιόχωρα	14057	2015
224+	<i>A. amalthea</i>	Κρήτη - Χανιά - Φαράγγι Θερίσσου	14058	2015
234+	<i>A. candida</i>	Κρήτη - Χανιά - Σταυρός	14063	2015
258+	<i>A. sphakiota</i>	Κρήτη - Χανιά - Φαράγγι Ίμβρου	13090	2015
261+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Χανιά - Φαράγγι Ίμβρου	13091	2015
282+	<i>A. rebeli</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Κόνιδα	13294	2015
283+	<i>A. rebeli</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Κόνιδα	13294	2015
289+	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διουυσάδες - Γιανυσάδα	14476	2015
310+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Πάρος - Αγκαιρια	15542	2015
311+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Ρέθυμνο - Ορθές	13282	2015
318+	<i>A. eburnea</i>	Κρήτη - Χανιά - Λευκά Όρη	15455	2015
319+	<i>A. eburnea</i>	Κρήτη - Χανιά - Λευκά Όρη	15455	2015
322+	<i>A. idaea</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Ζαρός	14034	2015
323+	<i>A. idaea</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Ζαρός	14034	2015
324+	<i>A. idaea</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Ζαρός	14034	2015
331+	<i>A. teres</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Καλό Χωριό	14043	2015
332+	<i>A. amalthea</i>	Κρήτη - Χανιά - Ροδοπού	14052	2015
333+	<i>A. amalthea</i>	Κρήτη - Χανιά - Ροδοπού	14052	2015
334+	<i>A. arthuriana</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Λασιίδα	14040	2015
335+	<i>A. arthuriana</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Λασιίδα	14040	2015
368+	<i>A. manselli</i>	Κρήτη - Σητεία - Καβάλοι	13032	2015
393+	<i>A. manselli</i>	Κρήτη - Σητεία - Άμπελος	14038	2015
404+	<i>A. cretensis</i>	Κρήτη - Χανιά - Πλάτανος	14053	2015
418+	<i>A. corrugata</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Λιμνάκαρο	15520	2015
448+	<i>A. li</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Καλοί Λιμένες	14032	2015
460+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγενδρος - Καραβοστάσι	15561	2015
461+	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Αεροδρόμιο	15410	2015
463+	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Αεροδρόμιο	15410	2015
487+	<i>A. christae</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Πλάκα	15548	2015
491+	<i>A. maltzani</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Φινοκαλιά	15549	2015
492+	<i>A. maltzani</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Φινοκαλιά	15549	2015
493+	<i>A. maltzani</i>	Κρήτη - Λασιίθι - Φινοκαλιά	15549	2015
497+	<i>A. hippolity</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Αλμυρός	15567	2015
499+	<i>A. hippolity</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Αλμυρός	15567	2015
500+	<i>A. hippolity</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Αλμυρός	15567	2015

503+	<i>A. corrugata</i>	Κρήτη - Λασιθι - Αγ. Γεώργιος Σεληνάρι	15550	2015
506+	<i>A. wiesei</i>	Κρήτη - Λασιθι - Αγ. Γεώργιος Σεληνάρι	15550	2015
507+	<i>A. christae</i>	Κρήτη - Λασιθι - Πλάκα	15548	2015
508+	<i>A. christae</i>	Κρήτη - Λασιθι - Πλάκα	15548	2015
546+	<i>A. retusa</i>	Κρήτη - Δία	13003	2015
547+	<i>A. retusa</i>	Κρήτη - Δία	13003	2015
548+	<i>A. retusa</i>	Κρήτη - Δία	13003	2015
558+	<i>A. li</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Καλοί Λιμένες	15568	2015
559+	<i>A. li</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Καλοί Λιμένες	15568	2015
562+	<i>A. li</i>	Κρήτη - Ηράκλειο - Καλοί Λιμένες	15568	2015
573+	<i>A. sublamelosa</i>	Κρήτη - Χανιά - Φαράγγι Σαμαριάς	15503	2015
578+	<i>A. sublamelosa</i>	Κρήτη - Χανιά - Φαράγγι Σαμαριάς	15506	2015
581+	<i>A. sublamelosa</i>	Κρήτη - Χανιά - Φαράγγι Σαμαριάς	15508	2015
584+	<i>A. turrata</i>	Κυκλάδες - Σίφνος	4469	2015
585+	<i>A. turrata</i>	Κυκλάδες - Σίφνος	4469	2015
621+	<i>A. janicollis</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	21213	2015
622+	<i>A. janicollis</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	21213	2015
626+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Ρόδος - Προφήτης Ηλίας	21209	2015
629+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Σύμη	21202	2015
640+	<i>A. proteus</i>	Δωδεκάνησα - Κάρπαθος - Αγ. Νικόλαος	21226	2015
641+	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάρπαθος - Καλή Λίμνη	21227	2015
643+	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα -	16955	2015
644+	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα -	16955	2015
647+	<i>A. proteus</i>	Δωδεκάνησα - Σαρία	15416	2015
649+	<i>A. proteus</i>	Δωδεκάνησα - Σαρία	15416	2015
656	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Γερολιμένες	sinos1	
657+	<i>A. voithii</i>	Πελοπόννησος - Λακωνία - Παρόρι	sinos2	2016
658+	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Λάγια	sinos3	2016
659	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Λάγια	sinos3	
660+	<i>A. menelaus</i>	Πελοπόννησος - Ταύγετος - Καταφύγιο	sinos4	2016
661+	<i>A. menelaus</i>	Πελοπόννησος - Ταύγετος - Καταφύγιο	sinos4	2016
662+	<i>A. voithii</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Ελαιοχώρι	sinos5	2016
663+	<i>A. lycica</i>	Τουρκία - Demre_Basilica	sinos6	2016
664+	<i>A. butoti</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Κοσμάς	sinos8	2016
665+	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Καλαμάτα	sinos9	2016
666+	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Καλαμάτα	sinos9	2016
667+	<i>A. ithomensis</i>	Πελοπόννησος - Αρχαία Μεσσήνη	sinos10	2016
668+	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Χειμάρρα	sinos11	2016
669	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Χειμάρρα	sinos11	

670	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Πόρος	sinos12	
671	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Πόρος	sinos12	
672	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Ξενόπουλο	sinos13	
673	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Ξενόπουλο	sinos13	
674+	<i>A. jonica</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Άσσοι	sinos14	2016
675	<i>A. jonica</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Άσσοι	sinos14	
676	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Φάρσα	sinos15	
677+	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Φάρσα	sinos15	2016
678	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Λιξούρι	sinos16	
679+	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Λιξούρι	sinos16	2016
680	<i>A. contaminata</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Πόρος	sinos17	
681	<i>A. contaminata</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Πόρος	sinos17	
682+	<i>A. contaminata</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Αργίγια	sinos18	2016
683+	<i>A. contaminata</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Αργίγια	sinos18	2016
684+	<i>A. contaminata</i>	Ιόνιο - Ιθάκη - Κιόνι	sinos19	2016
685+	<i>A. contaminata</i>	Ιόνιο - Ιθάκη - Κιόνι	sinos19	2016
686	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Λευκάδα - Ναός Απόλλωνα	sinos20	
687	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Λευκάδα - Ναός Απόλλωνα	sinos20	
688+	<i>A. krueperi</i>	Πελοπόννησος - Κυπαρισσία - Κάστρο	sinos21	2016
689+	<i>A. krueperi</i>	Πελοπόννησος - Κυπαρισσία - Κάστρο	sinos21	2016
690+	<i>A. linnei</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Κούτρουφα	sinos22	2016
691+	<i>A. linnei</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Κούτρουφα	sinos22	2016
692	<i>A. discolor</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αρκαδικό Χωριό	sinos23	
693	<i>A. discolor</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αρκαδικό Χωριό	sinos23	
694	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Φαράγγι Δαφνών	sinos24	
695	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Φαράγγι Δαφνών	sinos24	
696	<i>A. argynnis</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Παλαιοχώρι	sinos25	2016
697	<i>A. argynnis</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Παλαιοχώρι	sinos25	
698	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας	sinos26	
699	<i>A. scopulosa</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Προδρόμου	sinos27	
700	<i>A. scopulosa</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Προδρόμου	sinos27	
701	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	sinos28	
702	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	sinos28	
703	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Μαίναλο - Χιονοδρομικό	sinos29	
704	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Μαίναλο - Χιονοδρομικό	sinos29	2016
705	<i>A. arcadica</i>	Πελοπόννησος - Χελμός - Καλάβρυτα	sinos30	
706	<i>A. arcadica</i>	Πελοπόννησος - Χελμός - Καλάβρυτα	sinos30	
707+	<i>A. hians</i>	Στερεά Ελλάδα - Ευρυτανία - Προυσσός	sinos31	2016
708+	<i>A. hians</i>	Στερεά Ελλάδα - Ευρυτανία - Προυσσός	sinos31	2016

709	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Αρχαίο λατομείο	sinos32	
710+	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Αρχαίο λατομείο	sinos32	2016
711	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σύρος	sinos33	
712	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σύρος	sinos33	
713	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Νάξος - Ζας	sinos34	
714	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Νάξος - Ζας	sinos34	
715	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Λιβιάδι	sinos35	
716	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Λιβιάδι	sinos35	
717+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Παναγία	sinos36	2016
718	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Παναγία	sinos36	
719	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλεια - Καμινάκια	sinos37	
720	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλεια - Καμινάκια	sinos37	
721	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλεια	sinos38	
722	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλεια	sinos38	
723	<i>A. brevicollis</i>	Κυκλάδες - Ανάφη - Χώρα	sinos39	
724+	<i>A. brevicollis</i>	Κυκλάδες - Ανάφη - Χώρα	sinos39	2016
725	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Κάστρο	sinos40	
726+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Κάστρο	sinos40	2016
727	<i>A. lerosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Αρχαία	sinos41	
728	<i>A. lerosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Αρχαία	sinos41	
729	<i>A. turrita</i>	Κυκλάδες - Κέα - Καστριανή	sinos42	
730	<i>A. turrita</i>	Κυκλάδες - Κέα - Καστριανή	sinos42	
731	<i>A. discolor</i>	Στερεά Ελλάδα - Αίγινα	sinos43	
732+	<i>A. anatolica</i>	Δωδεκάνησα - Καστελόριζο	sinos44	2016
733+	<i>A. anatolica</i>	Δωδεκάνησα - Καστελόριζο	sinos44	2016
734+	<i>A. anatolica</i>	Τουρκία - Kas	sinos45	2016
735	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάρπαθος - Πηγάδια	sinos46	
736	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάρπαθος - Πηγάδια	sinos46	
737	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Αγ. Χαράλαμπος	sinos47	
738	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Αγ. Χαράλαμπος	sinos47	
739+	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Ελληνοκαμάρες	sinos48	2016
740+	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Ελληνοκαμάρες	sinos48	2016
741	<i>A. proteus</i>	Δωδεκάνησα - Σαρία	sinos49	
742	<i>A. proteus</i>	Δωδεκάνησα - Σαρία	sinos49	
743+	<i>A. grayana</i>	Κύθηρα - Καψάλι	sinos50	2016
744+	<i>A. grayana</i>	Κύθηρα - Καψάλι	sinos50	2016
745+	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα -	sinos51	2016
746	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα -	sinos51	
748	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Κελεφάς	sinos52	

749+	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Πλάτωμα	sinos53	2016
750	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Πλάτωμα	sinos53	
751+	<i>A. argynnis</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Λεωνίδιο	sinos54	2016
752	<i>A. argynnis</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Λεωνίδιο	sinos54	
753	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Μεγάλη Τούρλα	sinos55	
754	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Μεγάλη Τούρλα	sinos55	
755+	<i>A. solicola</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας	sinos56	2016
756+	<i>A. solicola</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας	sinos56	2016
757+	<i>A. solicola</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας	sinos57	2016
758	<i>A. solicola</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας	sinos57	
759	<i>Idyla</i>	Σποράδες - Σκύρος - Ατσιτσα	sinos59	2016
760	<i>Carinigera</i>	Β. Αιγαίο - Θάσος - Άστρις	sinos60	
761	<i>Carinigera</i>	Β. Αιγαίο - Θάσος - Άστρις	sinos60	
762	<i>Idyla</i>	Πελοπόννησος - Κορινθία - Νεμέα	sinos61	2016
763	<i>Idyla</i>	Πελοπόννησος - Κορινθία - Νεμέα	sinos61	2016
764+	<i>A. puella</i>	Χίος - Ανάβατος	7420	2016
765+	<i>A. puella</i>	Χίος - Ανάβατος	7420	2016
766	<i>A. caerulea</i>	Χίος - Αγ. Πατέρες, πευκόδασος	7455	
767+	<i>A. puella</i>	Χίος - Ανάβατος	7456	2016
768	<i>A. puella</i>	Χίος - Ανάβατος	7456	
769	<i>A. puella</i>	Χίος - Ανάβατος	10032	
770	<i>A. puella</i>	Χίος - Ανάβατος	10032	
771+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Ρόδος - Προφήτης Ηλίας	15486	2016
772+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Ρόδος - Προφήτης Ηλίας	15486	2016
773	<i>A. caerulea</i>	Σάμος - Βαλεοντάδες	20167	
774	<i>A. caerulea</i>	Σάμος - Βαλεοντάδες	20167	
775	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Ρόδος - Προφήτης Ηλίας	15487	
776	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Ρόδος - Προφήτης Ηλίας	15487	
777	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος	21373	
778	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος	21373	
779	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Οροπέδιο Άρη	21371	
780	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Οροπέδιο Άρη	21371	
781	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σαντορίνη - Προφήτης Ηλίας	11971 (43,44)	
782	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σαντορίνη - Προφήτης Ηλίας	11971 (43,44)	
783	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
784	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
785	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	2016
786	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	
787	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγενδρος - Καραβοστάσι	15561	

788	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγενδρος - Καραβοστάσι	15561	
789	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	
790	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	
791	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Κωρώνη	16883	
792	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Κωρώνη	16883	
793	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Μαραθόκαμπος	20169	
794	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Μαραθόκαμπος	20169	
795	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
796	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
797	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	
798	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	
799	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγενδρος - Καραβοστάσι	15561	
800	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγενδρος - Καραβοστάσι	15561	
801	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	
802	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	
803	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Κωρώνη	16883	
804	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Κωρώνη	16883	
805	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Μαραθόκαμπος	20169	
806	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Μαραθόκαμπος	20169	
807	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σκόλλις	14001	
808	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σκόλλις	14001	
809	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σαντομέρι	14005	
810	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σαντομέρι	14005	
811	<i>A. ithomensis</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Αρχαία Μεσσήνη	14007	
812	<i>A. ithomensis</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Αρχαία Μεσσήνη	14007	
813	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	
814	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	
815	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Ελώνης	16869	
816	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Ελώνης	16869	
817	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Περδικονέρι	11668	
818+	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Περδικονέρι	11668	2016
819+	<i>A. ierosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κάλυμνος - Παλιόνησος	3364	2016
820	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Γαργαλιάνοι	16024	
821	<i>A. maculosa</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Γαργαλιάνοι	16024	
822+	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα - Πορί - Πρασονήσι	2409	2016
823+	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα - Πορί	12723	2016
824	<i>A. ierosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κάλυμνος - Εμπορειός	3361	
825	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Ηλεία - Ερύμανθος	13021	2016
826	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Ηλεία - Ερύμανθος	13021	

827+	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	486	2016
828	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	486	
829+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Νάξος - Ζακ	4439	2016
830+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Νάξος - Ζακ	4439	2016
831+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Χάλκη - Προφήτης Ηλίας	4779	2016
832	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Χάλκη - Προφήτης Ηλίας	4779	2016
833	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Αεροδρόμιο	15410	
834	<i>A. olivieri</i>	Δωδεκάνησα - Κάσος - Αεροδρόμιο	15410	
835	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Λακωνία - Βαμβακού	16097	
836	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Λακωνία - Βαμβακού	16097	
837+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Αμοργός - Αγ. Ιωάννης Θεολόγος	16840	2016
838	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Αμοργός - Αγ. Ιωάννης Θεολόγος	16840	
839+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Κανδελιούσα	1953	2016
840+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Κανδελιούσα	1953	2016
841	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αγ. Ηλίας	17210	2016
842	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αγ. Ηλίας	17210	
843	<i>A. scopulosa</i>	Ιωάννινα - Βοϊδομάτης ποταμός	7305	
845*	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Πνάκα	21234	2016
846*	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Πνάκα	21234	2016
847	<i>A. puella</i>	Σάμος - Καλάμι	21231	
848	<i>A. puella</i>	Σάμος - Καλάμι	21231	2016
849*	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Πνάκα	21233	2016
850*	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Πνάκα	21233	2016
851	<i>A. grayana</i>	Κύθηρα - Μυλοπόταμος	21374	
852	<i>A. grayana</i>	Κύθηρα - Μυλοπόταμος	21374	2016
853*	<i>A. cytherae</i>	Κύθηρα - Αγία Σοφία	21376	2016
854*	<i>A. cytherae</i>	Κύθηρα - Αγία Σοφία	21376	2016
855*	<i>A. compressa</i>	Κύθηρα - Καψάλι	21382	2016
856*	<i>A. compressa</i>	Κύθηρα - Καψάλι	21382	2016
857*	<i>A. discolor</i>	Κύθηρα - Άγιος Ηλίας	21386	2016
858	<i>A. discolor</i>	Κύθηρα - Άγιος Ηλίας	21386	
859	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
860	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
861	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	
862	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	
863	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγενδρος - Καραβοστάσι	15561	
864	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγενδρος - Καραβοστάσι	15561	
865	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	
866	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	

867	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Κωρώνη	16883	
868	<i>A. nivea</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Κωρώνη	16883	
869	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Μαραθόκαμπος	20169	
870	<i>A. freytagi</i>	Σάμος - Μαραθόκαμπος	20169	
871	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σκόλλις	14001	
872	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σκόλλις	14001	
873	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σαντομέρι	14005	
874	<i>A. hians</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Σαντομέρι	14005	2016
875	<i>A. ithomensis</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Αρχαία Μεσσήνη	14007	2016
876	<i>A. ithomensis</i>	Πελοπόννησος - Μεσσηνία - Αρχαία Μεσσήνη	14007	2016
877	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	2016
878	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	
879	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Ελώνης	16869	
880*	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Ελώνης	16869	2016
881+	<i>A. schuetti</i>	Τουρκία - Antalya	sinos7	2016
882	<i>Sericata</i>	Στερεά Ελλάδα - Εύβοια - Στουπί	Sinos58	
883	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	14476	
884	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	14476	
885	<i>Carinigera</i>	Β. Αιγαίο - Θάσος - Άστρις	sinos60	2016
886	<i>Carinigera</i>	Β. Αιγαίο - Θάσος - Άστρις	sinos60	2016
887	<i>Carinigera</i>	Β. Αιγαίο - Θάσος - Άστρις	sinos60	2016
888+	<i>A. scopulosa</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Προδρόμου	sinos27	2016
889	<i>A. scopulosa</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Προδρόμου	sinos27	
890+	<i>A. scopulosa</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Προδρόμου	sinos27	2016
891+	<i>A. scopulosa</i>	Ιωάννινα - Βοϊδομάτης ποταμός	7305	2016
892+	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Μαίναλο - Χιονοδρομικό	sinos29	2016
893	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Μαίναλο - Χιονοδρομικό	sinos29	
894	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Μαίναλο - Χιονοδρομικό	sinos29	
895	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Λακωνία - Βαμβακού	16097	
896+	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Λακωνία - Βαμβακού	16097	2016
897	<i>A. arcadica</i>	Πελοπόννησος - Χελμός - Καλάβρυτα	sinos30	
898	<i>A. arcadica</i>	Πελοπόννησος - Χελμός - Καλάβρυτα	sinos30	
899	<i>A. arcadica</i>	Πελοπόννησος - Χελμός - Καλάβρυτα	sinos30	
900+	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Πόρος	sinos12	2016
901	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Πόρος	sinos12	
902	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Πόρος	sinos12	
903+	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Ξενόπουλο	sinos13	2016
904	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Ξενόπουλο	sinos13	
905	<i>A. adrianae</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Ξενόπουλο	sinos13	

906	<i>A. turrita</i>	Κυκλάδες - Κέα - Καστριανή	sinos42	
907	<i>A. turrita</i>	Κυκλάδες - Κέα - Καστριανή	sinos42	
908	<i>A. turrita</i>	Κυκλάδες - Κέα - Καστριανή	sinos42	
909+	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	sinos28	2016
910	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	sinos28	
911+	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	sinos28	2016
912	<i>A. broemmei</i>	Πελοπόννησος - Αχαΐα - Χιονοδρομικό Χελμού	486	
913	<i>A. butoti</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Κοσμάς	sinos8	
914	<i>A. butoti</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Κοσμάς	sinos8	
915+	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα -	sinos51	2016
916	<i>A. cerigottana</i>	Αντικύθηρα -	sinos51	
917+	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Αρχαίο λατομείο	sinos32	2016
918	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Αρχαίο λατομείο	sinos32	
919	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Αρχαίο λατομείο	sinos33	
920	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος	21373	2016
921	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος	21373	
922	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Οροπέδιο Άρη	21371	
923	<i>A. cristatella</i>	Σποράδες - Σκύρος - Οροπέδιο Άρη	21371	
924+	<i>A. discolor</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αρκαδικό Χωριό	sinos23	2016
925	<i>A. discolor</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αρκαδικό Χωριό	sinos23	
926+	<i>A. discolor</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αρκαδικό Χωριό	sinos23	2016
927	<i>A. discolor</i>	Στερεά Ελλάδα - Αίγινα	sinos43	
928	<i>A. discolor</i>	Στερεά Ελλάδα - Αίγινα	sinos43	
929	<i>A. discolor</i>	Κύθηρα - Άγιος Ηλίας	21386	
930*	<i>A. discolor</i>	Κύθηρα - Άγιος Ηλίας	21386	2016
931	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Γερολιμένας	sinos1	
932	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Γερολιμένας	sinos1	2016
933	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Γερολιμένας	sinos1	
934	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Λάγια	sinos3	
935	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Λάγια	sinos3	
936	<i>A. gerolimena</i>	Πελοπόννησος - Μάνη - Λάγια	sinos3	
937	<i>A. Ierosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Αρχαία	sinos41	
938+	<i>A. Ierosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Αρχαία	sinos41	2016
939+	<i>A. Ierosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Αρχαία	sinos41	2016
940+	<i>A. Ierosiensis</i>	Δωδεκάνησα - Κάλυμνος - Παλιόνησος	3364	2016
941	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας	sinos26	
942	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας	sinos26	
943	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Μεγάλη Τούρλα	sinos55	
944	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Μεγάλη Τούρλα	sinos55	

945+	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αγ. Ηλίας	17210	2016
946	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αγ. Ηλίας	17210	
947	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	
948	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	
949	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	14476	
950	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	14476	
951+	<i>A. lycica</i>	Τουρκία - Demre - Basilica	sinos6	2016
952	<i>A. lycica</i>	Τουρκία - Demre - Basilica	sinos6	
953+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σύρος	sinos33	2016
954+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σύρος	sinos33	2016
955	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Λιβάδι	sinos35	
956+	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Λιβάδι	sinos35	2016
957	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Παναγία	sinos36	
958	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Φολέγανδρος - Καραβοστάσι	15561	
959+	<i>A. caerulea</i>	Χίος - Αγ. Πατέρες, πευκόδασος	7455	2016
960	<i>A. caerulea</i>	Σάμος - Βαλεοντάδες	20167	
961+	<i>A. caerulea</i>	Σάμος - Βαλεοντάδες	20167	2016
962+	<i>A. caerulea</i>	Σάμος - Βαλεοντάδες	20167	2016
963	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σαντορίνη - Προφήτης Ηλίας	11971	
964	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σαντορίνη - Προφήτης Ηλίας	11971	
965	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σαντορίνη - Προφήτης Ηλίας	11971	
966	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
967	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Γυάρος	15474	
968+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλαια - Καμινάκια	sinos37	2016
969	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλαια - Καμινάκια	sinos37	
970	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλαια	sinos38	2016
971	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Αστυπάλαια	sinos38	
972+	<i>A. brevicollis</i>	Κυκλάδες - Ανάφη - Χώρα	sinos39	2016
973	<i>A. brevicollis</i>	Κυκλάδες - Ανάφη - Χώρα	sinos39	
974+	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Λευκάδα - Ναός Απόλλωνα	sinos20	2016
975+	<i>A. senilis</i>	Ιόνιο - Λευκάδα - Ναός Απόλλωνα	sinos20	2016
976	<i>A. pontika</i>	Κρήτη - Χανιά - Ποντικονήσι	6869	
977	<i>A. pontika</i>	Κρήτη - Χανιά - Ποντικονήσι	6869	
978	<i>A. pontika</i>	Κρήτη - Χανιά - Ποντικονήσι	6869	
979	<i>A. puella</i>	Σάμος - Καλάμι	21231	
980	<i>A. puella</i>	Σάμος - Καλάμι	21231	
981	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	
982	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Παξιμάδα	14474	
983	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	14476	

984	<i>A. janisadana</i>	Κρήτη - Διονυσάδες - Γιανυσάδα	14476	
985+	<i>A. jonica</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Άσσοι	sinos14	2016
986	<i>A. jonica</i>	Ιόνιο - Κεφαλονιά - Άσσοι	sinos14	
987	<i>Idyla</i>	Σποράδες - Σκύρος - Ατσιτσα	sinos59	2016
988	<i>Idyla</i>	Σποράδες - Σκύρος - Ατσιτσα	sinos59	2016
989	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Κάστρο	sinos40	
990+	<i>A. brevicollis</i>	Δωδεκάνησα - Κως - Κάστρο	sinos40	2016
991	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Φαράγγι Δαφνών	sinos24	
992	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Φαράγγι Δαφνών	sinos25	
993*	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Ελώνης	16869	2016
994+	<i>A. edmundi</i>	Πελοπόννησος - Αρκαδία - Μονή Ελώνης	16869	2016
995	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	2016
996	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Άνδρος - Χαλκολιμνιώνας	14064	
997	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	2016
998	<i>A. caerulea</i>	Κυκλάδες - Σίκινος - Αλοπρόνοια	15564	2016
999	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αγ. Ηλίας	17210	
1000	<i>A. idyllica</i>	Πελοπόννησος - Πάρνωνας - Αγ. Ηλίας	17210	
1001	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Λακωνία - Βαμβακού	16097	
1002+	<i>A. grisea</i>	Πελοπόννησος - Λακωνία - Βαμβακού	16097	2016
1003	<i>A. compressa</i>	Κύθηρα - Αβλέμονας	21388	
1004	<i>A. compressa</i>	Κύθηρα - Αβλέμονας	21388	
1005	<i>A. puella</i>	Σάμος - Καλάμι	21231	2016
1006	<i>A. puella</i>	Σάμος - Καλάμι	21231	2016

Στον πίνακα παρουσιάζονται όλα τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

* τα άτομα που στα τελικά στάδια των αναλύσεων αφαιρέθηκαν από το σετ δεδομένων καθώς περιελάμβαναν μόνο απροσδιόριστες νουκλεοτιδικές βάσεις.

+ το σύμβολο "+" υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο δείγμα αναπαριστάται στο φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από τις αναλύσεις.

^α α/α που έχει αντιστοιχηθεί στα δείγματα στο Εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του ΜΦΙΚ.

^β κωδικός δειγματοληψίας του ΜΦΙΚ

^γ η χρονιά κατά την οποία εφαρμόστηκε στα δείγματα η Νέας Γενιάς Αλληλούχιση ddRADseq. Βλ κεφ. 2.2 για λεπτομέρειες.

Παράρτημα II

είδος	# ατόμων	μονοφυλία
<i>A. brevicollis</i>	15	όχι
<i>A. caerulea</i>	12	όχι
<i>A. cretensis</i>	9	όχι
<i>A. hippolity</i>	6	ναι
<i>A. teres</i>	5	όχι
<i>A. broemmei</i>	4	ναι
<i>A. contaminata</i>	4	ναι
<i>A. lerosiensis</i>	4	ναι
<i>A. li</i>	4	ναι
<i>A. praeclara</i>	4	όχι
<i>A. senilis</i>	4	όχι
<i>A. amalthea</i>	3	όχι
<i>A. anatolica</i>	3	ναι
<i>A. christae</i>	3	ναι
<i>A. corrugata</i>	3	όχι
<i>A. grisea</i>	3	όχι
<i>A. idaea</i>	3	ναι
<i>A. jaeckeli</i>	3	ναι
<i>A. maculosa</i>	3	ναι
<i>A. maltzani</i>	3	ναι
<i>A. manselli</i>	3	ναι
<i>A. olivieri</i>	3	ναι
<i>A. proteus</i>	3	ναι
<i>A. puella</i>	3	ναι
<i>A. retusa</i>	3	ναι
<i>A. scopulosa</i>	3	ναι
<i>A. solicola</i>	3	όχι
<i>A. sublamelosa</i>	3	ναι
<i>A. terebra</i>	3	όχι
<i>A. torticollis</i>	3	ναι
<i>A. turrita</i>	3	ναι

<i>A. adrianae</i>	2	ναι
<i>A. arthuriana</i>	2	ναι
<i>A. cristatella</i>	2	ναι
<i>A. discolor</i>	2	ναι
<i>A. eburnea</i>	2	ναι
<i>A. grayana</i>	2	ναι
<i>A. hians</i>	2	ναι
<i>A. janicollis</i>	2	ναι
<i>A. jonica</i>	2	ναι
<i>A. krueperi</i>	2	ναι
<i>A. linnei</i>	2	ναι
<i>A. lycica</i>	2	ναι
<i>A. menelaus</i>	2	ναι
<i>A. nivea</i>	2	ναι
<i>A. rebeli</i>	2	ναι
<i>A. spratti</i>	2	ναι
<i>A. sturanyi</i>	2	ναι
<i>A. tenuicostata</i>	2	ναι
<i>A. violacea</i>	2	όχι
<i>A. voithii</i>	2	ναι
<i>A. olivieri</i>	2	ναι
<i>A. argynnis</i>	1	-
<i>A. butoti</i>	1	-
<i>A. candida</i>	1	-
<i>A. edmundi</i>	1	-
<i>A. gerolimena</i>	1	-
<i>A. idyllica</i>	1	-
<i>A. ithomensis</i>	1	-
<i>A. janisadana</i>	1	-
<i>A. moreletiana</i>	1	-
<i>A. sphakiota</i>	1	-

Στον πίνακα φαίνονται τα 64 ονόματα ειδών που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτή την εργασία, ο αριθμός ατόμων που αντιπροσωπεύουν καθώς και το αν είναι ή όχι μονοφυλετικά με βάση το δέντρο που προέκυψε από τις φυλογενετικές αναλύσεις.