

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA “L. Pardi”

**DOTTORATO DI RICERCA IN ETOLOGIA ED
ECOLOGIA ANIMALE
(XXIV CICLO, BIO 05, BIO 07)**

**Tecniche di genetica molecolare e
morfometriche applicate a problematiche
tassonomiche e filogenetiche**

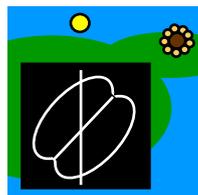
Tesi di

Francesca Zinetti

Coordinatore Prof. Alberto Ugolini

Tutor Dr. Claudio Ciofi

(2012)



INDICE

	RIASSUNTO	pag.	2
1.	INTRODUZIONE	pag.	3
1.1.	La tassonomia integrata	pag.	3
1.2.	Scopo della ricerca	pag.	7
2.	ANALISI MOLECOLARI SU CAMPIONI MUSEALI	pag.	16
2.1.	Importanza dei campioni museali	pag.	16
2.2.	Degradazione e danni al DNA	pag.	16
2.3.	Tecniche da applicare a campioni con DNA degradato	pag.	18
2.4.	Linee guida per analisi molecolari su campioni museali	pag.	19
3.	1° CASO DI STUDIO: Revisione sistematica e ricostruzione filogenetica di alcune specie del genere <i>Duvalius</i> (Coleoptera, Carabidae) su base morfometrica e molecolare	pag.	25
4.	2° CASO DI STUDIO: Valutazione della distinzione specifica e analisi della zona di contatto tra le due entità criptiche recentemente distinte su base morfologica <i>Zerynthia polyxena</i> e <i>Z. cassandra</i>	pag.	52
5.	CONCLUSIONI	pag.	84

RIASSUNTO

L'integrazione tra tecniche di biologia molecolare e morfometria geometrica rappresenta un valido strumento per la risoluzione di problematiche tassonomiche e filogenetiche. Questo approccio integrato è stato applicato, in particolare, a due casi di studio. Nel primo, l'analisi di sequenze del gene mitocondriale citocromo c ossidasi subunità II (COII) e l'analisi morfometrica di quattro strutture morfologiche sono state combinate per esaminare il controverso *status* tassonomico di quattro specie (e varie sottospecie) di coleotteri ipogei del genere *Duvalius* (Coleoptera, Trechinae), utilizzando principalmente campioni museali raccolti in Italia centrale. Da un lato, l'analisi filogenetica ha evidenziato due linee monofiletiche ben supportate e un certo numero di cladi, con differenze genetiche relativamente basse, suggerendo tempi di divergenza brevi, in linea con la storia geologica dell'area di studio. Dall'altro lato, le analisi di morfometria geometrica hanno riscontrato un alto livello di differenziazione tra i campioni. I due tipi di analisi hanno dato risultati concordanti a livello specifico e non hanno confermato interamente il precedente assetto sistematico, suggerendo possibili riarrangiamenti e la definizione di unità evolutive significative. Il secondo caso ha riguardato due specie di lepidotteri recentemente divise in base alla diversa morfologia dei genitali: *Zerynthia polyxena* e *Z. cassandra*. È stato esaminato il livello di divergenza tra 21 popolazioni distribuite dalla Sicilia alla Francia usando tre marcatori genetici (i geni mitocondriali COI e ND1 e il gene nucleare wingless) ed è stata applicata la morfometria geometrica ai genitali. Inoltre, sono stati utilizzati modelli di distribuzione delle specie per valutare le diverse esigenze climatiche di *Zerynthia polyxena* e *Z. cassandra*. I dati climatici sono stati poi proiettati nello scenario dell'Ultimo Massimo Glaciale per verificare se e in che misura i cicli glaciali possano aver contribuito al processo di speciazione. Le analisi genetiche e morfometriche hanno identificato due gruppi ben distinti. Tutti i campioni hanno mostrato uno schema di diversificazione concordante per tutti i marcatori usati, senza nessun segno di introgressione, compresi gli individui campionati nell'area di contatto. La distribuzione degli aplotipi e i modelli climatici hanno mostrato che durante l'Ultimo Massimo Glaciale entrambe le specie hanno subito una forte contrazione degli areali e presumibilmente sono rimaste separate in diversi micro-rifugi. La separazione potrebbe essere stata facilitata dalla ridotta capacità di dispersione e dall'alta filopatria, mentre la diversificazione dei genitali ha probabilmente favorito l'assenza di ibridazione.

1. INTRODUZIONE

1.1 La tassonomia integrata

La tassonomia è la disciplina scientifica che esplora, interpreta, caratterizza la biodiversità, dà un nome agli esseri viventi e li organizza; intesa in senso più ampio, anche come sistematica, non solo classifica le specie e permette la loro identificazione, ma costituisce la base per formulare ipotesi e previsioni su molti aspetti della biodiversità. La tassonomia quindi non deve essere vista come una disciplina fine a se stessa, ma come una componente fondamentale per altre discipline riguardanti la biodiversità, come la biogeografia, la biologia evolutiva, l'ecologia, la biologia della conservazione (Dayrat, 2005; Ebach et al., 2011).

Uno dei prodotti principali della tassonomia è un sistema stabile di classificazione e nomenclatura, senza il quale sarebbe impossibile la comunicazione tra discipline; tale sistema non è importante solo in ambito strettamente scientifico, ma fornisce la base anche per molti campi applicati. Per esempio, gioca un ruolo fondamentale in settori come l'agricoltura e l'acquacoltura, attraverso l'identificazione di potenziali vettori di malattie e l'individuazione di specie invasive (Ebach et al., 2011).

La mancanza di accuratezza nei processi tassonomici può quindi avere effetti negativi sulla valutazione dello stato della biodiversità, l'individuazione di specie aliene e su progetti di controllo e conservazione (Mallet & Willmot, 2003; Wilson, 2003; Mace, 2004; Dayrat, 2005).

La tassonomia è una scienza principalmente fenotipica, che considera soprattutto caratteri morfologici. Infatti, senza un'accurata conoscenza della morfologia di una specie, è impossibile descriverla, identificarla e comunicare quelle componenti fenotipiche che per prime interagiscono con l'ambiente (sia l'ambiente fisico, sia gli altri organismi). La tassonomia si è quindi sempre basata sull'analisi dei caratteri morfologici, allo scopo di fornire descrizioni e nomi per le specie e proporre classificazioni (Ebach et al., 2011).

Tuttavia, l'utilizzo di questo tipo di caratteri in molti casi risulta insufficiente, soprattutto quando si tratta di specie strettamente imparentate e morfologicamente troppo simili da permettere una chiara distinzione, o nel caso in cui i caratteri morfologici presi in considerazione siano molto variabili all'interno della specie, tanto da superare la variabilità inter-specifica (Schwentner et al., 2011).

Per questi motivi, diversi autori hanno sottolineato la necessità di applicare nuovi approcci per modernizzare la disciplina della tassonomia (Godfray, 2002; Janzen, 2004) e i metodi basati sul DNA sembravano avere le potenzialità per permettere un salto di qualità e rendere più veloci e precise le procedure.

L'utilizzo di dati molecolari in ambito tassonomico risale a oltre 30 anni fa, con lo sviluppo di sonde per l'RNA ribosomiale usate per l'identificazione e

filogenesi di eubatteri e archeobatteri (Fox et al., 1980). Da allora, marcatori molecolari sono stati ampiamente usati per la separazione e identificazione di specie ed è stato sviluppato il concetto di “tassonomia molecolare”, usato una delle prime volte da Scherer & Sontag (1986).

L'utilizzo di marcatori molecolari in questo ambito ha visto un rapido incremento negli ultimi dieci anni, con l'avvento del DNA barcoding e la proposta di costruire banche dati di sequenze rappresentative della maggior parte delle specie viventi (Hebert et al., 2003a; Tautz et al., 2003).

Questa applicazione a larga scala di dati molecolari è sembrata destinata a rivoluzionare la tassonomia (Savolainen et al., 2005), ma ha anche aperto un forte dibattito sulla validità della sistematica molecolare. Infatti, secondo vari autori, questo approccio può condurre a risultati non attendibili se vengono trascurate altre tipologie di dati (Moritz & Cicero, 2004; Wheeler, 2004; Will & Rubinoff, 2004; DeSalle et al., 2005; Page et al., 2005; Will et al., 2005).

Innanzitutto è necessario fare una distinzione tra tassonomia molecolare e DNA barcoding. Mentre la prima riguarda direttamente la circoscrizione e caratterizzazione delle specie utilizzando concetti evolutivi, il secondo è un mezzo per identificare campioni attraverso il confronto con sequenze note per le varie specie (Vogler & Monaghan, 2006).

L'utilizzo del DNA barcoding per identificare le specie è stato introdotto da Hebert et al., (2003a, 2003b). Questo approccio si basa sulla possibilità di assegnare campioni non identificati a specie conosciute confrontando un tratto di DNA, più comunemente circa 650 basi del gene mitocondriale citocromo ossidasi sub unità I (COI). Si basa sull'assunzione che per questo marcatore la distanza genetica intra-specifica sia molto più bassa rispetto a quella inter-specifica (Hebert et al., 2003b). Tuttavia, questo metodo non sempre risulta così semplice ed efficace. Uno dei suoi limiti risiede nella necessità di avere alla base una banca dati di sequenze di riferimento il più completa possibile (Moritz & Cicero, 2004; Will & Rubinoff, 2004). Inoltre, in molti gruppi la differenza tra variabilità intra- e inter-specifica non è così marcata (Avice, 2000); per risolvere questo problema è stato proposto un valore limite di divergenza intraspecifica, ma la calibrazione di questo “barcoding gap” risulta problematica (Meyer & Paulay, 2005). Una stessa soglia fissa infatti non può andar bene sia per specie di vecchia formazione, che presentano elevate distanze genetiche intra-specifiche, sia per recenti eventi di speciazione, caratterizzati da basse divergenze intra-specifiche (Meier et al., 2006).

Quindi, il DNA barcoding risulta un mezzo nuovo e veloce per l'attribuzione di un esemplare sconosciuto ad una specie, soprattutto quando si tratta di campioni non completi o stadi giovanili difficili da determinare con altri metodi; riguarda un aspetto della tassonomia, ma non può costituire esso stesso un sistema tassonomico completo (Vogler & Monaghan, 2006).

Con queste opportune precisazioni, i dati molecolari possono comunque risultare estremamente utili in campo tassonomico, per esempio nel caso di taxa criptici, quando i caratteri morfologici non sono sufficienti a chiarire il loro

status. I dati molecolari possono infatti fornire molte informazioni aggiuntive, soprattutto grazie all'utilizzo di diversi marcatori. Negli studi a livello di specie i geni mitocondriali risultano particolarmente utili, perché evolvono rapidamente, sono ereditati quasi esclusivamente per via materna, sono soggetti limitatamente alla ricombinazione e sono più resistenti ai fenomeni degradativi (Avice et al, 1987; Roe & Sperling, 2007).

Inoltre, andando oltre la tassonomia in senso stretto e entrando nel campo della sistematica e filogenesi, i dati molecolari risultano particolarmente importanti per la ricostruzione dei possibili rapporti evolutivi tra taxa.

La filogenesi molecolare presenta infatti dei vantaggi rispetto a quella basata sui caratteri morfologici (Brown, 2002; Kumar & Filipowski, 2008):

- ciascun sito in un set di sequenze omologhe può essere considerato come un diverso carattere con 4 diversi stati possibili (le 4 basi nucleotidiche);
- lo stato dei caratteri risulta quindi inequivocabile, mentre la valutazione dello stato dei caratteri morfologici è influenzata da interpretazioni soggettive;
- i dati molecolari possono essere facilmente convertiti in forma numerica e sottoposti ad analisi matematiche e statistiche;
- lo stesso set di stati (4 differenti basi) dei caratteri può essere utilizzato per tutti gli organismi, permettendo confronti a molti livelli, anche tra taxa distanti tra loro;
- la quantità di dati disponibili è enorme, in quanto una singola sequenza fornisce informazioni su molti caratteri.

Negli ultimi anni, questo forte dibattito tra sostenitori della tassonomia classica e di quella molecolare ha condotto la maggior parte dei sostenitori dell'uno e dell'altro metodo a considerare invece la necessità di un approccio integrato, che non si concentri su un singolo tipo di caratteri, ma ne consideri una vasta gamma. È nata così la tassonomia integrata, come quella disciplina che ha lo scopo di delimitare e caratterizzare le unità che costituiscono la biodiversità partendo da prospettive diverse e complementari, che includono dati morfologici, molecolari, filogeografici, etologici, ecologici, ecc. (Sites & Marshall, 2003; Dayrat, 2005; Will et al., 2005; Padial., 2010; Schlick-Steiner et al., 2010)

Questo approccio integrato dovrebbe includere in primo luogo dati morfologici e genetici. Da un lato, i caratteri morfologici infatti forniscono informazioni sul fenotipo degli organismi, possono essere molto utili per descrivere e riconoscere le specie con metodi accessibili e meno costosi; inoltre permettono di ottenere dati comparabili con la tassonomia classica (Schlick-Steiner et al., 2010).

Dall'altro lato, i caratteri molecolari possono risultare particolarmente efficaci per classificare le specie e ricostruire i loro rapporti filogenetici. Inoltre, la collaborazione tra sistematica morfologica e molecolare può portare a risultati che vanno oltre l'utilità dei singoli metodi, permettendo di approfondire l'indagine sui processi evolutivi (Schilck-Steiner et al., 2010).

Numerosi studi hanno dimostrato la necessità e validità dell'integrazione tra questi due metodi (Fischer et al., 2008; Cardoso et al., 2009; Dinca et al., 2011a, b).

I caratteri morfologici rimangono comunque di primaria importanza in tassonomia, anche nell'ottica di un approccio di tipo integrato; è però necessario migliorare i metodi di acquisizione e analisi dei dati, per rendere i risultati più attendibili (Schilck-Steiner et al., 2010). Infatti, ancora oggi, la maggior parte degli studi tassonomici e la descrizione di nuove specie viene fatta in base ad una valutazione soggettiva di differenze o similarità tra caratteri morfologici.

Questo metodo può scatenare accesi dibattiti tra specialisti, soprattutto quando le differenze da valutare sono minime. Le difficoltà aumentano nel caso in cui nuove specie vengono descritte come risultato di un riarrangiamento di un gruppo di specie già conosciute; spesso vecchie specie vengono divise in due o più specie morfologicamente simili, dando luogo a nuove specie per le quali non c'è accordo tra i diversi specialisti (Mutanen & Pretorius, 2007).

In quest'ottica, per ridurre la soggettività nell'analisi dei caratteri morfologici, negli anni '60-'70 è stata introdotta l'applicazione della statistica multivariata. Questo approccio, oggi chiamato "morfometria tradizionale" (Marcus, 1990), consiste nell'applicazione di analisi statistiche a insiemi di variabili morfologiche, generalmente misure di distanze lineari e, a volte, rapporti tra distanze e angoli (Adams et al., 2004).

Alla fine degli anni '80 è stato poi introdotto un ulteriore approccio: la morfometria geometrica. Questo metodo utilizza set di coordinate bi- o tri-dimensionali per indicare punti riconoscibili (*landmarks*) sulle strutture morfologiche in esame. Queste coordinate non vengono utilizzate direttamente come variabili, ma vengono prima rimosse le variazioni dovute alla posizione, orientamento e scala degli individui; in questo modo si ottengono variabili che contengono informazioni solo sulla forma (*shape variables*) delle strutture morfologiche e possono essere utilizzate per confrontare statisticamente i campioni. La morfometria geometrica permette inoltre la visualizzazione grafica delle variazioni di forma attraverso griglie di deformazione (*thin-plate spline deformation grids*); queste forniscono una chiara indicazione su quali *landmarks* rimangono costanti tra i campioni e quali sono invece maggiormente responsabili delle variazioni di forma (Adams et al., 2004).

Negli ultimi anni la morfometria geometrica è stata applicata in misura sempre crescente in ricerche tassonomiche e sistematiche, fornendo informazioni aggiuntive sulla forma di particolari strutture morfologiche e permettendo di distinguere in modo più oggettivo taxa di difficile interpretazione (Mutanen & Pretorius, 2007).

L'integrazione tra metodi diversi apre la strada a indagini più accurate, ma non è priva di difficoltà. Infatti, nel caso diverse discipline vengano applicate per risolvere lo stesso problema tassonomico, i risultati possono mostrare consenso totale o parziale, oppure essere completamente in contrasto. I contrasti possono essere a vari livelli; ad esempio, i risultati delle diverse discipline possono essere in disaccordo sul numero di specie individuate oppure sull'attribuzione di campioni ad una specie o ad un'altra. In questi casi l'analisi del problema diventa più complessa, ma può condurre anche a ipotesi particolarmente interessanti, in quanto comporta, attraverso un'analisi più approfondita, la ricerca di ipotesi evolutive che spieghino il disaccordo tra le diverse discipline (Page et al., 2005; Steiner et al., 2006; Seifert, 2009; Schlick-Steiner et al., 2010). Il grande numero di casi di risultati discordanti in studi di questo tipo suggerisce, da un lato, che modelli evolutivi insoliti e processi particolari che modellano le specie possano essere più comuni di quanto si pensi, dall'altro lato, conferma la necessità di affrontare le questioni sotto vari punti di vista, in quanto l'uso di una singola disciplina potrebbe condurre a errori di valutazione (Schlick-Steiner et al., 2010).

La tassonomia integrata permette quindi di analizzare problematiche più complesse, ma richiede l'utilizzo di nuove tecniche e la collaborazione tra varie discipline. Questa potrebbe essere la strada per permettere alla tassonomia di uscire dalla crisi degli ultimi anni e riacquistare un ruolo centrale nello studio della biodiversità (Dayrat, 2005; Padial et al., 2010).

1.2 Scopo della ricerca

La ricerca svolta durante il mio dottorato ha avuto come tema centrale l'integrazione di tecniche di genetica molecolare e morfometria geometrica per la risoluzione di problematiche tassonomiche e la ricostruzione dei rapporti filogenetici in alcuni gruppi di insetti.

Ho applicato un approccio integrato e multidisciplinare a due casi di studio; la scelta è ricaduta su due gruppi di taxa particolarmente interessanti non solo per le problematiche tassonomiche che presentano, ma anche perché possono costituire modelli rappresentativi di tematiche più ampie, come i processi di speciazione e la conservazione degli habitat.

I due casi di studio differiscono sotto vari punti di vista: per le caratteristiche delle specie, le problematiche tassonomiche e le metodologie di laboratorio utilizzate.

Il primo caso di studio ha riguardato un gruppo di specie di Coleotteri Carabidi appartenenti al genere *Duvalius* Delarouzée, 1859. I *Duvalius* fanno parte della sottofamiglia Trechinae, che sono di gran lunga i Carabidi più rappresentati nell'ambiente sotterraneo (Casale et al., 1998). Secondo Moravec et al. (2003), sono assegnate al genere *Duvalius* oltre 300 specie.

Questo genere ha un'ampia distribuzione paleartica: dall'Europa occidentale (Cataluña e Isole Baleari) si spinge infatti all'Africa nord-occidentale (Algeria) e, attraverso l'Europa meridionale, centro-orientale e orientale, fino al Kyrgistan, all'Afghanistan, al Pakistan e alla Cina nord-occidentale (Xinjiang). Hot-spot di biodiversità risulta in particolare l'area compresa fra l'Europa meridionale e quella centro-orientale.

I *Duvalius* abitano tipicamente l'ambiente cavernicolo, il “*milieu souterrain superficiel*” (MSS) (Juberthie, 1983, 1984; Giachino & Vailati, 2010) e l'ambiente perinivale; mostrano infatti più o meno evidenti adattamenti per la vita nell'ambiente ipogeo: allungamento delle appendici, depigmentazione, degenerazione degli occhi, macrocefalia, restringimento del torace, allargamento delle elitre, ecc (Vandel, 1964; Culver et al., 1990; Casale et al., 1998; Faille et al., 2011).

In Italia il genere *Duvalius* è rappresentato da poco meno di 80 specie, distribuite dall'arco alpino a tutta la penisola appenninica, oltre che in Sardegna e in Sicilia. La Toscana è particolarmente ricca di specie, con 23 taxa (12 specie, 21 sottospecie) finora descritti (Magrini 1997, 1998). In questa regione, i *Duvalius* sono distribuiti sulle Alpi Apuane e sulla catena appenninica e aree attigue, mentre risultano assenti nella parte centrale e meridionale, a sud del corso del Fiume Arno (Vanni, 1988; Vanni & Magrini, 1993).

L'intero genere *Duvalius*, per la rarità, la localizzazione puntiforme e la vulnerabilità di molte delle sue specie è tutelato dalla Legge Regionale Toscana n. 56/2000 “Norme per la conservazione e la tutela degli habitat naturali e seminaturali, della flora e della fauna selvatiche” e dalla Legge della Regione Emilia-Romagna n. 15/2006 “Disposizioni per la tutela della fauna minore in Emilia-Romagna”.

Secondo Magrini (1997), le specie toscane possono essere divise in 6 gruppi: *doriai*, *guareschii*, *bianchii*, *andreinii*, *vallombrosus* e *brucki*. Fra questi, il gruppo *andreinii* è quello più ricco di taxa, che presenta la più vasta distribuzione geografica e le maggiori problematiche a livello micro-sistematico. Per questi motivi ho incentrato la mia ricerca su questo gruppo.

Sulla base di caratteri morfologici, al gruppo *andreinii* sono attualmente ascritte quattro diverse specie (con diverse sottospecie): *Duvalius andreinii* (Gestro, 1907), *D. minozzii* (Doderò, 1917), *D. jureceki* (Doderò, 1917) e *D. apuanus* (Doderò, 1917).

Fino ad oggi, la descrizione di nuove specie e la ricostruzione delle relazioni tra esse si è basata solo sulla valutazione soggettiva di caratteri morfologici (Jeannel, 1928; Casale & Laneyrie, 1982). Tuttavia, dato che molti di questi caratteri presentano differenze minime, la tassonomia di gran parte del genere, e in particolare del gruppo *andreinii*, è stata oggetto di numerosi cambiamenti e diverse interpretazioni.

Alcuni di questi taxa, nella loro descrizione originale, erano stati riferiti a generi diversi da *Duvalius*. Ad esempio, *andreinii* (Gestro, 1907) era stata inizialmente descritta come specie appartenente al genere *Anophthalmus*;

apuanus (Doderò, 1917) e *jureceki* (Doderò, 1917) erano state attribuite a *Trechus* (*Duvalius*); *intermedius* (Rasetti & Rasetti, 1921) a *Duvalites* in qualità di sottospecie di *jureceki*. Vi è inoltre da rilevare che gran parte delle sottospecie ora riferite a *Duvalius minozzii* erano state originariamente descritte come specie a se stanti, soprattutto in base all'isolamento geografico delle rispettive popolazioni e ad alcune differenze nella morfologia esterna, che invece Magrini (1997) non reputa sufficienti per considerare tali popolazioni distinte a livello specifico. Infine, tre delle quattro sottospecie ora riferite a *D. apuanus* [*rasettii* (Doderò, 1917), *intermedius* (Rasetti & Rasetti 1921) e *lanzai* (Straneo 1943)] nella loro descrizione originale erano state attribuite a *D. jureceki*.

Queste difficoltà evidenziano che i caratteri morfologici finora utilizzati sono difficili da interpretare, mostrando spesso differenze minime; ho applicato quindi innanzitutto un'analisi di morfometria geometrica, allo scopo di fare una valutazione più oggettiva e vedere se effettivamente i vari taxa finora descritti presentano caratteri che permettono di distinguerli. L'analisi è stata condotta a partire da esemplari provenienti da 21 siti, per verificare il livello di caratterizzazione e riconoscibilità delle singole popolazioni e valutare il loro contributo alla biodiversità della fauna ipogea.

I dati morfometrici sono stati integrati con l'analisi molecolare di un tratto del gene mitocondriale citocromo c ossidasi, sub unità II (COII), allo scopo di confrontare i risultati ed effettuare una prima ricostruzione filogenetica tra i membri di questo gruppo. Finora infatti non erano state condotte analisi molecolari specifiche su questo genere, probabilmente per la difficoltà di reperire campioni freschi o in buono stato di conservazione.

Riassumendo, gli scopi di questa prima parte della mia ricerca sono stati:

- ✓ riesaminare, attraverso l'integrazione di analisi morfometriche e molecolari, l'attuale stato tassonomico dei *Duvalius* del gruppo *andreinii*, verificando se i taxa finora descritti presentano davvero caratteri che permettono oggettivamente di distinguerli;
- ✓ valutare i possibili rapporti filogenetici tra i taxa appartenenti a questo gruppo;
- ✓ valutare l'esistenza di unità evolutive significative e il loro possibile contributo alla biodiversità generale di questo gruppo animale.

Il secondo caso di studio ha riguardato due specie criptiche di Lepidotteri Papilionidi recentemente distinte su base morfologica: *Zerynthia polyxena* (Denis & Schiffermüller, 1775) e *Z. cassandra* (Geyer, 1828).

Z. polyxena è strettamente monofaga e quindi legata ai micro-habitat dove cresce la pianta nutrice delle larve (*Aristolochia* spp.); ha una bassa capacità di dispersione ed è inusuale trovare individui erratici. È specie termofila e raramente si ritrovano popolazioni ad altitudini superiori ai 900 m

slm. Presenta un'unica generazione l'anno, con periodo di volo molto breve, limitato ad alcune settimane, da metà marzo a metà maggio a seconda della latitudine e altitudine. Dato che la pianta nutrice in molte regioni ha una distribuzione localizzata, la specie è generalmente presente con piccole popolazioni isolate e vulnerabili (Verity, 1947; Higgins & Riley, 1983; Tolman & Lewington, 1997). Per questo motivo è protetta a livello di Comunità Europea e inserita nell'allegato IV della Direttiva Habitat 92/43 EEC. In Toscana è protetta anche a livello regionale, in quanto inserita nell'allegato A della LR Toscana 56/2000.

Z. polyxena è stata a lungo considerata come un'unica specie con ampia distribuzione che va dal sud della Francia, attraverso l'Europa Centro-meridionale e i Balcani fino alla Russia e Asia Minore. In base alla variabilità dei disegni alari, erano state descritte una dozzina di sottospecie e forme.

Dapporto (2010) invece, attraverso l'applicazione di tecniche di morfometria geometrica ai genitali maschili di questa specie, ha riscontrato la presenza di due morfotipi ben distinti all'interno dell'areale. La netta separazione delle due linee è ulteriormente confermata dalla presenza di individui chiaramente ascrivibili a entrambi i morfotipi in una località (Liguria, Monte Beigua) e dall'assenza di individui con forme intermedie dei genitali, anche nell'area di simpatria. Secondo Dapporto (2010) quindi non si tratterebbe di un'unica specie, ma di due specie distinte: *Z. cassandra* presente in Italia a sud del Fiume Po e *Z. polyxena* presente in tutto il resto dell'areale.

L'ipotesi della presenza di due specie separate di *Zerynthia* in Europa era già stata sollevata da due precedenti lavori (Coutsis, 1989; Nazari & Sperling, 2007), il primo su base morfologica e il secondo su base molecolare. In entrambi i casi si trattava però di analisi effettuate su un numero molto esiguo di campioni provenienti da pochissime località e si evidenziava l'esigenza di un'analisi comparata e più approfondita, soprattutto nell'area di contatto tra i due taxa (Dapporto, 2010).

Partendo da questi presupposti, durante la mia ricerca di dottorato ho integrato dati morfometrici e molecolari allo scopo di:

- ✓ verificare la separazione delle due specie anche a livello molecolare;
- ✓ valutare l'eventuale presenza di fenomeni di introgressione (tramite l'analisi di marcatori mitocondriali e nucleari);
- ✓ verificare la congruenza tra marcatori morfologici e molecolari, soprattutto nella zona di contatto;
- ✓ valutare se le due specie sono sottoposte nelle loro aree di diffusione a condizioni climatiche diverse che possono spiegare la loro distribuzione e la loro storia evolutiva.

Quest'ultima fase della ricerca ha visto l'applicazione di modelli di distribuzione delle specie, permettendo di valutare altri aspetti oltre a quelli strettamente tassonomici.

Nel caso di *Duvalius*, le analisi sono state condotte principalmente su campioni museali, per limitare problemi logistici e conservazionistici. Si tratta infatti di specie piuttosto rare, protette e che vivono in ambienti difficili da raggiungere. La scelta di lavorare su campioni museali ha comportato un cospicuo lavoro per approntare i protocolli di laboratorio più adatti e efficaci per lavorare su campioni degradati (cap. 2 e 3 per dettagli). È stata poi rivolta particolare attenzione all'analisi morfometrica, che è stata applicata ad un elevato numero di campioni e a ben 4 strutture morfologiche.

Nel caso di *Zerynthia* invece, non è stato necessario applicare particolari protocolli per le analisi molecolari, in quanto avevamo a disposizione campioni freschi o comunque recentemente raccolti e conservati in etanolo al 96%; la qualità dei campioni ha quindi permesso di estendere l'analisi molecolare ad un maggior numero di marcatori. È stata data poi particolare rilevanza all'applicazione dei modelli di distribuzione delle specie.

Bibliografia

- Adams, D.C., Slice, D.E. & Rohlf, F.J.** 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology*, **71**, 5-16.
- Avise, J.C.** 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders N.C.** 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.
- Brown, T.A.** 2002. Molecular Phylogenetics. In: *Genomes. 2nd edition* (Ed. by T.A. Brown). Wiley-Liss, Oxford.
- Cardoso, A., Serrano, A. & Vogler, A.P.** 2009. Morphological and molecular variation in tiger beetles of the *Cicindela hybrida* complex: is an ‘integrative taxonomy’ possible? *Molecular Ecology*, **18**, 648-664.
- Casale, A. & Laneyrie, R.** 1982. Trechodinae et Trechinae du monde. Tableau des sous-familles, tribus, series phylétiques, genres, et catalogue général des espèces. *Mémoires de Biospéologie*, **9**, 1-226.
- Casale, A., Vigna Taglianti, A. & Juberthie, C.** 1998. Coleoptera Carabidae. In: *Encyclopedia Biospeologica, tome II* (Ed. by C. Juberthie & V. Decu) pp. 1047-1081. Société Internationale de Biospéologie. Moulis, Francia.
- Coutsis, J.G.** 1989. Valval variation in *Zerynthia polyxena* (Denis and Schiffermüller) (Lepidoptera; Papilionidae). *Entomologists' Gazette*, **40**, 281-282.

- Culver, D.C., Kane, T.C., Fong, D.W., Jones, R., Taylor, M.A. & Sauereisen, S.C.** 1990. Morphology of cave organisms - is it adaptative? *Mémoires de Biospéologie*, **17**, 13-26.
- Dapporto, L.** 2010. Speciation in Mediterranean refugia and post-glacial expansion of *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera, Papilionidae). *Journal of zoological systematics and evolutionary research*, **48**, 229-237.
- Dayrat, B.** 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean Society*, **85**, 407-415.
- DeSalle, R., Egan, M.G. & Siddall, M.** 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1905-16.
- Dincă, V., Dapporto, L. & Vila, R.** 2011a. A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus icarus* and *Polyommatus celina* Common Blue butterflies. *Molecular Ecology*, **20**, 3921-3935.
- Dincă, V., Lukhtanov, V.A., Talavera, G., Vila, R.** 2011b. Unexpected layers of cryptic diversity in wood white *Leptidea* butterflies. *Nature Communications*, **2**, 324.
- Ebach, M.C., Valdecasas, A.G. & Wheeler, Q.D.** 2011. Impediments to taxonomy and users of taxonomy: accessibility and impact evaluation. *Cladistics*, **27**, 550-557.
- Faille, A., Ribera, I., Deharveng, L., Bourdeau, C., Garnery, L., Quéinnec, E. & Deuve, T.** 2010. A molecular phylogeny shows the single origin of the Pyrenean subterranean Trechini ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 97-106.
- Fisher, B.L. & Smith, M.A.** 2008. A Revision of Malagasy Species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS ONE*, **3**, e1787.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. & Woese, C.R.** 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*, **209**, 457-463.
- Giachino, P.M. & Vailati, D.** 2010. *The subterranean environment. Hypogean life, concepts and collecting techniques. L'ambiente sotterraneo. Vita ipogea, concetti e tecniche di raccolta.* WBA Handbooks. Verona.
- Godfray, H.C.J.** 2002. Challenges for taxonomy. *Nature*, **417**, 17-19.
- Hebert, P.D.N. & Gregory, T.R.** 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, **54**, 852-859.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R.** 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, **270**, 313-321.

- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & DeWaard, J.R.** 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, **270** (Suppl.), S96-99.
- Higgins, L.G. & Riley, N.D.** 1983. *A Field Guide to the Butterflies of Britain and Europe*. Collins, London.
- Janzen, D.H.** 2004. Now is the time. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **359**, 731-732.
- Jeannel, R.** 1928. Monographie des Trechinae. Morphologie comparée et distribution d'un groupe de Coléoptères. Troisième Livraison: les Trechini cavernicoles. *L'Abeille*, **35**, 1-808.
- Juberthie, C.** 1983. Le milieu souterrain: étendue et composition. *Mémoires de Biospéologie*, **10**, 17-65.
- Juberthie, C.** 1984. La colonisation du milieu souterrain: théories et méthodes, relations avec la spéciation et l'évolution souterrain. *Mémoires de Biospéologie*, **11**, 65-102.
- Kumar S. & Filipowski A.** 2008. Molecular Phylogeny.Reconstruction. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001523.pub2
- Mace, G.M.** 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **359**, 711-719.
- Magrini, P.** 1997. Les *Duvalius* et leur complexe évolutif. Espèces Françaises, Italiennes & Parasites. Troisième partie (Les espèces Italiennes). *Comptes-Rendus du Laboratoire d'Entomologie Faune Hypogée et Endogée*, **2**, 202-292.
- Magrini, P.** 1998. Les *Duvalius* et leur complexe évolutif. Atlas biogéographique. Deuxième partie (Les espèces Italiennes). *Comptes-Rendus du Laboratoire d'Entomologie Faune Hypogée et Endogée*, **3**, 55-150.
- Mallet, J. & Willmot, K.** 2003. Taxonomy: Renaissance or Tower of Babel? *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 57-59.
- Marcus, L.F.** 1990. Traditional morphometrics. In: *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop* (Ed. by F.J. Rohlf & F.L. Bookstein) pp. 77-122. Special Publication Number 2, University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P.K.L.** 2006. DNA barcoding and taxonomy in diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, **55**, 715-728.
- Meyer, C.P. & Paulay, G.** 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, **3**, 2229-2238.
- Moravec, P., Uéno, S.-I. & Belousov, I.A.** 2003. Tribe Trechini Bonelli, 1810. In: *Catalogue of Palaearctic Coleoptera.1. Archostemata-Myxophaga-Adephaga* (Ed. by I. Löbl & A. Smetana) pp 288-346, Apollo Books, Stenstrup.

- Moritz, C. & Cicero, C.** 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology*, **2**, 1529-1531.
- Mutanen, M. & Pretorius, E.** 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology*, **32**, 371-386.
- Nazari, V. & Sperling, F.A.H.** 2007. Mitochondrial DNA divergence and phylogeography in western Palearctic Parnassiinae (Lepidoptera: Papilionidae): how many species are there? *Insect systematics & evolution*, **38**, 121-138.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M.** 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, **7**, 16.
- Page, T.J., Choy, S.C. & Hughes, J.M.** 2005. The taxonomic feedback loop: symbiosis of morphology and molecules. *Biology Letters*, **1**, 139-142.
- Roe, A.D. & Sperling, F.A.H.** 2007. Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: an integrative approach. *Molecular Ecology*, **16**, 3617-3633.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G. & Lane, R.** 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1805-1811.
- Scherer, S. & Sontag, C.** 1986. Molecular taxonomy and evolution of the Anatidae. *Journal of zoological systematics and evolutionary research*, **24**, 1-19.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. & Crozier, R.H.** 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, **55**, 421-438.
- Schwentner, M., Timms, B.V. & Richter, S.** 2011. An integrative approach to species delineation incorporating different species concepts: a case study of *Limnadopsis* (Branchiopoda: Spinicaudata). *Biological Journal of the Linnean Society*, **104**, 575-599.
- Seifert, B.** 2009. Cryptic species in ants (Hymenoptera: Formicidae) revisited: We need a change in the alpha-taxonomic approach. *Myrmecological news*, **12**, 149-66.
- Sites, J.W. & Marshall, J.C.** 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 462-470.
- Steiner, F.M., Schlick-Steiner, B.C., Konrad, H., Moder, K., Christian, E., Seifert, B., Crozier, R.H., Stauffer, C. & Buschinger, A.** 2006. No sympatric speciation here: Multiple data sources show that the ant *Myrmica microrubra* is not a separate species but an alternate reproductive morph of *Myrmica rubra*. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 777-787.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H. & Vogler, A.P.** 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 70-74.

- Tolman, T. & Lewington, R.** 1997. *Butterflies of Britain and Europe*. Harper Collins, London.
- Vandel, A.** 1964. *Biospéologie. La Biologie des Animaux Cavernicoles*. Gauthier-Villars, Paris.
- Vanni, S.** 1988. Catalogo corologico dei *Duvalius* della Toscana (Coleoptera Carabidae Trechinae). *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali, Memorie, (serie B)*, **94**, 271-291.
- Vanni, S. & Magrini, P.,** 1993. Coléoptères Carabiques cavernicoles de la Toscane (Italie centrale) (Coleoptera Carabidae). *Mémoires de Biospéologie*, **20**, 269-277.
- Verity, R.** 1947. *Le Farfalle Diurne D'Italia 3. Divisione Papilionida. Famiglie Papilionidae e Pieridae*. Marzocco Ed., Firenze.
- Vogler, A.P. & Monaghan, M.T.** 2006. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **45**, 1-10.
- Wheeler, Q.D.** 2004. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **359**, 571-83.
- Will, K.W. & Rubinoff, D.** 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, **20**, 47-55.
- Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D.** 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, **54**, 844-51.
- Wilson, E.O.** 2003. The encyclopedia of life. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 77-80.

2. ANALISI MOLECOLARI SU CAMPIONI MUSEALI

2.1 Importanza dei campioni museali

I musei di storia naturale e gli erbari rappresentano un'importante fonte di materiale per l'integrazione di dati molecolari in ricerche riguardanti la sistematica, filogenesi, filogeografia, biologia della conservazione, grazie a campioni raccolti principalmente nell'arco degli ultimi due secoli (Austin & Melville, 2006; Wandeler et al., 2007; Stuart & Fritz, 2008). I campioni museali costituiscono infatti una fonte insostituibile di dati sulla distribuzione attuale e passata delle specie e diventano di primaria importanza nel caso di specie rare, a rischio di estinzione o già estinte (Goldstein & DeSalle, 2003; Crandall et al., 2009). Le collezioni museali preservano inoltre gli esemplari *typus*, sulla base dei quali sono state descritte le specie; questi campioni sono essenziali per i tassonomi per il confronto e la determinazione di nuovo materiale, per la descrizione di nuove specie e per verificare, sulla base di nuove tecniche, lo status tassonomico di specie precedentemente descritte (Graham et al., 2004; Bluemel et al., 2011).

Il DNA ottenuto da campioni museali è però in genere in quantità esigua e degradato; per questo motivo, le analisi molecolari su questo tipo di campioni richiedono particolari precauzioni e l'applicazione di protocolli adatti (Hajibabaei et al., 2005; Wandeler et al., 2007).

2.2. Degradazione e danni al DNA

La degradazione delle molecole di DNA comincia immediatamente dopo la morte delle cellule a causa di molti processi chimici e biomolecolari, in particolare per l'attività degli enzimi nucleasi lisosomiali. Inoltre, dopo la morte cellulare, viene meno l'attività di tutti quei meccanismi riparatori che agiscono durante la vita delle cellule (Lamers et al., 2009; Caramelli & Lago, 2006). L'entità della degradazione e il tipo di danno dipendono da molti fattori, tra i quali il tempo e le condizioni di conservazione dei campioni (Mitchell et al., 2005; Zimmermann et al., 2008).

Per esempio, nel caso di insetti conservati a secco, mentre l'esoscheletro rimane stabile per molti anni, i tessuti interni si seccano e decompongono in breve tempo. I fattori principali che condizionano il DNA durante la conservazione dei campioni sono la disidratazione e l'esposizione all'aria e alla luce; questi fattori possono potenzialmente condurre a diversi tipi di danni (Zimmermann et al., 2008). Anche i metodi attraverso i quali gli esemplari vengono uccisi possono avere ripercussioni sulla qualità del DNA (Junqueira et al., 2002); per esempio, la maggior parte delle soluzioni usate comunemente

nelle trappole a caduta per la cattura di artropodi hanno effetti dannosi sul DNA (Stoeckle et al., 2010).

Due dei principali problemi che si devono affrontare quando si lavora con campioni museali sono la frammentazione del DNA (*DNA shearing*) e la formazione di legami crociati tra i due filamenti del DNA (*inter-strand cross-linking*) (Mandrioli et al., 2006).

La frammentazione è dovuta sia a processi enzimatici che si verificano dopo la morte dell'esemplare, sia alla rottura per idrolisi dei legami fosfodiesterici nello scheletro zucchero-fosfato, che generano spaccature sul filamento. Anche il legame glicosidico tra la base azotata e lo zucchero può essere soggetto a rottura per idrolisi, portando ad un sito abasico; quest'ultimo può subire un riarrangiamento chimico che promuove la rottura del filamento (Shapiro, 1981; Caramelli & Lago, 2006). La degradazione del DNA in frammenti brevi può avere effetti negativi sia sull'estrazione che sull'amplificazione del DNA. Infatti, i frammenti corti precipitano con minore efficienza rispetto a quelli lunghi, riducendo la quantità di DNA che si riesce ad ottenere dai campioni. Inoltre, l'amplificazione di lunghe porzioni di DNA tramite PCR risulta molto difficile (Dessauer et al., 1990; Lindahl, 1993). È stata dimostrata una correlazione generale tra l'età dei campioni e la lunghezza dei frammenti di DNA estratto (Zimmermann et al., 2008); tuttavia, l'entità della frammentazione del DNA è correlata anche alle condizioni in cui i campioni vengono conservati (esposizione a raggi UV, temperatura, pH, ecc.) (Dessauer et al., 1990; Lindahl, 1993).

I legami crociati tra filamenti sono dovuti a varie reazioni chimiche, tra cui l'alchilazione, che bloccano la progressione della DNA polimerasi sul filamento stampo durante la PCR (Dean & Ballard, 2001; Mandrioli et al., 2006).

Anche altri fenomeni possono bloccare l'azione della DNA polimerasi, come gli attacchi ossidativi che colpiscono i legami delle basi puriniche e pirimidiniche o anche le molecole di desossiribosio, provocando la rottura degli anelli (Lamers et al., 2009).

Altri tipi di danni provocano modificazioni nel DNA che, seppur permettendo l'azione della DNA polimerasi, causano l'inserimento di basi non corrette durante l'amplificazione tramite PCR. Le più comuni sono le transizioni da citosina a timina (C → T) e da guanina ad adenina (G → A), dovute principalmente alla deaminazione idrolitica della citosina in uracile (Mitchell et al., 2005; Stiller et al., 2006; Brotherton et al., 2007). Un'altra mutazione piuttosto comune è dovuta alla deaminazione della 5-metilcitosina, che viene convertita in timina. Anche se la deaminazione colpisce molto più le basi pirimidiniche, può interessare anche quelle puriniche. Quando interessa l'adenina, viene generata ipoxantina, che si appaia preferenzialmente con la citosina, causando una mutazione da timina a citosina. Quando viene deaminata la guanina, viene generata xantina, che si appaia con la citosina. Tuttavia, in quest'ultimo caso, non vengono prodotte mutazioni osservabili, perché

l'appaiamento convenzionale viene recuperato nella successiva fase di amplificazione (Lamers et al., 2009). La deaminazione dipende da vari fattori, tra i quali la temperatura e il pH (Mitchell, 2005). Il tipo e l'entità delle incorporazioni sbagliate di nucleotidi in studi sui campioni museali è stato evidenziato da numerosi lavori (Stiller et al., 2006; Sefc et al., 2007); la percentuale di errori può essere particolarmente alta nel caso di campioni conservati in formalina (Williams et al., 1999; Tang, 2006).

2.3 Tecniche da applicare a campioni con DNA degradato

Negli ultimi anni, grazie a tecniche sempre più avanzate, sono stati proposti e testati vari metodi per ovviare a questi problemi legati alla degradazione del DNA dei campioni museali e del DNA antico.

Come detto precedentemente, uno dei principali effetti della degradazione del DNA è la frammentazione, che impedisce di amplificare tramite PCR frammenti lunghi (Su et al., 1999; Goldstein & Desalle, 2003). Una strategia comunemente applicata prevede quindi l'utilizzo di varie coppie di primers che amplificano brevi frammenti adiacenti (e parzialmente sovrapposti) del marcatore scelto. Una volta ottenute queste sequenze parziali, si procede all'allineamento e alla ricostruzione della sequenza dell'intero marcatore. Nel caso alcuni campioni siano particolarmente degradati, si può individuare all'interno del marcatore una breve regione maggiormente informativa e amplificare solo quella (Van Houdt et al., 2010; Bluemel et al., 2011). In alcuni casi infatti, nell'ambito di ristretti ambiti tassonomici, anche sequenze brevi possono essere utili per l'identificazione di vecchi campioni museali o per confrontare nuovi esemplari con vecchi esemplari *typus* (Hajibabaei et al., 2006).

Un metodo per ridurre il livello di incorporazioni di basi miscodificanti dovute alla deaminazione idrolitica della citosina in uracile è l'utilizzo dell'enzima Uracil-N-glicosilasi (UNG). I campioni di DNA estratti vengono sottoposti ad una digestione pre-amplificazione con questo enzima per favorire la dissociazione dell'uracile e generare così un sito abasico. In questo modo, nella successiva fase di PCR, l'estensione da parte della Taq polimerasi si interromperà in corrispondenza del sito abasico (Hofreiter et al., 2001; Guimaraes et al., 2009).

Un altro metodo consigliato per verificare l'autenticità delle sequenze e individuare gli errori dovuti a misincorporazioni è il clonaggio dei prodotti di amplificazione. A partire dalla pubblicazione dei criteri proposti da Cooper & Ponair (2000) per le analisi sul DNA antico, il clonaggio è diventato pratica comune, anche se non tutti gli autori concordano sulla sua applicazione. Secondo Winters et al. (2011) il clonaggio non è sempre necessario e in molti casi può rappresentare una pratica superflua in termini di tempi e costi. Viene criticata inoltre la mancanza di una standardizzazione riguardo al numero di cloni necessari e ai metodi per valutare la loro validità. In molte ricerche si

possono ottenere gli stessi risultati confrontando le sequenze ottenute a partire da diverse estrazioni e amplificazioni indipendenti. Il clonaggio rimane necessario in casi particolari, quando per esempio si analizza il DNA estratto da coproliti, campioni di suolo o ghiaccio. Nel caso dei campioni museali, il sequenziamento diretto risulta invece più veloce e ugualmente efficace nella maggioranza dei casi (Winters et al., 2011).

Infine, l'utilizzo di particolari mix di DNA polimerasi e enzimi riparatori può aumentare l'efficienza della reazione di PCR a partire da DNA degradato (Di Bernardo et al., 2002; Hajibabaei et al., 2005; d'Abbadie et al., 2007). Per esempio, la Restorase DNA polymerase (Sigma-Aldric) unisce una polimerasi ad alta precisione (AccuTaq) ad un enzima riparatore in grado di modificare i siti danneggiati e permettere la polimerizzazione (Hajibabaei et al., 2005).

2.4 Linee guida per analisi molecolari su campioni museali

In base a quanto detto sopra, quando si lavora con campioni museali, quindi con DNA più o meno degradato e diluito, si devono adottare particolari precauzioni.

Il DNA ottenuto da campioni museali è stato spesso incluso nella definizione di DNA antico (Paabo et al., 2004) e i principali criteri da seguire si basano, almeno in parte, su quelli originariamente proposti per le analisi sul DNA antico (Cooper & Ponair, 2000; Paabo et al., 2004); tuttavia, secondo Wandeler et al. (2007), esistono alcune differenze significative tra il DNA antico e quello estratto da campioni museali, che si riflettono sui protocolli da utilizzare. Per esempio, l'accertamento dell'autenticità è un problema cruciale nelle ricerche sul DNA antico, mentre nel caso dei campioni museali la verifica può essere condotta più facilmente confrontando i risultati con quelli ottenuti da campioni freschi della stessa specie/popolazione. Le principali differenze sono riportate nella Tabella 1, anche se non risultano sempre così nette e bisogna considerare i casi specifici.

Dato che ogni ricerca può presentare problematiche diverse, come già sottolineato da Gilbert et al. (2005) per i lavori sul DNA antico, si raccomanda di applicare un approccio più flessibile e i protocolli più adatti dovrebbero essere approntati accuratamente caso per caso (Wandeler et al., 2007). Secondo Gilbert et al. (2005) infatti, seguire alla lettera una lista fissa di criteri non impedisce comunque errori nelle analisi o nell'interpretazione dei risultati. All'inizio di ogni ricerca bisogna invece valutare quali sono i rischi maggiori che si corrono in base alla tipologia dei campioni e allo scopo dello studio, considerare costi-benefici nell'adottare certi metodi per accertare l'autenticità dei dati e infine valutare la veridicità dei risultati in modo critico.

Risulta infatti difficile imporre dei requisiti troppo rigorosi e generalizzati; ad esempio, nel caso sia disponibile una quantità molto esigua di

DNA da un campione estremamente importante (come l'esemplare *typus* di una specie), sarà possibile effettuare solo un certo numero di reazioni di amplificazione e si dovrà scegliere come ottimizzare l'analisi e la verifica dell'attendibilità dei risultati (Wandeler et al., 2007).

Tab. 1 – Principali differenze tra il DNA di campioni museali e il DNA antico secondo Wandeler et al. (2007).

	DNA da campioni museali	DNA antico
Origine dei campioni	Musei, collezioni private, erbari	Siti archeologici e paleontologici, musei
Età dei campioni	≤ 200 anni circa	Circa 100.000 anni, ma anche fino a 1 milione di anni
Tipo di tessuto	Vari: tessuto epiteliale, peli, penne, ossa, denti, squame di pesce, insetti conservati a secco, campioni di erbario (foglie, semi), ecc.	Soprattutto tessuti duri
Campioni di ominidi	Rari	Comuni
Maggiori cause di degradazione	Metodo e condizioni di conservazione	Fattori fisici nel sito di campionamento, condizioni di conservazione
Livello di degradazione	Più o meno alto	Molto alto
Divario tra campioni nella qualità del DNA	Molto alto	Alto
Problemi di autenticità	Moderati	Molto alti
Rischio di contaminazione	Alto	Molto alto

In base a queste considerazioni, Wandeler et al. (2007) suggeriscono delle linee-guida, i cui dettagli dovrebbero essere adattati di volta in volta:

1) **Scelta dei primers** - dato che il DNA estratto da campioni museali è in genere degradato e frammentato, si dovrebbero amplificare frammenti brevi, al massimo lunghi 200 bp. Dovrebbero essere disegnati primers specie-specifici per aumentare l'efficienza dell'amplificazione dei frammenti tramite PCR.

Sarebbe auspicabile disegnare diverse coppie di primers per amplificare la stessa porzione di DNA, in modo da confermare l'autenticità della sequenza.

2) **Isolamento dell'area di lavoro** – onde evitare contaminazione tra campioni e con DNA esogeno, le analisi sui campioni museali dovrebbero essere condotte in un laboratorio separato, con strumenti, reagenti e soluzioni decontaminati e dedicati esclusivamente ai campioni museali.

3) **Controlli negativi nelle estrazioni e PCR** - per verificare la presenza di possibili contaminazioni nei reagenti o contaminazioni tra campioni, dovrebbero essere condotte più estrazioni e amplificazioni indipendenti dello stesso campione, includendo sempre controlli negativi.

4) **Verifica della riproducibilità dei risultati** – per escludere la presenza di incorporazioni di nucleotidi sbagliati, dovrebbero essere confrontate sequenze dello stesso campione ottenute a partire da diverse estrazioni e amplificazioni indipendenti. Infine, dovrebbe essere fatta una verifica tramite clonaggio se si nutrono dubbi su alcune sequenze particolarmente importanti e “a rischio”.

Durante la mia ricerca di dottorato ho effettuato analisi molecolari su campioni museali di *Duvalius* raccolti negli ultimi 40 anni e conservati a secco. Alla luce di quanto detto sopra, ho cercato di valutare le principali problematiche relative ai campioni in questione e approntato protocolli di laboratorio (in dettaglio nel capitolo 3) efficaci per lavorare su DNA degradato e in minime quantità.

Bibliografia

- Austin, J.J. & Melville, J.** 2006. Incorporating historical museum specimens into molecular systematic and conservation genetics research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 1089-1092.
- Bluemel, J.K., King, R.A., Virant-Doberlet, M. & Symondson, W.O.C.** 2011. Primers for identification of type and other archived specimens of Aphrodes leafhoppers (Hemiptera, Cicadellidae). *Molecular Ecology Resources*, **11**, 770-774.
- Brotherton, P., Endicott, P., Sanchez, J.J., Beaumont, M., Barnett, R., Austin, J. & Cooper, A.** 2007. Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Research*, **35**, 5717–5728.
- Caramelli, D. & Lago, G.** 2006. Advances in ancient DNA studies. *Journal of Anthropological Sciences*, **84**, 65-83.
- Cooper, A. & Poinar, H.N.** 2000. Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science*, **289**, 1139.

- Crandall, K.A., Robison, H.W. & Buhay, J.E.** 2009. Avoidance of extinction through nonexistence: the use of museum specimens and molecular genetics to determine the taxonomic status of an endangered freshwater crayfish. *Conservation genetics*, **10**, 177-189.
- D'Abbadie, M., Hofreiter, M., Vaisman, A., Loakes, D., Gasparutto, D., Cadet, J., Woodgate, R., Pääbo, S. & Holliger, P.** 2007. Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA. *Nature Biotechnology*, **25**, 939-943.
- Dean, M. D. & Ballard, J.W.O.** 2001. Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **98**, 279-283.
- Dessauer, H.C., Cole, C.J. & Hafner, M.S.** 1990. Collection and storage of tissue. In: *Molecular Systematics* (Ed. by D.M. Hillis & C. Moritz) pp. 29-47, Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Di Bernardo, G., Del Gaudio, S., Cammarota, M., Galderisi, U., Cascino, A. & Cipollaro, M.** 2002. Enzymatic repair of selected cross-linked homoduplex molecules enhances nuclear gene rescue from Pompeii and Herculaneum remains. *Nucleic Acids Research*, **30**, e16.
- Gilbert, M.T.P., Bandelt, H.J., Hofreiter, M. & Barnes, I.** 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 541-544.
- Goldstein, P.Z. & DeSalle, R.** 2003. Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Molecular Ecology*, **12**, 1993-1998.
- Graham, C.H., Ferrier, S., Huettman, F., Moritz, C. & Peterson, A.T.** 2004. New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 497-503.
- Guimaraes, S., Ghirotto, S., Benazzo, A., Milani, L., Lari, M., Pilli, E., Pecchioli, E., Mallegni, F., Lippi, B., Bertoldi, F., Gelichi, S., Casoli, A., Belle, E.M.S., Caramelli, D. & Barbujani, G.** 2009. Genealogical Discontinuities among Etruscan, Medieval, and Contemporary Tuscans. *Molecular Biology and Evolution*, **26**, 2157-2166.
- Hajibabaei, M., deWaard, J.R., Ivanova, N.V., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Kirk, S.L., Mackie, P.M. & Hebert, P.D.N.** 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1959-1967.
- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B. & Hebert, P.D.N.**, 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 959-964.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M. & Paabo, S.**, 2001. Ancient Dna. *Nature Reviews Genetics*, **2**, 353-359.
- Junqueira, A.C.M., Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.**, 2002. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequence from museum specimens of miasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 39-45.

- Lamers, R., Hayter, S. & Matheson, C.D.**, 2009. Postmortem Miscoding Lesions in Sequence Analysis of Human Ancient Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **68**, 40-55.
- Lindahl, T.** 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.
- Mandrioli, M., Borsatti, F. & Mola, L.**, 2006. Factors affecting DNA preservation from museum-collected lepidopteran specimens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **120**, 239-244.
- Mitchell, D., Willerslev, E. & Hansen, A.** 2005. Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research*, **571**, 265-276.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L. & Hofreiter, M.** 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, **38**, 645-679.
- Sefc, K.M., Payne, R.B. & Sorenson, M.D.** 2007. Single base errors in PCR products from avian museum specimens and their effect on estimates of historical genetic diversity. *Conservation Genetics*, **8**, 879-884.
- Shapiro, R.** 1981. Damage to DNA caused by hydrolysis. In: *Chromosome Damage and Repair* (Ed. by E. Seeberg & K. Kleppe) pp. 3-12, Plenum, New York.
- Stiller, M., Green, R.E., Ronan, M., Simons, J.F., Du, L., He, W., Egholm, M., Rothberg, J.M., Keates, S.G., Ovodov, N.D., Antipina, E.E., Baryshnikov, G.F., Kuzmin, Y.V., Vasilevski, A.A., Wuenschell, G.E., Termini, J., Hofreiter, M., Jaenicke-Després, V. & Pääbo, S.** 2006. Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 13578-13584.
- Stoeckle, B.C., Dworschak, K., Gossner, M.M. & Kuehn, R.** 2010. Influence of arthropod sampling solutions on insect genotyping reliability. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **135**, 217-223.
- Stuart, B.L. & Fritz, U.** 2008. Historical DNA from museum type specimens clarifies diversity of Asian leaf turtles. *Biological Journal of the Linnean Society*, **94**, 131-141.
- Su, B., Wang, Y.X., Lan, H., Wang, W. & Zhang, Y.** 1999. Phylogenetic study of complete cytochrome b genes in musk deer (genus *Moschus*) using museum samples. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12**, 241-249.
- Tang, E.P.Y.** 2006 *Path to Effective Recovering of DNA From Formalin-fixed Biological Samples in Natural History Collections: Workshop Summary*. The National Academies Press, Washington, DC.
- Van Houdt, J.K.J., Breman, F.C., Virgilio, M. & De Meyer, M.** 2010. Recovering full DNA barcodes from natural history collections of Tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 459-465.

- Wandeler, P., Hoeck, P.E.A. & Keller, L.F.** 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 634-642.
- Williams, C., Ponten, F., Moberg, C., Soderkvist, P., Uhlen M., Ponten, J., Sitbon, G. & Lundeberg, J.** 1999. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *American Journal of Pathology*, **155**, 1467-1471.
- Winters, M., Barta, J.L., Monroe, C. & Kemp, B.M.** 2011. To Clone or Not To Clone: Method Analysis for Retrieving Consensus Sequences In Ancient DNA Samples. *PLoS ONE*, **6**, e21247.
- Zimmermann, J., Hajibabaei, M., Blackburn, D.C., Hanken, J., Cantin, E., Posfai, J. & Evans, T.C.** 2008. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. *Frontiers in Zoology*, **5**, 18.

3. 1° CASO DI STUDIO: Revisione sistematica e ricostruzione filogenetica di alcune specie del genere *Duvalius* (Coleoptera, Carabidae) su base morfometrica e molecolare

Riassunto

L'integrazione tra tecniche di biologia molecolare e morfometria geometrica rappresenta uno strumento efficace per la risoluzione di questioni tassonomiche incerte e per l'identificazione di unità significative per la conservazione. L'analisi di sequenze del gene mitocondriale citocromo c ossidasi subunità II (COII) e tecniche di morfometria geometrica sono state combinate per esaminare lo status tassonomico e identificare unità per la conservazione in quattro specie di coleotteri ipogei del genere *Duvalius* (Coleoptera, Carabidae, Trechinae) utilizzando principalmente campioni museali raccolti in Italia centrale. Precedenti studi tassonomici basati su caratteri morfologici hanno portato alla descrizione di diverse sottospecie, con areale spesso puntiforme, ristretto a singole grotte. Da un lato, l'analisi filogenetica ha identificato due linee monofiletiche ben supportate e un certo numero di cladi, con differenze genetiche relativamente basse, suggerendo tempi di divergenza brevi, in linea con la storia geologica dell'area di studio. Dall'altro lato, le analisi di morfometria geometrica hanno riscontrato un alto livello di differenziazione tra i campioni. In entrambi i casi, le analisi non hanno confermato interamente il precedente assetto sistematico, suggerendo possibili riarrangiamenti e la definizione di unità evolutive significative. I coleotteri del genere *Duvalius* sono protetti dalla Direttiva Habitat della Commissione Europea e la maggioranza dei taxa presi in esame vive in grotte situate al di fuori di Aree Protette. Questa ricerca ribadisce l'importanza di dedicare gli sforzi di protezione all'intera rete degli ecosistemi ipogei piuttosto che alle singole località o specie.

Introduzione

La distinzione tassonomica e la valutazione di unità per la conservazione si basano su vari concetti diagnostici, che includono l'isolamento ecologico e riproduttivo, l'individuazione di antenati comuni e la storia evolutiva, il raggruppamento in base a caratteri genotipici e morfologici e differenze nell'adattamento che comportano differenze in termini di fitness (de Queiroz, 2007; Petit & Excoffier, 2009; Hausdorf, 2011). I caratteri morfologici spesso sono sottoposti a forte selezione dovuta a diverse pressioni ambientali o strategie riproduttive e possono non riflettere interamente la storia evolutiva delle specie.

Tuttavia, la tassonomia si è basata tradizionalmente su caratteri morfologici. Negli ultimi decenni, i marcatori molecolari hanno fornito un ulteriore insieme di caratteri per affrontare questioni come l'identificazione delle specie e la ricostruzione delle relazioni filogenetiche (Vogler & Monaghan, 2007; Sperling & Roe, 2009). Sono state sollevate critiche alle ricostruzioni tassonomiche basate solo su dati molecolari o su caratteri morfologici ed è stato alla fine proposto un approccio integrato per la soluzione oggettiva di tali problematiche (Dayrat, 2005; Schlick-Steiner et al., 2010; Padial et al., 2010). Tuttavia, l'utilizzo di entrambe le tipologie di dati, genetici e morfologici, può condurre a risultati contrastanti, tanto da rendere spesso necessario un attento esame dei processi evolutivi per spiegare tali divergenze (Schlick-Steiner et al., 2010).

Discrepanze tra dati genetici e morfologici sono relativamente comuni negli organismi ipogei, soprattutto nei casi in cui viene riscontrato un basso livello di divergenza genetica tra specie morfologicamente ben differenziate (Caccone & Sbordoni, 2001; Juan et al., 2010). Le grotte, infatti, rappresentano micro-habitat con caratteristiche altamente specifiche, che possono permettere una rapida selezione dei caratteri morfologici in tempi relativamente brevi (Caccone & Sbordoni, 2001). Dall'altro lato, la forte selezione per caratteri legati all'adattamento alla vita ipogea può dar luogo a fenomeni di convergenza morfologica tra taxa che presentano alta divergenza genetica (Faille et al., 2010, 2011; Juan & Emerson, 2010). In entrambi i casi, può risultare difficile stabilire lo status tassonomico di popolazioni allopatriche che vivono in grotte differenti. Tuttavia, popolazioni che mostrano una chiara differenziazione possono essere considerate unità significative per la conservazione e, in quanto tali, possono rappresentare un importante contributo alla biodiversità (Fraser & Bernatchez, 2001; Moritz, 2002).

In questa ricerca è stato applicato un approccio integrato per studiare un particolare gruppo di insetti nel quale ci si aspetta che l'adattamento alla vita ipogea influisca in modo significativo sia sulla genetica che sulla morfologia delle specie e delle popolazioni. I membri del genere *Duvalius* (Coleoptera, Carabidae, sottofamiglia Trechinae) si ritrovano dall'Africa nord-occidentale, all'Europa occidentale fino alla Cina nord-occidentale. Vivono prevalentemente in grotte, dove si prevede che fattori micro-ambientali diano luogo a una forte pressione selettiva. I tassonomi hanno finora identificato, sulla base di caratteri morfologici, un grande numero di specie e sottospecie, spesso caratterizzate da una distribuzione estremamente limitata. La descrizione di nuove specie di *Duvalius* e le loro presunte relazioni filogenetiche si sono finora basate sulla valutazione soggettiva di caratteri morfologici esterni e dell'apparato copulatore maschile (Jeannel, 1928; Casale & Laneyrie, 1982). Tuttavia, dal momento che molti di questi caratteri morfologici mostrano differenze minime, la tassonomia di questo gruppo è stata oggetto di diverse interpretazioni, soprattutto a livello sottospecifico. Studi specifici su questo genere basati su analisi molecolari non sono finora mai stati condotti, principalmente a causa delle difficoltà nel trovare

campioni vivi. La maggior parte delle specie di *Duvalius* è infatti estremamente localizzata e vive in grotte isolate e difficili da raggiungere.

In questo studio, sono state applicate analisi di morfometria geometrica su caratteri esterni e analisi molecolari del gene mitocondriale citocromo c ossidasi subunità II (COII) per esaminare l'attuale assetto sistematico di un certo numero di specie chiave del genere *Duvalius* dell'Italia centrale e valutare la presenza di unità significative per la conservazione. Sono stati utilizzati campioni museali per ridurre al minimo problemi di tipo logistico e conservazionistico legati alla raccolta di insetti vivi nelle grotte (vedi Crandall et al., 2009). I risultati della presente ricerca possono essere utili per valutare se l'attuale status di protezione di un insieme di grotte incluse in Aree Protette e Siti d'Importanza Comunitaria è efficace nel preservare la biodiversità intra- e interspecifica, o se dovrebbero essere prese in considerazione misure alternative per la protezione della biodiversità degli organismi ipogei.

Materiali e metodi

Gruppo oggetto della ricerca

La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Duvalius* vive in grotte, nell'ambiente sotterraneo superficiale (*Milieu Souterrain Superficiel*, MSS; Juberthie, 1983) e nell'ambiente perinivale. Il genere *Duvalius* comprende oltre 300 specie (Moravec et al., 2003) e mostra diversi gradi di adattamento morfologico alla vita in ambiente sotterraneo, inclusi l'allungamento delle appendici, la depigmentazione, la riduzione degli occhi, lo sviluppo di specifici organi di senso, l'assenza di ali e corpo dalla forma slanciata, con pronoto e capo stretti e allungati (Vandel, 1964). In Italia il genere è rappresentato da circa 80 specie, distribuite nella catena alpina e appenninica, in Sicilia e Sardegna (Magrini, 1997, 1998). In Toscana sono presenti 11 specie e 24 sottospecie, protette da leggi a livello regionale in quanto si tratta per la maggior parte di endemismi a distribuzione molto limitata. Secondo Magrini (1997), le specie toscane si possono dividere in sei gruppi.

La presente ricerca si è focalizzata sul gruppo *andreinii*, in quanto il più ricco in numero di specie e perché complesso e controverso dal punto di vista tassonomico e sistematico. Il gruppo *andreinii* include quattro specie, con diverse sottospecie: *Duvalius andreinii* (Gestro, 1907), *D. minozzii* (Doderò, 1917), *D. jureceki* (Doderò, 1917) e *D. apuanus* (Doderò, 1917). *D. andreinii*, *D. jureceki* e *D. apuanus* sono endemiche per la Toscana, mentre *D. minozzii* è presente in Toscana e Emilia-Romagna. Alcuni di questi taxa (*D. andreinii*, *D. apuanus* e *D. jureceki*) erano stati originariamente assegnati ad altri generi e sottogeneri. La maggior parte delle sottospecie attualmente assegnate a *D. minozzii* erano considerate come specie distinte e tre delle quattro sottospecie

ora assegnate a *D. apuanus* [*D. a. rasettii* (Dodero, 1917), *D. a. intermedius* (Rasetti & Rasetti, 1921), *D. a. lanzai* (Straneo, 1943)] erano state descritte originariamente come appartenenti a *D. jureceki* (Magrini, 1997).

Campioni esaminati

Per la presente ricerca sono stati utilizzati principalmente campioni museali provenienti da 20 grotte e un sito ipogeo superficiale della Toscana e dell'Emilia Romagna (Fig. 1, Tab. 1), conservati presso il Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze e presso alcune collezioni private. Per le analisi morfometriche è stato utilizzato un totale di 108 campioni. Fra questi, 102 erano stati raccolti fra il 1942 e il 1990, principalmente mediante l'utilizzo di trappole a caduta e poi conservati a secco. Sei campioni sono invece più recenti (raccolti nel 2008-2009) e conservati in etanolo al 96%. Sono stati utilizzati solo maschi per uniformare l'analisi e evitare errori legati al dimorfismo sessuale.

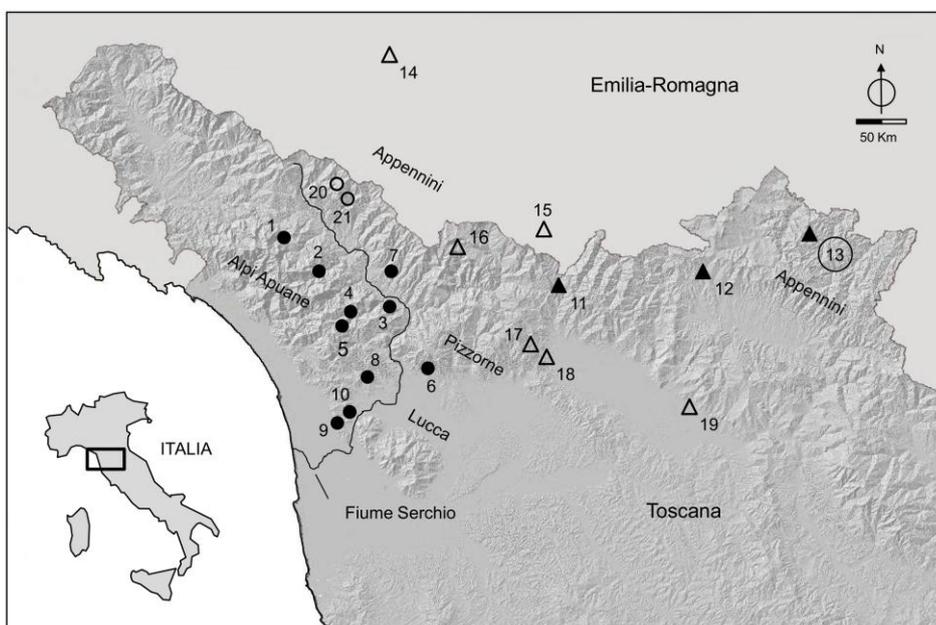


Fig. 1 Mappa dei siti di campionamento in Toscana e Emilia-Romagna. I numeri indicano la posizione di 20 grotte e un sito ipogeo superficiale (numero cerchiato). I diversi simboli rappresentano quattro specie di *Duvalius*: *D. apuanus* (cerchi neri), *D. jureceki* (triangoli neri), *D. minozzii* (triangoli bianchi), *D. andreinii* (cerchi bianchi). I siti delle varie sottospecie sono indicati in dettaglio nella Tabella 1.

Tab. 1 Posizione geografica dei siti di campionamento per ciascuna specie di *Duvalius* inclusa in questo studio. N° cat.= numero catastale della grotta.

Specie	Sotto-specie	Sito di campionamento	N° cat.	Provincia Regione	Lat.	Long.	Aree Protette
<i>D. apuanus</i>	<i>apuanus</i>	1. Abisso Olivifer	1000 T	MS Toscana	44.119167	10.193889	Parco Regionale Alpi Apuane
		2. Grotta del Fontanaccio	93 T	LU Toscana	44.073333	10.341111	Parco Regionale Alpi Apuane
		3. Antro della Paura	439 T	LU Toscana	44.016389	10.526667	
		4. Grotta di Focchia Bassa	N/A	LU Toscana	43.995833	10.409722	Parco Regionale Alpi Apuane
		5. Buca sotto Martignana	539 T	LU Toscana	43.989722	10.411389	
		6. Buca di Mocesì	297 T	LU Toscana	43.945278	10.551667	
	<i>lanzai</i>	7. Buca delle Fate di Coreglia Antelminelli	141 T	LU Toscana	44.04750	10.524722	
	<i>intermedius</i>	8. Buca delle Fate di San Martino in Freddana	225 T	LU Toscana	43.908611	10.434722	
	<i>rasettii</i>	9. Buca delle Fate di Compignano	400 T	LU Toscana	43.844167	10.391944	
		10. Buca Tana di Maggiano	827 T	LU Toscana	43.860278	10.403333	
<i>D. jureceki</i>	<i>jureceki</i>	11. Buca delle Fate di Alpe Piana	828 T	PT Toscana	44.046389	10.846667	SIC IT5130009 SIR 138 Tre Limentre-Reno
	<i>magintanus</i>	12. Buca dei Massi Neri	734 T	FI Toscana	44.053056	11.271111	
		13. Passo Sambuca	Sito ipogeo superficiale		FI Toscana	44.072778	11.485833

<i>D. minozzii</i>	<i>minozzii</i>	14. Grotta di Santa Maria Maddalena di Vallestra	1 E	RE Emilia-Romagna	44.458333	10.575000	
	<i>aspettati</i>	15. Grotta delle Fate di Lago Pratignano	15 E	BO Emilia-Romagna	44.174444	10.821111	Parco Regionale Corno alle Scale
	<i>mugellii</i>	16. Grotta Bologno	442 T	LU Toscana	44.081111	10.688611	SIC IT5120006 SIR 14 Monte Prato Fiorito-Monte Coronato-Valle dello Scesta
	<i>magrini</i>	17. Buca di Nadia	732 T	PT Toscana	43.999722	10.889722	
		18. Tecchia di Calabbiana	775T	PT Toscana	43.999167	10.889722	
	<i>berni</i>	19. Buca della Ghiandaia	736 T	FI Toscana	43.895278	11.231111	SICIT514000 8 SIR 42 Monte Morello
<i>D. andreinii</i>		20. Tana di Magnano	162 T	LU Toscana	44.178333	10.388889	
		21. Tana del Pollone di Magnano	1017 T	LU Toscana	44.177778	10.388333	

L'analisi molecolare ha riguardato un sottoinsieme di 26 campioni (inclusi i sei esemplari raccolti più recentemente), rappresentativi di tutte le sottospecie in questione e di tutte le località di campionamento. Nell'analisi sono stati inclusi come outgroup due campioni provenienti dalla Liguria, appartenenti rispettivamente alle specie *Duvalius doriai doriai* (Fairmaire, 1859) e *D. canevai* (Gestro, 1885), e un campione di *Trechus quadristriatus* (Schränk, 1781), appartenente anch'esso alla famiglia Trechinae. L'albero filogenetico è stato radicato in base a *T. quadristriatus*, che fa parte di un clade diverso da *Duvalius* (Faille et al., 2010).

Estrazione del DNA, amplificazione e sequenziamento

Vista la modesta quantità totale di tessuti disponibile, si è deciso di utilizzare per l'estrazione del DNA l'intero corpo degli esemplari, tranne l'addome. I campioni raccolti più recentemente sono stati incubati per circa 12 ore in 600 µl di buffer di estrazione (100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, pH 8.0) e 10 µl di proteinasi K (20 mg/ml) a 37 °C. Il DNA è stato poi estratto usando il metodo standard fenolo-cloroformio (Sambrook & Russell, 2001). I campioni museali sono invece stati trattati con protocolli separati simili a quelli usati per il DNA antico, ma in modo meno rigido (Gilbert et al., 2005; Wandeler et al., 2007). Eventuali problemi di contaminazione tra campioni museali e tra campioni recenti e museali sono stati ridotti effettuando l'estrazione del DNA e l'amplificazione in stanze separate. Tutti gli strumenti, i reagenti e le soluzioni sono stati sterilizzati e dedicati esclusivamente ai campioni museali. Queste precauzioni sono importanti perché i campioni museali possono essere soggetti a diversi livelli di degradazione del DNA, che dipendono principalmente dall'età dei campioni e dalle condizioni/metodi di conservazione (Mitchell et al., 2005; Zimmermann et al., 2008); anche le soluzioni utilizzate nelle trappole a caduta per la cattura degli insetti possono danneggiare il DNA a vari livelli (Stoeckle et al., 2010). È stato dimostrato che i metodi che prevedono l'utilizzo di membrane di silice sono più efficaci per estrarre il DNA da campioni museali (Hajibabaei et al., 2005). Perciò è stato utilizzato il NucleoSpin Tissue XS kit (Machery-Nagel, Düren, Germany), seguendo il protocollo consigliato dal produttore. Per ciascun campione sono state effettuate due estrazioni indipendenti in reazioni separate, usando buffer di estrazione come controllo negativo. Tutti i campioni di DNA estratti sono stati conservati in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) a -80 °C.

Il gene mitocondriale citocromo c ossidasi subunità II (COII) dei sei campioni recentemente raccolti è stato amplificato e sequenziato usando la coppia di primer TrCOIIL3056 (5' - TATGGCAGAATAGTGTAATG - 3') e TrCOIIH3927 (5' - TTATTGGGGCTATTTGTGGAA - 3') disegnati per questo progetto rispettivamente sul gene codificante il tRNA per la Leucina e sul gene per l'ATP sintasi. I numeri dei primer si riferiscono all'estremità 3'

della sequenza del genoma mitocondriale di *Trachypachus holmbergi* pubblicata da Sheffield et al. (2008). L'amplificazione tramite reazione di polimerizzazione a catena (PCR) è stata effettuata in un volume di reazione totale di 25 µl contenente 15-100 ng di DNA totale, 1 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM di ciascun dNTP, 0.5 µM di ciascun primer e 1 unità di *Taq* DNA polimerasi (Invitrogen). Il profilo termico ha compreso una fase iniziale di denaturazione a 94 °C per 5 min, seguita da 35 cicli di 30 sec a 94 °C, 30 sec a 48 °C e 90 sec a 72 °C, con una fase finale di estensione a 72 °C per 10 min. I prodotti della PCR sono stati sequenziati con BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) secondo il protocollo indicato dal produttore. I prodotti della reazione di sequenza sono stati risolti tramite un analizzatore automatico di acidi nucleici ad elettroforesi capillare ABI3100 (Applied Biosystems) e le sequenze complementari ottenute sono state allineate tramite il programma CodonCode Aligner 3.0.1 (CodonCode Corporation). Le sequenze consenso risultanti consistono in un totale di 684 nucleotidi, corrispondenti alla sequenza complete del gene COII di *Duvalius* (numeri di accesso in Genbank: JX486748-JX486751).

Le sequenze dei geni mitocondriali di campioni museali sono generalmente difficili da ottenere a causa della frammentazione del DNA. Per risolvere questo problema si possono produrre diversi amplificati brevi, che insieme permettono di ricostruire l'intera sequenza di interesse (Van Houdt et al., 2010; Bluemel et al., 2011). Sequenze parziali del COII di campioni museali di *Duvalius* sono state ottenute usando un insieme di primer interni specie-specifici disegnati appositamente per amplificare tre brevi frammenti sovrapposti alle estremità (Tab. 2). La reazione di polimerizzazione a catena è stata condotta in un volume di reazione totale di 25 µL, contenente 3 µL di DNA estratto, 1 x Restorase buffer, 200 µM di ciascun dNTP, 0.5 µM di ciascun primer e 1.25 unità di Restorase DNA Polymerase (Sigma-Aldrich), una miscela contenente una *Taq* polimerasi di alta qualità e un enzima riparatore del DNA, per la quale è stata dimostrata efficacia nell'amplificazione di DNA danneggiato (Hajibabaei et al., 2005). La miscela per la PCR è stata incubata per 15 min a 37 °C e poi per 5 min a 72 °C. Quindi, prima dell'amplificazione, i primer sono stati aggiunti alla miscela. Il profilo termico per la PCR ha compreso una fase iniziale di denaturazione di 2 min a 94 °C, seguita da 40 cicli di 30 sec a 94 °C, 30 sec a 50 °C e 60 sec a 72 °C, con una fase finale di estensione a 72 °C per 5 min. Per ciascun campione di DNA estratto sono state condotte due reazioni di amplificazione tramite PCR indipendenti. Entrambi i filamenti amplificati tramite PCR sono stati sequenziati e allineati per produrre una sequenza parziale di 504 pb del COII per ciascun campione museale, comprese le specie usate come outgroup (numeri di accesso in Genbank: JX486736-JX486747 e JX486752).

Tab. 2 Primer interni disegnati per amplificare tramite PCR tre sequenze parziali del gene mitocondriale COII di campioni museali di *Duvalius*. I prodotti PCR sono poi stati allineati per generare una sequenza finale di 504 pb del COII. I numeri dei primer si riferiscono all'estremità 3' della sequenza del genoma mitocondriale di *Trachypachus holmbergi* pubblicata da Sheffield et al. (2008).

<i>Light strand primer</i>	Sequenza (5'- 3')	<i>Heavy strand primer</i>	Sequenza (5'- 3')	Lunghezza prodotto PCR
DuvCOIIL 3279	TCGATATCTTCTTGAAGG ACAAAC	DuvCOIHH 3400	CATAACTTCAGTATCAT TGATGACCA	170 bp
DuvCOIIL 3405	CAATTACATTAATAATCAA TTGGTCA	DuvCOIHH 3611	CCTGGGGTAGCATCAAT TTT	250 bp
DuvCOIIL 3585	ACTGCAATAGATGTTTTA CATT	DuvCOIHH 3794	CCAGAACTTGCTTTCAG TCATC	250 bp

Diversità genetica e analisi filogenetica

La diversità del DNA mitocondriale è stata stimata grazie all'allineamento delle sequenze parziali di 504 pb del COII sia dei campioni recenti che di quelli museali. Non è stata trovata prova di pseudogeni. I due filamenti hanno dato luogo ad un perfetto appaiamento e le sequenze consenso sono state controllate per la presenza di inserzioni, delezioni e codoni stop che potrebbero dar luogo ad una proteina non funzionale. Per le sequenze è stata stimata la deviazione dalla neutralità mediante il D-test di Tajima con il programma ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Il modello di evoluzione molecolare più appropriato per i dati è stato individuato tramite il programma JMODELTEST (Posada, 2008), utilizzando il *Bayesian Information Criterion*. I valori di *likelihood* di 88 modelli sono stati calcolati utilizzando un'ottimizzazione *Maximum Likelihood* della topologia degli alberi implementata da Phyml (Guindon & Gascuel, 2003). Ciascun modello è stato testato considerando la possibilità di avere differenze nelle frequenze nucleotidiche, tassi di sostituzione diversi tra i siti e una proporzione di siti invariabili. Il modello che descrive meglio l'andamento di sostituzione dei dati è risultato l'*Hasegawa Kishino and Yano model* – HKY (Hasegawa et al., 1985), che assume composizione in basi variabile e diversi tassi di sostituzione per le transizioni e le trasversioni.

Le distanze medie tra campioni basate sul criterio della *Maximum Likelihood* (*ML distances*) sono state calcolate usando il programma MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

Le relazioni filogenetiche sono state ricostruite tramite inferenza bayesiana utilizzando l'algoritmo *Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo* implementato da MRBAYES 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

L'analisi è stata condotta attraverso due corse indipendenti, iniziando con valori "a priori" predefiniti, alberi iniziali casuali e quattro catene di Markov; sono state eseguite 10^6 generazioni, con campionamento ogni 1000 generazioni. La stazionarietà dell'analisi è stata valutata tramite due parametri diagnostici: la *standard deviation of split frequencies between the two simultaneous runs* e il *potential scale reduction factor* (Lakner et al., 2008; Ronquist & Deans, 2010). Il 25% degli alberi prodotti durante le prime generazioni è stato scartato, in modo da usare solo quelli ottenuti dopo che la catena ha raggiunto la stabilità. Con gli alberi rimanenti è stato costruito un albero di consenso maggioritario (50% *majority rule*). L'albero di consenso con la lunghezza dei rami e i valori di probabilità a posteriori dei nodi è stato rielaborato con il programma TREEVIEW (Page, 1996).

Morfometria geometrica

L'analisi morfometrica è stata applicata a caratteri morfologici esterni. L'esame dell'apparato copulatore maschile, un carattere usato in tassonomia per l'identificazione della maggior parte delle specie di Coleotteri, non è stato preso in considerazione perché nelle specie appartenenti al gruppo *andreinii* la morfologia dell'edeago non risulta molto informativa e la lamella copulatrice può presentare alti livelli di deformazione a causa della sua scarsa sclerotizzazione (Magrini, 1997). I campioni sono stati sistemati in posizione perpendicolare ad una fotocamera Nikon D2XS con un obiettivo 60 mm F 2.8, ed è stata posizionata accanto una scala millimetrata per standardizzare le misure. Il lato dorsale di ciascun campione è stato fotografato per analizzare l'antenna destra, il capo, il pronoto e le elitre. Sul profilo dell'antenna sono stati posizionati 43 *landmarks* (Fig. 2).

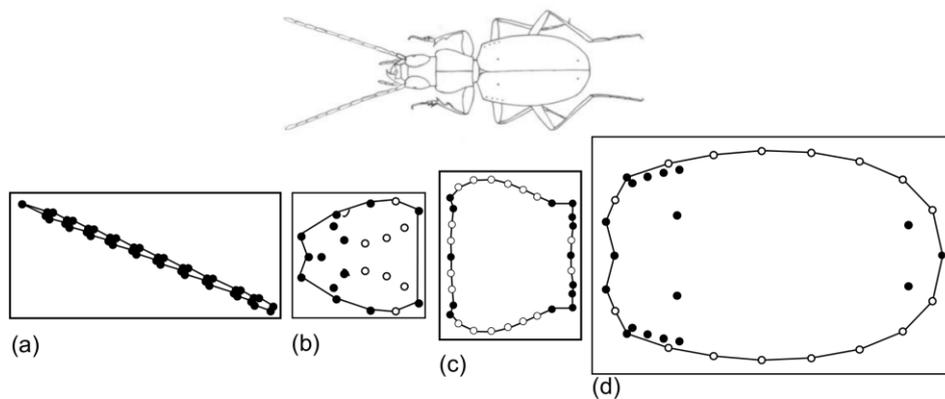


Fig. 2 Rappresentazione schematica dei *landmarks* (cerchi neri) e *sliding semi-landmarks* (cerchi bianchi) usati per l'analisi di morfometria geometrica di antenna (a), capo (b), pronoto (c) e elitre (d) di *Duvalius*.

I *landmarks* sono stati individuati su strutture anatomiche omologhe tra le specie e chiaramente identificabili (Bookstein, 1997). Sono stati definiti come *sliding semi-landmarks* quei punti che possono slittare lungo il profilo compreso tra due *landmarks* (Bookstein, 1997). Sul lato dorsale di capo, pronoto e elitre sono stati posizionati rispettivamente un numero totale di 22, 32 e 34 *landmarks* e *semi-landmarks* (Fig. 2). I dati digitali sono stati analizzati usando il programma TPSDIG 2.16, mentre il programma TPSUTIL 1.46 (Rohlf, 2010a,b) è stato utilizzato per la definizione degli *sliding semi-landmarks*.

Per rimuovere gli effetti dell'asimmetria delle strutture è stato utilizzato il programma MORPHOJ 1.02j (Klingenberg, 2011), che crea disposizioni medie simmetriche rispetto all'asse sagittale. È stata poi applicata una *Generalized Procrustes Analysis* (GPA) separatamente ai *landmarks* individuati sulle antenne, capo, pronoto e elitre per rimuovere le variazioni dovute a posizione, orientamento e grandezza e per sovrapporre gli oggetti in un sistema di coordinate comune (Bookstein, 1997). Le *partial warps* sono state calcolate con i residui della *Generalized Procrustes Analysis*. Le *relative warps* (*PCs*) sono state ottenute attraverso un'analisi delle componenti principali effettuata sulle *partial warps* e sono state visualizzate mediante griglie di deformazione (*thin-plate spline –TPS- deformation grids*), che permettono il confronto delle differenze di forma. La GPA, il calcolo delle *partial* e *relative warps* e la visualizzazione tramite griglie TPS sono stati effettuati usando il programma TPSRELW 1.49 (Rohlf, 2010c). È stato inoltre considerato il *centroid size* per ciascuna struttura morfologica (Bookstein, 1991), per valutare l'importanza delle dimensioni complessive nel distinguere le popolazioni.

È stata quindi applicata una *full cross validation discriminant analysis* per assegnare ciascun campione al sito di campionamento sulla base dei caratteri morfologici. L'analisi discriminante può dare risultati non obiettivi quando il numero delle variabili è alto rispetto al numero dei casi. Per questo sono stati inclusi nell'analisi solo i quattro *centroid size* e le prime 10 componenti (*relative warps*) per ciascun carattere, che rappresentano una varianza cumulativa maggiore del 90%. Non sono state prese in considerazione le popolazioni con solo due individui, perché altrimenti la *full cross validation discriminant analysis* avrebbe formato i gruppi sulla base di un solo campione.

Sebbene la *full cross validation discriminant analysis* sia considerata un approccio efficiente per attribuire i casi (campioni) al loro gruppo d'origine, questo metodo non è adatto a rappresentare la variazione complessiva, perché l'ordinamento lungo le funzioni discriminanti non rappresenta larga parte della variazione di forma tra i campioni (Mitteroecker & Bookstein, 2011). Per questo è stata applicata anche una *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLSDA) utilizzando il pacchetto MIXOMICS R, allo scopo di identificare specifiche *PCs* e *centroid size* che potessero rendere conto delle differenze tra le popolazioni. La PLSDA consiste in una tecnica di regressione in cui le componenti sono costruite in modo da trovare un compromesso tra la

descrizione dell'insieme delle variabili esplicative (*PCs e centroid size*) e la predizione delle variabili di risposta (l'appartenenza ad un sito di campionamento). A differenza dell'analisi discriminante, la PLSDA non risente negativamente dell'alto numero di variabili e permette l'inclusione di tutte le *PCs* e i *centroid size* nell'analisi.

Risultati

Diversità delle sequenze di DNA mitocondriale

L'analisi ha evidenziato un totale di 14 aplotipi del gene mitocondriale COII, caratterizzati da 24 siti polimorfici (4.76 % della lunghezza della sequenza) per 26 campioni di *Duvalius*. Il livello più alto di diversità è stato riscontrato a carico della terza posizione dei codoni (58.3 % della variazione totale). È stato osservato un rapporto transizioni/trasversioni (Ti/Tv) relativamente alto, caratteristico dei geni mitocondriali. Il rapporto Ti/Tv medio è risultato 3.4; l'alta frequenza delle transizioni fa ipotizzare un livello di sostituzione nucleotidica non ancora giunto a saturazione. Come precedentemente riscontrato nel DNA mitocondriale dei coleotteri, in particolar modo nel sottordine Adephaga (Simon et al., 1994; Sheffield et al., 2008), è emerso un alto contenuto in A+T e un contenuto molto basso in C+G nella terza posizione dei codoni (Tab. 3).

Tab. 3 Diversità nucleotidica delle sequenze parziali (504 pb) del gene mitocondriale COII di *Duvalius*. *P* = numero di siti variabili.

	<i>P</i>	% composizione nucleotidica				
		A	T	C	G	A + T
Totale	24	37.9	40.3	11.2	10.6	78.2
1 ^a posizione	8	40.7	28.4	13.4	17.5	69.1
2 ^a posizione	2	28.6	39.3	18.4	13.7	67.9
3 ^a posizione	14	44.5	53.3	1.6	0.6	97.8

Il livello di variazione aminoacidica è risultato basso (3.6 %). Non è stata riscontrata diversità tra le sequenze di individui provenienti dallo stesso sito. La distanza media calcolata secondo il criterio della *Maximum Likelihood* (ML) tra individui è risultata bassa (0.017±0.005SE). Una distanza media intraspecifica relativamente più alta è stata riscontrata per *D. apuanus* e *D.*

minozzii, che includono il maggior numero di sottospecie analizzate. La distanza media interspecifica è risultata bassa tra *D. apuanus* e *D. jureceki* e tra *D. minozzii* e *D. andreinii*, mentre valori più alti sono emersi per gli altri confronti (Tab. 4). Non è stata riscontrata differenza genetica a livello sottospecifico tra *D. apuanus lanzai* della grotta 7 e campioni di *D. a. apuanus* raccolti nelle grotte 1, 2, e 3, come tra *D. minozzii aspettatii* della grotta 15 e *D. m. magrinii* delle grotte 17 e 18.

Tab. 4 Distanze medie (e errore standard) tra le sequenze parziali del COII delle specie di *Duvalius* calcolate con il metodo della *Maximum Likelihood*. I valori delle distanze intraspecifiche sono riportati sulla diagonale.

	<i>D. apuanus</i>	<i>D. jureceki</i>	<i>D. minozzii</i>	<i>D. andreinii</i>
<i>D. apuanus</i>	0.004 ± 0.002			
<i>D. jureceki</i>	0.007 ± 0.003	0.001 ± 0.001		
<i>D. minozzii</i>	0.029 ± 0.009	0.029 ± 0.009	0.005 ± 0.002	
<i>D. andreinii</i>	0.031 ± 0.009	0.033 ± 0.010	0.008 ± 0.003	0.002 ± 0.002

Analisi filogenetica

La stabilità raggiunta dall'analisi Bayesiana è stata confermata da due parametri diagnostici della convergenza: il valore della *standard deviation of split frequencies between the two simultaneous runs* (0.0076) e il *potential scale reduction factor* (con valore prossimo a 1). La topologia dell'albero Bayesiano ha messo in evidenza due linee monofiletiche ben supportate. La prima include tutte le sottospecie di *D. apuanus* e *D. jureceki*, mentre la seconda comprende *D. andreinii* e tutte le sottospecie di *D. minozzii* (Fig. 3).

All'interno della prima linea filetica si possono distinguere tre cladi. Il primo e il secondo sono supportati con valori di probabilità a posteriori rispettivamente del 65 % e 78 %, mentre il terzo clade ha supporto più forte, con valore di probabilità a posteriori del 97 %. Il primo clade è rappresentato dai campioni di *D. apuanus apuanus* delle Alpi Apuane e dei Monti delle Pizzorne e da un campione di *D. a. lanzai* degli Appennini. Il secondo clade comprende altri campioni di *D. a. apuanus* delle Alpi Apuane e campioni di *D. a. intermedius* e *D. a. rasettii* provenienti rispettivamente dalle Alpi Apuane meridionali e dalle montagne lucchesi. Il terzo clade include le due sottospecie di *D. jureceki* provenienti dagli Appennini.

La seconda linea filetica è composta da due distinti cladi monofiletici. Il primo comprende i campioni di *D. andreinii* degli Appennini nord-occidentali, mentre il secondo include due sottospecie di *D. minozzii* provenienti dagli Appennini e da una grotta Appenninica vicina alle pianure dell'Emilia-Romagna. *D. minozzii* è risultato parafiletico rispetto a *D. andreinii*, con *D. minozzii bernii* in posizione basale rispetto agli altri taxa.

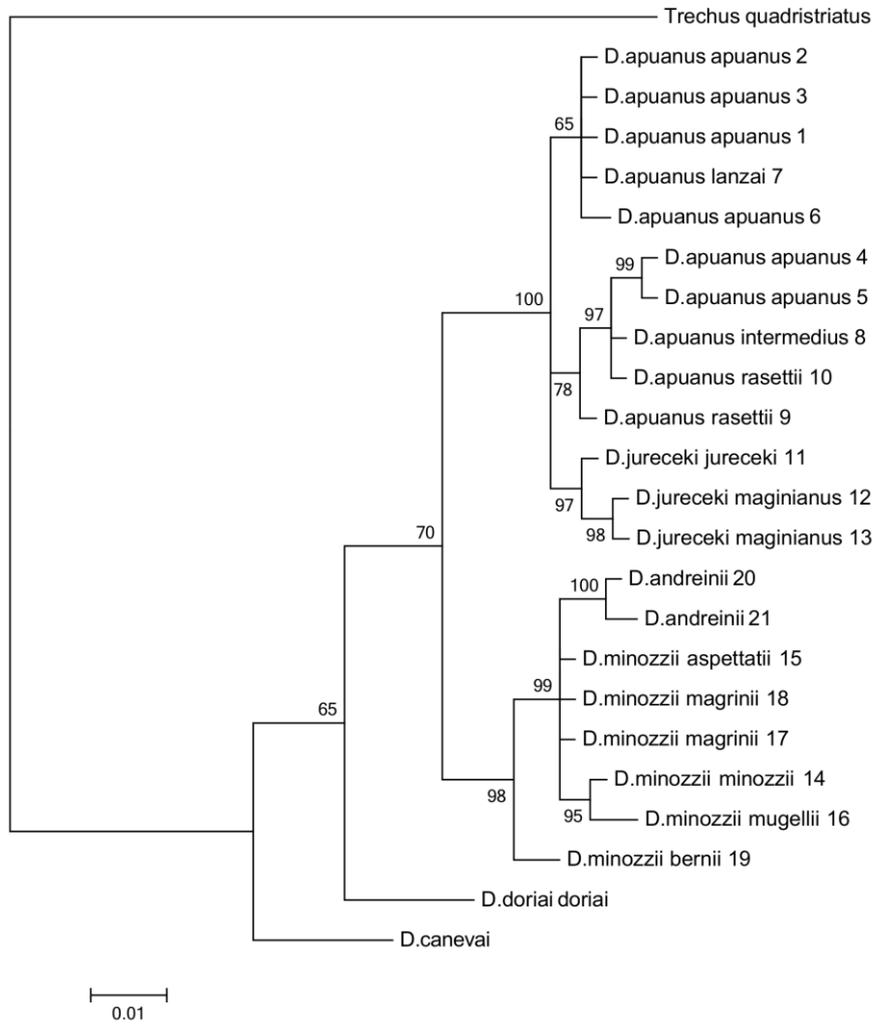


Fig. 3 Albero di consenso maggioritario (50% *majority rule*) ricostruito tramite analisi bayesiana basata sulle sequenze del gene mitocondriale COII di *Duvalius*. I valori di probabilità a posteriori sono riportati vicino ai nodi. I numeri alla destra dei taxa si riferiscono ai siti di campionamento in Figura 1 e Tabella 1.

Dall'analisi di antenne, capo, pronoto e elitre sono state ottenute rispettivamente 82, 40, 71 e 64 *relative warps*. La *full cross validation discriminant analysis* ha mostrato una percentuale complessiva del 60.6 % di campioni correttamente assegnati al proprio sito di campionamento. Questa percentuale è da considerare alta se confrontata con una probabilità media di corretta assegnazione dovuta al caso del 5.3 % (1/19; 21 siti di campionamento meno due siti con meno di tre campioni). In particolare, i campioni provenienti dalle località 2, 7 e 14 vengono perfettamente assegnati al loro sito e altri 63 campioni di 11 località vengono assegnati correttamente con una probabilità che va dal 50 % all'85.7 % (Tab. 5; Fig. 4). La percentuale di corretta assegnazione cresce significativamente quando vengono usate come variabili di raggruppamento l'assegnazione alla sottospecie (dal 50 % al 100 %) e alla specie (dal 75% al 92.3%) (Tab. 5).

Questo risultato è stato confermato anche dalla PLSDA. Infatti i campioni provenienti da tutti i siti di campionamento mostrano un buon livello di raggruppamento grazie alla combinazione delle prime quattro componenti principali. La prima componente principale della PLSDA è risultata altamente correlata ai centroidi di tutti i caratteri morfologici e alla PC3 delle antenne. La seconda componente è principalmente correlata alla PC1 del capo. Entrambe le prime due componenti sono correlate alla PC2 delle elitre e alla PC1 del pronoto (Fig. 5). I campioni di *D. apuanus* mostrano un alto livello di variabilità rispetto alle componenti 1 e 2, mentre *D. jureceki* presenta una variabilità minore. I campioni ascrivibili a *D. minozzii* sono fortemente distinti dagli altri e mostrano dimensioni assolute minori e antenne di forma più tozza, mentre *D. andreinii* mostra valori delle componenti 1 e 2 intermedi tra quelli di *D. apuanus* e *D. minozzii*. Le popolazioni di *D. apuanus* e *D. jureceki* sono caratterizzate da dimensioni generali maggiori e antenne di forma più allungata. Queste caratteristiche risultano particolarmente evidenti nei campioni di *D. apuanus lanzai* (sito n° 7 in Fig. 5), che mostrano un alto livello di differenziazione per entrambe le componenti 1 e 2; i campioni di *D. apuanus apuanus* dei siti 1 e 2 mostrano invece un trend opposto. La seconda componente della PLSDA denota una forma del capo significativamente accorciata in *D. apuanus intermedius* (sito n° 8), mentre i campioni di *D. minozzii magrinii* (sito n° 17) mostrano, all'opposto, capo di forma allungata. La PC2 delle elitre e la PC1 del pronoto, correlate ad entrambe le prime due componenti, sono legate alla posizione delle setole discali anteriori delle elitre rispetto alle setole laterali e all'allungamento del pronoto. In particolare, *D. minozzii* e *D. jureceki* sono ben differenziati grazie alle prime due componenti, con *D. jureceki* caratterizzato da setole in posizione più distale rispetto alle setole laterali e pronoto più largo nella sua parte posteriore (rispetto a *D. minozzii*) (Fig. 5).

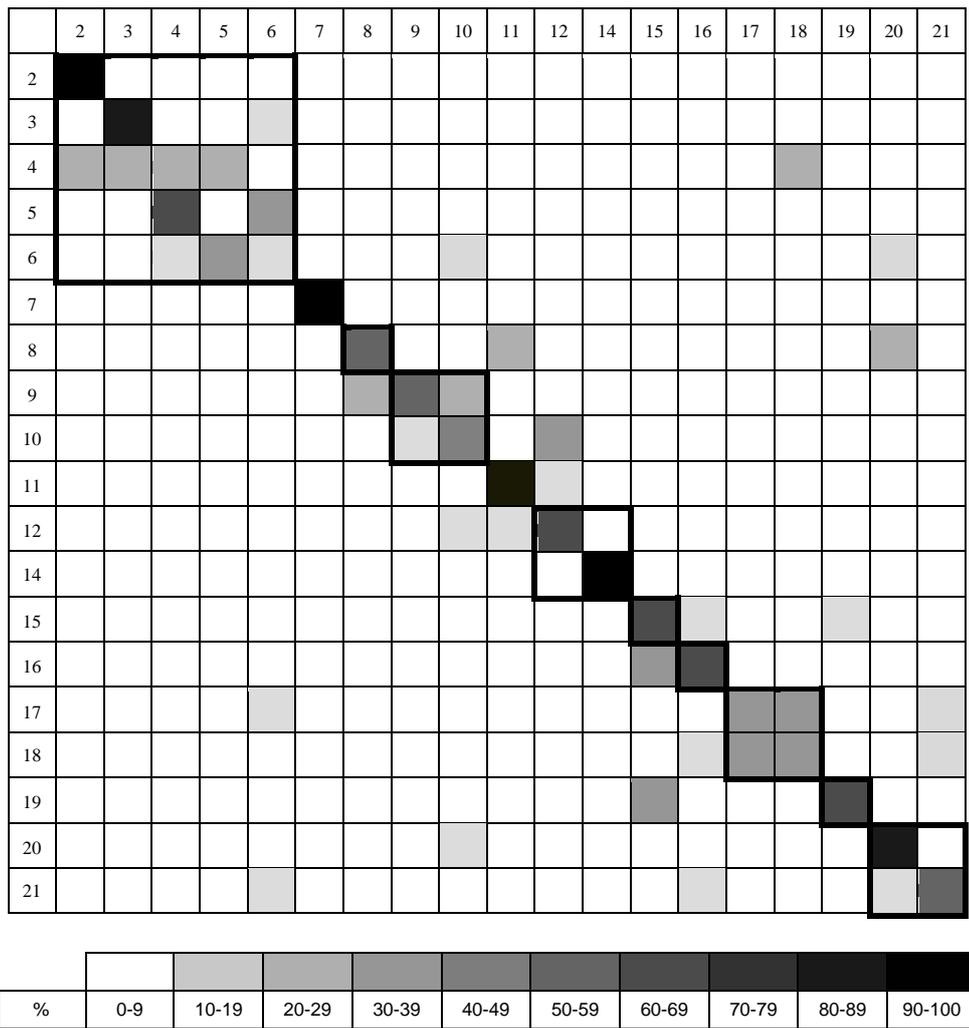


Fig. 4 Percentuale di campioni assegnati al loro sito di campionamento grazie alla *full cross validation discriminant analysis*. Le celle che rappresentano campioni appartenenti alla stessa sottospecie sono raggruppate da linee più marcate. I numeri si riferiscono alle località di campionamento in Figura 1, Tabella 1 e Tabella 5.

Tab. 5 Taxa appartenenti al genere *Duvalius* inclusi nella ricerca. Per ciascun sito sono riportati il numero di campioni inclusi nell'analisi morfometrica e la percentuale di campioni assegnati correttamente alle loro specie, alle sottospecie e ai siti di campionamento grazie alla *full cross validation discriminant analysis*.

Specie	% di campioni assegnati corrett. alla specie	Sottospecie	% di campioni assegnati corrett. alla sottospecie	Siti di campionamento	N° campioni	% di campioni assegnati corrett. al sito
<i>D. apuanus</i>	86.7	<i>apuanus</i>	87.5	1. Abisso Olivifer	2	-
				2. Grotta del Fontanaccio	4	100
				3. Antro della Paura	6	83.3
				4. Grotta di Focchia Bassa	5	20
				5. Buca sotto Martignana	3	0
				6. Buca di Mocesì	6	16.7
		<i>lanzai</i>	100	7. Buca delle Fate di Coreglia Antelminelli	7	100
		<i>intermedius</i>	50	8. Buca delle Fate di San Martino in Freddana	4	50
		<i>rasettii</i>	70	9. Buca delle Fate di Compignano	4	50
				10. Buca Tana di Maggiano	6	50
<i>D. jureceki</i>	92.3	<i>jureceki</i>	85.7	11. Buca delle Fate di Alpe Piana	7	85.7
		<i>maginianus</i>	66.7	12. Buca dei Massi Neri	6	66.7
				13. Passo Sambuca	2	-
<i>D. minozzii</i>	91.2	<i>minozzii</i>	100	14. Grotta di Santa Maria Maddalena di Vallestra	4	100
		<i>aspettati</i>	66.7	15. Grotta delle Fate di Lago Pratignano	6	66.7
		<i>mugellii</i>	66.7	16. Grotta Bologna	6	66.7
		<i>magrinii</i>	66.6	17. Buca di Nadia	6	33.3
				18. Tecchia di Calabbiana	6	33.3
		<i>bernii</i>	66.7	19. Buca della Ghiandaia	6	66.7
<i>D. andreinii</i>	75.0		75	20. Tana di Magnano	6	83.3
				21. Tana del Pollone di Magnano	6	50

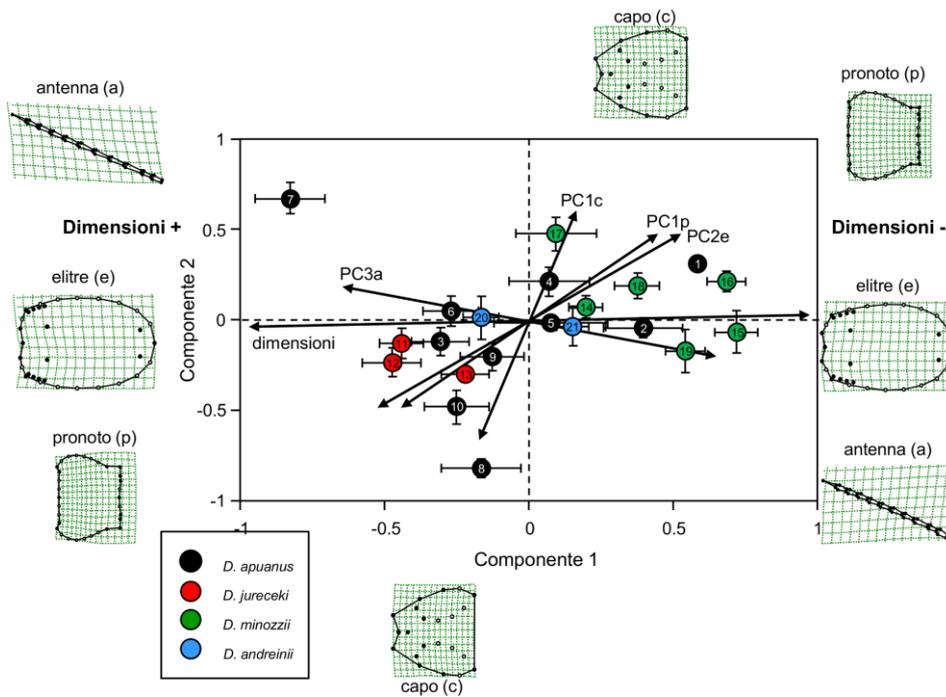


Fig. 5 Prima e seconda componente della *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLSDA) applicata ai caratteri morfologici di *Duvalius*. I numeri all'interno dei cerchi indicano i siti di campionamento (vedi Figura 1 e Tabella 1). Per ciascun sito di campionamento è riportata la deviazione standard dei valori delle componenti. Le frecce indicano il contributo positivo e negativo delle PC e delle dimensioni alle componenti della PLSDA. Le variazioni di forma delle strutture morfologiche sono mostrate attraverso griglie di deformazione (*thin-plate spline deformation grids*). Antenne: forma allungata vs. tozza; pronoto: allungamento vs. accorciamento, diversa forma della parte basale; elitre: posizione delle setole discali rispetto a quelle laterali; capo: allungamento vs. accorciamento.

La terza componente principale della PLSDA risulta correlata principalmente alla PC3 del pronoto (Fig. 6), che rappresenta una variazione in larghezza e una diversa forma della sua porzione basale. *D. minozzii bernii* (sito n° 19 in Fig. 6) mostra un pronoto largo con parte basale stretta, mentre i campioni di *D. apuanus apuanus* dei siti 2 e 6 presentano pronoto di forma più stretta con porzione basale allargata. I campioni di *D. apuanus* e *D. andreinii* mostrano, rispettivamente, alto e basso livello di variabilità. La maggior parte delle popolazioni di *D. jureceki*, *D. minozzii* e *D. apuanus* risulta ben differenziata rispetto alla terza componente. Entrambe le componenti 3 e 4 sono

correlate principalmente alla PC3 delle elitre. La PC2 e la PC3 delle elitre rappresentano diverse combinazioni della posizione delle setole discali anteriori delle elitre rispetto alle setole laterali e al margine anteriore delle elitre. In particolare, *D. minozzii bernii* è caratterizzato da setole anteriori in posizione più distale rispetto alle setole laterali e al margine anteriore delle elitre.

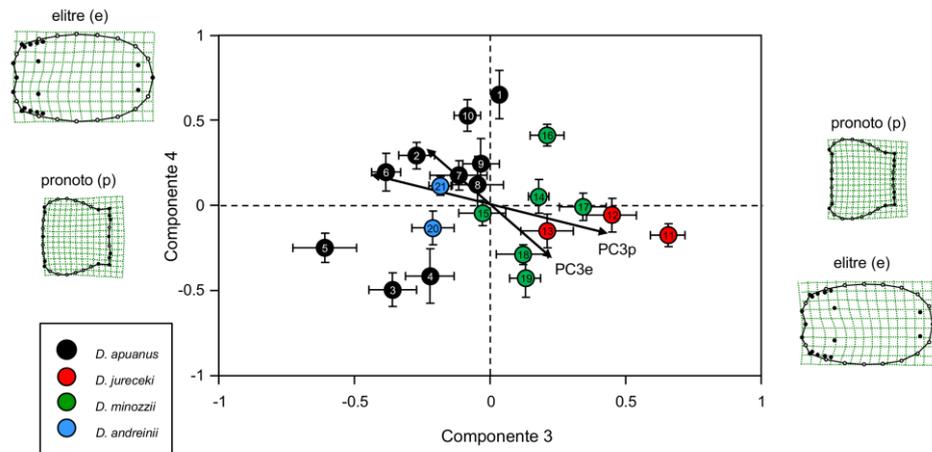


Fig. 6 Terza e quarta componente della *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLSDA) applicata ai caratteri morfologici di *Duvalius*. I numeri all'interno dei cerchi indicano i siti di campionamento (vedi Figura 1 e Tabella 1). Per ciascun sito di campionamento è riportata la deviazione standard dei valori delle componenti. Le frecce indicano il contributo positivo e negativo delle *PCs* e delle dimensioni alle componenti della PLSDA. Le variazioni di forma delle strutture morfologiche sono mostrate attraverso griglie di deformazione (*thin-plate spline deformation grids*). Pronoto: allungamento vs. accorciamento; elitre: posizione delle setole discali rispetto a quelle laterali e rispetto al margine elitrale anteriore.

Discussione

Nel presente studio è stato applicato un approccio di tipo integrato per definire il livello di divergenza tra alcuni coleotteri ipogei appartenenti al genere *Duvalius* dell'Italia centrale ed è stata riscontrata una serie di discrepanze tra dati genetici e morfometrici e rispetto al precedente assetto sistematico del gruppo. Sono stati utilizzati soprattutto campioni museali, che costituiscono una risorsa decisiva sia per le analisi genetiche che morfometriche, soprattutto nel caso di specie rare e difficili da campionare

(Austin & Melville, 2006; Wandeler et al., 2007; Stuart & Fritz, 2008; Crandall et al., 2009). L'analisi filogenetica basata sulle sequenze del gene mitocondriale COII ha evidenziato la presenza di due linee monofiletiche, comprendenti un certo numero di cladi. Le differenze genetiche tra gruppi sono risultate esigue, suggerendo un tempo di divergenza relativamente breve. Questo potrebbe rispecchiare gli eventi geologici relativamente recenti che hanno portato alla formazione delle Alpi Apuane e dell'Appennino Tosco-Emiliano, dove queste specie di *Duvalius* vivono. Infatti, la formazione delle Alpi Apuane risale al Medio e Alto Miocene, con fenomeni carsici risalenti approssimativamente a due milioni di anni fa, mentre la catena appenninica ha avuto uno sviluppo ancora più recente, durante il Plio-Pleistocene (Piccini, 2002; Bartolini, 2003). L'analisi di morfometria geometrica, dall'altro lato, ha riscontrato un alto livello di differenziazione tra campioni raccolti in siti diversi. Sia i risultati dell'analisi genetica che di quella morfometrica non concordano pienamente con l'attuale assetto sistematico del gruppo, ma suggeriscono possibili cambiamenti a livello tassonomico e la definizione di unità evolutive significative, come risultato di rapidi eventi di micro-evoluzione, che sono frequenti nell'ambiente ipogeo (Caccone & Sbordoni, 2001).

L'analisi filogenetica ha individuato una prima linea filetica, ben supportata, che include i campioni di *D. apuanus* e *D. jureceki*, e una seconda linea filetica che comprende i campioni di *D. andreinii* e *D. minozzii*. La distanza media calcolata secondo il criterio della *Maximum Likelihood* tra *D. apuanus* e *D. jureceki* è risultata piuttosto bassa, ma simile ai valori di divergenza riscontrati tra altre specie vicine della sottofamiglia Trechinae (Faille et al., 2010). Somiglianze tra *D. apuanus* e *D. jureceki* erano state sottolineate anche da precedenti studi tassonomici su base morfologica (Magrini, 1997) e alcune sottospecie attualmente attribuite a *D. apuanus* (*D. a. intermedius*, *D. a. rasettii*, e *D. a. lanzai*) erano infatti state originariamente descritte come sottospecie di *D. jureceki*. Tuttavia, la forte monofilia di *D. jureceki* suggerisce che campioni che mostrano tale diversità aplo-tipica possano essere considerati come specie separate. Inoltre, tutti i campioni di *D. jureceki* sono caratterizzati dalla mancanza della seconda setola discale delle elitre, un carattere morfologico finora non riscontrato né in *D. apuanus* né in altre specie italiane di *Duvalius*. Basandosi sui risultati dell'analisi molecolare, dovrebbe essere mantenuta anche l'attuale suddivisione sottospecifica tra *D. j. jureceki* e *D. j. maginianus*. La suddivisione dei campioni di *D. apuanus* in cladi differenti risulta non fortemente supportata, con distanze genetiche intraspecifiche basse. All'interno della seconda linea monofiletica, *D. minozzii* risulta parafiletico e condivide un comune antenato con *D. andreinii*, che dovrebbe quindi essere classificato come conspecifico di *D. minozzii*, seppur mantenendo un distinto stato evolutivo. Anche la differenziazione tra *D. m. minozzii* e *D. m. mugellii* è confermata. Inoltre, *D. minozzi bernii* mostra un significativo livello di divergenza, più alto rispetto ai valori riscontrati tra *D. apuanus* e *D. jureceki*. La

sua differenziazione a livello genetico e la collocazione geografica marginale suggeriscono che potrebbe essere considerato come una specie separata.

Le analisi morfometriche mostrano una forte differenziazione tra i campioni provenienti dai diversi siti e confermano i risultati delle analisi genetiche tranne che in alcuni casi, nei quali i dati morfometrici risultano relativamente in linea con il precedente assetto sistematico del gruppo. In particolare, *D. apuanus* mostra la più alta variabilità di caratteri morfologici tra i campioni dei diversi siti. Nonostante l'analisi genetica non abbia rilevato differenze significative tra *D. apuanus lanzai* e alcuni campioni di *D. apuanus apuanus* inclusi nello stesso clade, *D. apuanus lanzai* risulta invece chiaramente differenziato grazie all'analisi morfometrica. Questo risultato può riflettere la situazione di separazione geografica dovuta alla presenza del Fiume Serchio tra *D. apuanus lanzai* e gli altri campioni di *D. apuanus* provenienti dalle Alpi Apuane (Fig. 1). Anche i campioni di *D. a. rasettii*, *D. a. intermedius*, *D. minozzii aspettatii* e *D. m. magrinii* risultano differenziati nell'analisi morfometrica, mentre non sono state riscontrate chiare divergenze nei dati genetici. *D. andreinii* mostra caratteri morfologici intermedi tra *D. apuanus* e *D. minozzii* e presenta il più basso livello di caratterizzazione morfologica, con il 25% di errori nell'assegnazione dei campioni alla specie. Questo risultato è confermato dall'analisi filogenetica e mette in discussione la precedente definizione di *D. andreinii* come specie separata. Concordanza tra i risultati genetici e morfometrici e dati biogeografici è stata riscontrata anche per altre unità tassonomiche, come nel caso di *D. minozzi berni*.

L'integrazione tra analisi genetiche e morfometriche ha quindi in parte confermato la precedente classificazione dei taxa del gruppo *andreinii* all'interno del genere *Duvalius*. Questi risultati potrebbero permettere una revisione sistematica alla luce di un concetto di specie unificato (de Queiroz, 2007), sebbene l'isolamento riproduttivo sia difficile da verificare per i taxa in questione, che rappresentano entità strettamente vicarianti, che non hanno la possibilità di incrociarsi. Le categorie sottospecifiche possono essere sostenute nel caso siano rappresentate da gruppi allopatrici, fenotipicamente distinti, con precisi caratteri genetici, in alcuni casi anche in assenza di reciproca monofilia (Braby et al., 2012). La definizione di tali unità tassonomiche come rappresentative della biodiversità intraspecifica è di grande importanza per la tutela del genere *Duvalius* e per la conservazione di unità evolutive distinte, concetto proposto come approccio obiettivo per dare priorità alla protezione a livello intraspecifico (Ryder, 1986; Moritz, 2002). La prova a livello genetico dell'esistenza di unità evolutive significative è spesso basata sia su sequenze di DNA non codificante, sia su geni coinvolti in processi metabolici generali, che possono non essere sottoposti a rapida selezione dovuta a forte pressione in micro-habitat particolari; per questo anche caratteri ecologici, morfologici e demografici sono considerati cruciali per la definizione di tali unità e per la conservazione della biodiversità (Vogler & DeSalle, 1994; Crandall, 2000; Fraser & Bernatchez, 2001). Da questo punto di vista, la morfometria mantiene

un ruolo importante nello studio dei meccanismi di speciazione, dato che un elevato numero di caratteri morfologici adattativi dipende da geni sottoposti a forte pressione selettiva. I caratteri morfologici possono evolvere in tempi relativamente brevi in ecosistemi con forte pressione selettiva (Caccone & Sbordonì, 2001). Le specie ipogee di coleotteri, in particolar modo nei Trechinae e Cholevidae, mostrano modificazioni morfologiche e fisiologiche che possono essere interpretate come adattamenti convergenti all'ambiente sotterraneo (Caccone & Sbordonì, 2001; Faille et al., 2010). Alcuni caratteri che distinguono i campioni dei diversi siti, come il complessivo allungamento delle strutture (ad es. le antenne), sono tra i principali caratteri usati per diagnosticare diversi livelli di adattamento alla vita ipogea (Barr & Holsinger, 1985; Culver et al., 1990). Questa ricerca fornisce un esempio di specie che mostrano adattamenti alla vita ipogea particolarmente marcati per alcuni caratteri morfologici, ma meno per altri. Per esempio, *D. jureceki* presenta antenne e capo di forma allungata, ma pronoto piuttosto corto; *D. minozzi* ha capo allungato ma antenne corte, mentre i diversi campioni di *D. apuanus* rappresentano nel loro insieme la maggior parte dei gradi di variazione trovati nelle altre specie. Tuttavia, è stata riscontrata una certa combinazione di caratteri morfologici che permette di distinguere la maggior parte dei campioni dei diversi siti, suggerendo fenomeni di micro-adattamento agli habitat delle diverse grotte e/o forte effetto deriva causato da lungo isolamento.

La rarità, la distribuzione limitata e gli adattamenti morfologici e fisiologici che permettono la colonizzazione dell'ambiente sotterraneo rendono i coleotteri ipogei particolarmente suscettibili ai cambiamenti dell'habitat (Culver, 1970, Slaney & Weinstein, 1997). Le principali minacce agli ecosistemi ipogei includono l'alterazione del flusso delle acque sotterranee, l'inquinamento, la rimozione di fonti di cibo, il disturbo dovuto al turismo speleologico e l'eccessivo prelievo di individui (Reboleira et al., 2011). Vaste aree degli Appennini settentrionali sono protette dalla legge. Tuttavia, solo otto dei 21 siti considerati in questo studio fanno attualmente parte di riserve naturali. Di particolare interesse conservazionistico sono i campioni provenienti dalle grotte 3, 7 e 14, attribuiti rispettivamente a *Duvalius apuanus apuanus*, *D. apuanus lanzai* e *D. andreinii* (o taxon rivisto), tutti siti non compresi in aree protette. In Toscana e Emilia-Romagna, l'applicazione della protezione per molti gruppi di insetti, inclusi i coleotteri del genere *Duvalius*, è spesso ostacolata dalle difficoltà nel fornire informazioni complete e aggiornate sui siti che ospitano taxa distinti o unità significative per la conservazione.

La presente ricerca costituisce un esempio su come l'integrazione tra analisi molecolari e morfometriche possa contribuire a migliorare la conoscenza su modelli specifici della biodiversità degli insetti e sostiene l'importanza di dedicare gli sforzi di protezione all'intera rete degli ecosistemi ipogei (Sharratt et al., 2000).

Ringraziamenti

Si ringraziano Marco Bastianini, Giovanni Bertagni, Corrado Busi, Augusto Degiovanni, Andrea Petrioli e Stefano Taiti per aver concesso l'accesso alle loro collezioni private di *Duvalius* e Chiara Natali per l'aiuto durante il lavoro di laboratorio. Leonardo Piccini ha fornito utili informazioni sulla storia geologica degli Appennini e della Alpi Apuane. Si ringrazia Saulo Bambi per le immagini dei campioni di *Duvalius* usate per l'analisi morfometrica e Saverio Vicario per i costruttivi commenti sull'analisi filogenetica.

Bibliografia

- Austin, J.J. & Melville, J.** 2006. Incorporating historical museum specimens into molecular systematic and conservation genetics research. *Molecular ecology notes*, **6**, 1089-1092.
- Barr, T.C. & Holsinger, J.R.** 1985. Speciation in cave faunas. *Annual review of ecology and systematic*, **16**, 313-337.
- Bartolini, C.** 2003. When did the Northern Apennine become a mountain chain? *Quaternary International*, **101-102**, 75-80.
- Bluemel, J.K., King, R.A., Virant-Doberlet, M. & Symondson, W.O.C.** 2011. Primers for identification of type and other archived specimens of Aphrodes leafhoppers (Hemiptera, Cicadellidae). *Molecular ecology resources*, **11**, 770-774.
- Bookstein, F.L.** 1991. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, New York.
- Bookstein, F.L.** 1997. Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, **1**, 225-243.
- Braby, M.F., Eastwood, R. & Murray, N.** 2012. The subspecies concept in butterflies: has its application in taxonomy and conservation biology outlived its usefulness? *Biological journal of the Linnean Society*, **106**, 699-716.
- Caccone, A. & Sbordoni, V.** 2001. Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from Bathysciine beetles. *Evolution*, **55**, 122-130.
- Casale, A. & Laneyrie, R.** 1982. Trechodinae et Trechinae du monde. Tableau des sous-familles, tribus, series phylétiques, genres, et catalogue général des espèces. *Mémoires de Biospéologie*, **9**, 1-226.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M. & Wayne, R.K.** 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 290-295.

- Crandall, K.A., Robison, H.W. & Buhay, J.E.** 2009. Avoidance of extinction through nonexistence: the use of museum specimens and molecular genetics to determine the taxonomic status of an endangered freshwater crayfish. *Conservation Genetics*, **10**, 177-189.
- Culver, D.C.** 1970. Analysis of simple cave communities: niche separation and species packing. *Ecology*, **51**, 949-958.
- Culver, D.C., Kane, T.C., Fong, D.W., Jones, R., Taylor, M.A. & Sauereisen, S.C.** 1990. Morphology of cave organisms - is it adaptative? *Mémoires de Biospéologie*, **17**, 13-26.
- Dayrat, B.** 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean Society*, **85**, 407-415.
- De Queiroz, K.** 2007. Species concept and species delimitation. *Systematic Biology*, **56**, 879-886.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L.** 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.
- Faille, A., Casale, A. & Ribera, I.** 2011. Phylogenetic relationships of Western Mediterranean subterranean Trechini groundbeetles (Coleoptera: Carabidae). *Zoologica scripta*, **40**, 282-295.
- Faille, A., Ribera, I., Deharveng, L., Bourdeau, C., Garnery, L., Quéinnec, E. & Deuve, T.** 2010. A molecular phylogeny shows the single origin of the Pyrenean subterranean Trechini ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 97-106.
- Fraser, D.J. & Bernatchez, L.** 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, **10**, 2741-2752.
- Gilbert, M.T.P., Bandelt, H.J., Hofreiter, M. & Barnes, I.** 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 541-544.
- Guindon, S. & Gascuel, O.** 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696-704.
- Hajibabaei, M., deWaard, J.R., Ivanova, N.V., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Kirk, S.L., Mackie, P.M. & Hebert, P.D.N.** 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1959-1967.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.** 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160-174.
- Hausdorf, B.** 2011. Progress toward a general species concept. *Evolution*, **65**, 923-931.
- Jeannel, R.** 1928. Monographie des Trechinae. Morphologie comparée et distribution d'un groupe de Coléoptères. Troisième Livraison: les Trechini cavernicoles. *L'Abeille*, **35**, 1-808.

- Juan, C. & Emerson, B.C.** 2010. Evolution underground: shedding light on the diversification of subterranean insects. *Journal of Biology*, **9**, 17.
- Juan, C., Guzik, M.T., Jaume, D. & Cooper, S.J.B.** 2010. Evolution in caves: Darwin's "wrecks of ancient life" in the molecular era. *Molecular Ecology*, **19**, 3865-3880.
- Juberthie, C.** 1983. Le milieu souterrain: étendue et composition. *Mémoires de Biospéologie*, **10**, 17-65.
- Klingenberg, C.P.** 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 353-357.
- Lakner, C., Van der Mark, P., Huelsenbeck, J.P., Larget, B. & Ronquist, F.** 2008. Efficiency of Markov Chain Monte Carlo Tree Proposals in Bayesian Phylogenetics. *Systematic Biology*, **57**, 86-103.
- Magrini, P.** 1997. Les *Duvalius* et leur complexe évolutif. Espèces Françaises, Italiennes & Parasites. Troisième partie (Les espèces Italiennes). *Comptes-Rendus du Laboratoire d'Entomologie Faune Hypogée et Endogée*, **2**, 202-292.
- Magrini, P.** 1998. Les *Duvalius* et leur complexe évolutif. Atlas biogéographique. Deuxième partie (Les espèces Italiennes). *Comptes-Rendus du Laboratoire d'Entomologie Faune Hypogée et Endogée*, **3**, 55-150.
- Mitchell, D., Willerslev, E. & Hansen, A.** 2005. Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research*, **571**, 265-276.
- Mitteroecker, P. & Bookstein, F.L.** 2011. Linear discrimination, ordination, and the visualization of selection gradients in modern morphometrics. *Evolutionary Biology*, **38**, 100-114.
- Moravec, P., Uéno, S.-I. & Belousov, I.A.** 2003. Tribe Trechini Bonelli, 1810. In: *Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Archostemata-Myxophaga-Adephaga* (Ed. by I. Löbl & A. Smetana) pp. 288-346. Vol. **1**, Apollo Books, Stenstrup.
- Moritz, C.** 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238-254.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M.** 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, **7**, 16.
- Page, R.D.M.** 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- Petit, R.J. & Excoffier, L.** 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 386-393.
- Piccini, L.** 2002. *The Plio-Pleistocene evolution of karst in Tuscany. Le voragini catastrofiche. Un Nuovo problema per la Toscana*. Edizioni Regione Toscana, Firenze.
- Posada, D.** 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253-1256.

- Reboleira, A.S.P.S., Borges, P.A.V., Gonçalves, F., Serrano, A.R.M. & Oromí, P.** 2011. The subterranean fauna of a biodiversity hotspot region - Portugal: an overview and its conservation. *International Journal of Speleology*, **40**, 23-37.
- Rohlf, F.J.** 2010a. *tpsDig, version 2.16*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, NY
- Rohlf, F.J.** 2010b. *tpsUtil, version 1.46*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, NY
- Rohlf, F.J.** 2010c. *tpsRelw, version 1.49*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, NY
- Ronquist, F. & Deans, A.R.** 2010. Bayesian Phylogenetics and Its Influence on Insect Systematics. *Annual Review of Entomology*, **55**, 189-206.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572-1574.
- Ryder, O.A.** 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, **1**, 9-10.
- Sambrook, J. & Russell, D.W.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. & Crozier, R.H.** 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, **55**, 421-438.
- Sharratt, N.J., Picker, M.D. & Samways, M.J.** 2000. The invertebrate fauna of the sandstone caves of the Cape Peninsula (South Africa): patterns of endemism and conservation priorities. *Biodiversity and Conservation*, **9**, 107-143.
- Sheffield, N.C., Song, H., Cameron, S.L. & Whiting, M.F.** 2008. A Comparative Analysis of Mitochondrial Genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and Genome Descriptions of Six New Beetles. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 2499-2509.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-701.
- Slaney, D.P. & Weinstein, P.** 1997. Conservation of cave fauna: more than just bats. *Memoirs of the Museum of Victoria*, **56**, 591-596.
- Sperling, F. & Roe, A.** 2009. Molecular dimensions of insect taxonomy. In: *Insect Biodiversity: Science and Society* (Ed. by R.G. Footitt & P.H. Adler) pp. 397-415. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Stoeckle, B.C., Dworschak, K., Gossner, M.M. & Kuehn, R.** 2010. Influence of arthropod sampling solutions on insect genotyping reliability. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **135**, 217-223.
- Stuart, B.L. & Fritz, U.** 2008. Historical DNA from museum type specimens clarifies diversity of Asian leaf turtles (*Cyclemys*). *Biological journal of the Linnean Society*, **94**, 131-141.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Van Houdt, J.K.J., Breman, F.C., Virgilio, M. & De Meyer, M.** 2010. Recovering full DNA barcodes from natural history collections of Tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 459-465.
- Vandel, A.** 1964. *Biospéologie. La Biologie des Animaux Cavernicoles*. Gauthier-Villars, Paris.
- Vogler, A.P. & Monaghan, M.T.** 2007. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **45**, 1-10.
- Vogler, A.P. & DeSalle, R.** 1994. Diagnosing units of conservation management. *Conservation Biology*, **6**, 170-178.
- Wandeler, P., Hoeck, P.E.A. & Keller, L.F.** 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 634-642.
- Zimmermann, J., Hajibabaei, M., Blackburn, D.C., Hanken, J., Cantin, E., Posfai, J. & Evans, T.C.** 2008. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. *Frontiers in Zoology*, **5**, 18.

4. 2° CASO DI STUDIO: Valutazione della distinzione specifica e analisi della zona di contatto tra le due entità criptiche recentemente distinte su base morfologica *Zerynthia polyxena* e *Z. cassandra*

Riassunto

Vi sono crescenti prove che la maggior parte dei taxa criptici parapatrici sono riproduttivamente compatibili nelle loro aree di contatto. Di conseguenza, il concetto biologico di specie, che assume l'assenza di ibridazione, sta diventando un criterio non più così efficace nel campo dell'ecologia evolutiva. Tuttavia, le poche specie sorelle parapatriche che presentano barriere riproduttive complete rappresentano modelli interessanti per studiare i processi di speciazione e l'evoluzione dell'isolamento riproduttivo. In questa ricerca sono state studiate le popolazioni di contatto in Italia nord-occidentale di due specie di lepidotteri, *Zerynthia polyxena* e *Z. cassandra*, caratterizzate da differenti morfotipi dei genitali. Sono stati esaminati i livelli di divergenza tra 21 popolazioni distribuite dalla Sicilia alla Francia usando tre marcatori genetici (i geni mitocondriali COI e ND1 e il gene nucleare wingless) e applicando la morfometria geometrica ai genitali. Inoltre, sono stati applicati modelli di distribuzione delle specie per valutare le diverse esigenze climatiche di *Zerynthia polyxena* e *Z. cassandra*. In seguito, i dati climatici sono stati proiettati nello scenario dell'Ultimo Massimo Glaciale, per verificare se e in che misura i cicli glaciali possano aver contribuito al processo di speciazione. Le analisi genetiche e morfometriche hanno identificato due gruppi principali. Tutti i campioni hanno mostrato uno schema di diversificazione concordante, inclusi gli individui campionati nell'area di contatto. La distribuzione degli aplotipi e i modelli climatici hanno mostrato che durante l'Ultimo Massimo Glaciale entrambe le specie hanno subito una forte contrazione degli areali e presumibilmente sono rimaste separate in diversi micro-rifugi in Francia meridionale, Italia settentrionale e centrale e sull'Isola d'Elba e in Sicilia. La separazione è stata probabilmente favorita dalla ridotta capacità di dispersione e dall'alta filopatria, mentre la diversificazione dei genitali ha probabilmente favorito l'assenza di ibridazione. Al contrario, la colorazione aposematica delle ali è rimasta praticamente identica. I risultati di questa ricerca sono stati confrontati con quelli ottenuti per altre specie, concludendo che *Zerynthia polyxena* e *Z. cassandra* rappresentano un prezioso modello per lo studio dei processi di speciazione.

Introduzione

Nelle specie biparentali lo scambio di geni attraverso le popolazioni è strettamente legato all'accoppiamento e alla produzione di prole fertile. Per questo motivo, il concetto biologico, che identifica le specie come gruppi di individui riproduttivamente isolati (Mayr, 1942) ha ricevuto largo supporto dagli ecologi e dai biologi evolutivisti. Tuttavia, studi a carattere molecolare hanno dimostrato che l'ibridazione e l'introgresione tra specie fortemente comprovate è un evento relativamente comune, soprattutto nelle zone di contatto tra specie sorelle parapatriche (ad es. Mallet, 2005; Currat et al., 2008; Descimon & Mallet, 2009; Excoffier et al., 2009; Heliconius Genome Consortium, 2012). Ciò ha reso più debole l'assunto del completo isolamento riproduttivo e sono stati introdotti nuovi concetti di specie (Hausdorf, 2011). Teorie recenti suggeriscono che le specie possano differenziarsi anche in presenza di ibridazione, a condizione che alcuni geni legati a fitness differenziale o a interazioni sessuali vengano scambiati con bassa frequenza (Mallet, 1995, 2008; Wu, 2001; Coyne & Orr, 2004; Hausdorf, 2011). Nei lepidotteri, d'altronde, geni adattativi possono essere scambiati tra specie anche per milioni di anni dopo gli eventi di speciazione (Heliconius Genome Consortium, 2012). Le zone di contatto tra specie sorelle e criptiche rappresentano eccellenti modelli per studiare i processi di speciazione, in particolar modo quando possono essere messe a confronto specie che mostrano completo isolamento riproduttivo e/o barriere riproduttive altamente permeabili (Descimon & Mallet, 2009). I lepidotteri europei sono spesso usati come organismi modello per studi di questo tipo (Friberg et al., 2008; Descimon & Mallet, 2009; Dincă et al., 2011a). Tuttavia, gli studi comparativi sono stati ostacolati dall'alta percentuale di specie sorelle che mostrano barriere riproduttive deboli. Una recente revisione dell'intera fauna lepidotterologica europea ha mostrato che il 16% di 440 specie si ibrida in natura, spesso producendo ibridi fertili, e che specie sorelle parapatriche sono quasi sempre coinvolte in questo processo (Descimon & Mallet, 2009).

Un'eccezione scoperta recentemente è rappresentata dalle specie sorelle criptiche riproduttivamente isolate del genere *Leptidea*, caratterizzate da aspetto identico e divergenza genetica relativamente bassa (Lorković, 1993; Friberg et al., 2008; Dincă et al., 2011a). Il completo isolamento riproduttivo raggiunto in tempi relativamente brevi (tra i 270.000 e i 120.000 anni) e in assenza di caratteri esterni divergenti (Friberg et al., 2008; Dincă et al., 2011a) è stato considerato come prova di un "delitto perfetto" da Descimon & Mallet (2009). Le specie che mostrano questo schema sono perciò viste come eccellenti modelli per studiare l'evoluzione dei lepidotteri (Mallet, 2008; Descimon & Mallet, 2009; Dincă et al., 2011a).

Basandosi sull'analisi delle strutture dei genitali maschili, Dapporto (2010) ha identificato due morfotipi completamente distinti all'interno della specie largamente riconosciuta *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera, Papilionidae).

Un morfotipo si trova solo in Italia nell'area appenninica (*Z. cassandra*), mentre l'altro è presente nelle restanti popolazioni dell'Europa meridionale e centrale (*Z. polyxena*). Questi morfotipi giungono a stretto contatto nell'Italia nord-occidentale, dove oltretutto vivono in simpatria nell'area del Monte Beigua, senza nessuna evidenza di individui morfologicamente intermedi (Dapporto, 2010). I dati genetici sono scarsi, in quanto rappresentati dalle sequenze del gene mitocondriale COI per due soli campioni provenienti dall'areale di *Z. cassandra*, senza informazioni sulla forma dei loro genitali (Nazari & Sperling, 2007). Questi due campioni mostrano una divergenza pari a circa il 2% rispetto agli altri individui europei.

In questo lavoro, è stato valutato il livello di divergenza genetica e di introgressione nell'area di contatto tra *Z. cassandra* e *Z. polyxena*, integrando l'analisi morfometrica dei genitali con l'analisi delle sequenze di un marcatore nucleare e due marcatori mitocondriali. Inoltre, sono stati applicati modelli di distribuzione delle specie per verificare se gli areali attuali sono legati a differenze climatiche. Queste differenze sono state poi proiettate nello scenario climatico ricostruito per l'Ultimo Massimo Glaciale, per valutare in che misura i cambiamenti di distribuzione dovuti a eventi climatici possano essere stati responsabili dell'isolamento genetico a lungo termine. Considerando le nette differenze nella morfologia dei genitali, l'identica colorazione aposematica delle ali e la ben definita area di contatto tra *Z. cassandra* and *Z. polyxena*, nuove prove di variazione genetica e preferenze climatiche potrebbero indicare se queste specie sono con buona probabilità riproduttivamente separate e quali fattori possono aver determinato l'attuale distribuzione. Questi dati possono anche indicare se le specie sorelle prese in esame possono rappresentare un importante modello per studi evoluti sui lepidotteri.

Materiali e metodi

Morfometria geometrica

L'analisi morfometrica è stata condotta su 217 campioni maschi di *Zerynthia polyxena* e *Z. cassandra* provenienti dall'Italia e dalla Francia meridionale. Questi campioni includono 186 individui precedentemente analizzati da Dapporto (2010). Il permesso per raccogliere specie inserite nell'allegato IV della Direttiva Habitat 92/43/EEC è stato fornito dal Ministero Italiano per l'Ambiente (U. prot PNM-2011-0010400-13/05/2011). Altri campioni provengono da Musei e Istituti di Ricerca (Tab. 2 in Appendice). Tutti i campioni sono depositati in collezioni pubbliche. *Landmarks* e *sliding semi-landmarks* (Bookstein, 1997) sono stati posizionati sulla sezione laterale delle valve usando il programma TPS (*thin-plate spline*). Sei punti lungo il margine della valva sono stati considerati come *landmarks*, mentre altri 24 punti sono

stati definiti come *sliding semi-landmarks*, che possono slittare lungo il contorno (Bookstein, 1997) (Fig. 1).

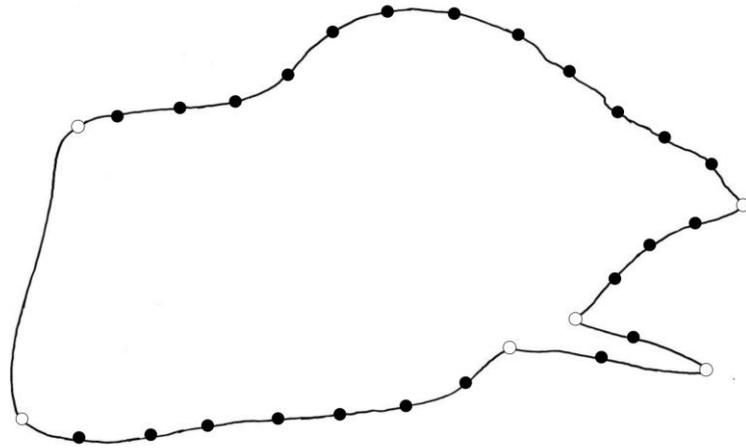


Fig. 1 Rappresentazione schematica dei *landmarks* (cerchi bianchi) e *sliding semi-landmarks* (cerchi neri) considerati nell'analisi morfometrica.

La digitalizzazione e la definizione degli *sliders* è stata effettuata rispettivamente attraverso i programmi TPSDIG 2.16 (Rohlf, 2010a) e TPSUTIL 1.53 (Rohlf, 2012). Una *generalized procrustes analysis* (GPA) è stata applicata ai *landmarks* per rimuovere le variazioni dovute a posizione, orientamento e grandezza e per sovrapporre gli oggetti in un sistema di coordinate comune (Bookstein, 1997). Le *partial warps* sono state calcolate con i residui della *generalized procrustes analysis* usando TPSRELW 1.49 (Rohlf, 2010b). Le *Relative warps* (PCs) sono state ottenute attraverso un'analisi delle componenti principali effettuata sulle *partial warps* e sono state visualizzate mediante griglie di deformazione (*thin-plate spline –TPS- deformation grids*), che permettono il confronto delle differenze di forma. Le *relative warps* sono state utilizzate in un'analisi *partitioning around medioids* (PAM) attraverso il “pacchetto R”, allo scopo di identificare il numero più probabile di morfotipi all'interno del campione, come suggerito da Borcard et al. (2011). È stato costruito un numero di gruppi di campioni variabile da 2 a 216 e poi selezionato la partizione che mostrava il valore più alto come quella indicante il numero più idoneo di morfotipi.

Per l'analisi genetica è stato utilizzato un sottoinsieme di 100 campioni di *Z. polyxena* e *Z. cassandra* (Tab. 2 in Appendice). Il DNA è stato estratto usando il metodo standard fenolo-cloroformio. Sono stati sequenziati e confrontati due geni mitocondriali e un gene nucleare. L'intera lunghezza della regione "barcode" (657pb) del gene mitocondriale citocromo c ossidasi subunità I (COI) è stata amplificata e sequenziata utilizzando la coppia di primer Parn_Zer_F1439 (5' - ATCGCTTATACTCAGCCATC - 3') e Parn_Zer_R2185 (5' - GGGAAATTATTCCAAATCCTG - 3') disegnati rispettivamente sul gene codificante il tRNA per la Tirosina e sul gene COI, usando una sequenza consenso tra le sequenze del COI di *Z. polyxena* e *Parnassius bremeri* (Nazari et al., 2007; Kim et al., 2009). I numeri dei primer si riferiscono all'estremità 3' della sequenza del genoma mitocondriale di *Parnassius bremeri* pubblicata da Kim et al. (2009). Un frammento di 472 pb del gene mitocondriale NADH deidrogenasi subunità 1 (ND1) è stato amplificato e sequenziato usando primer per PCR descritti da (Aubert et al., 1999). Infine, l'amplificazione e il sequenziamento di un frammento di 393 pb del gene nucleare wingless (wg) sono state ottenute usando la coppia di primer wg_F29 (5' - CAGTAAAGACTTGCTGGATGC - 3') e wg_R382 (5' - TGCACCTTTC AACCAAC - 3'), disegnati appositamente per questo lavoro. I numeri di questi primer si riferiscono all'estremità 3' della sequenza parziale del gene wingless pubblicata da Nazari et al. (2007).

L'amplificazione tramite reazione di polimerizzazione a catena (PCR) è stata condotta in un volume di reazione totale di 25 µl, contenente 1-5 µl di DNA estratto, 1 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM di ciascun dNTP, 0.5 µM di ciascun primer e 1 unità di *Taq* DNA polimerasi (Invitrogen). Il profilo termico per l'amplificazione del COI ha compreso una fase iniziale di denaturazione di 5 min a 94 °C, seguita da 35 cicli di 30 sec a 94 °C, 30 sec a 50°C e 90 sec a 72 °C, con una fase finale di estensione di 7 min a 72 °C. Il profilo termico per l'amplificazione del ND1 e del wg ha compreso una fase iniziale di denaturazione di 5 min a 94 °C, seguita da 35 cicli di 30 sec a 94 °C, 30 sec a 52 °C e 60 sec a 72 °C, con una fase finale di estensione di 7 min a 72 °C. I campioni per i quali il prodotto della PCR è risultato scarso sono stati nuovamente amplificati usando 1 µl di DNA estratto, 1 x Restorase buffer, 200 µM di ciascun dNTP, 0.5 µM di ciascun primer e 1.25 unità di Restorase DNA polimerasi (Sigma-Aldrich), una miscela contenente una *Taq* polimerasi di alta qualità e un enzima riparatore del DNA, la cui efficacia nell'amplificazione di DNA danneggiato è stata dimostrata (Hajibabaei et al., 2005). La miscela per la PCR è stata incubata per 15 min a 37 °C e poi per 5 min a 72 °C. Quindi, prima dell'amplificazione, i primer sono stati aggiunti alla miscela. Il profilo termico per la PCR ha compreso una fase iniziale di denaturazione di 2 min a 94 °C, seguita da 40 cicli di 30 sec a 94 °C, 30 sec a 50-52 °C e 60 sec a 72 °C, con una fase finale di estensione a 72 °C per 5 min. I prodotti della PCR sono stati

sequenziati con BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) secondo il protocollo indicato dal produttore. I prodotti della reazione di sequenza sono stati risolti tramite un analizzatore automatico di acidi nucleici ad elettroforesi capillare ABI3100 (Applied Biosystems) e le sequenze complementari ottenute sono state allineate tramite il programma CodonCode Aligner 3.0.1 (CodonCode Corporation). Le sequenze consenso risultanti consistono, rispettivamente, in un totale di 657, 438 e 348 nucleotidi dei geni COI, ND1 e wg (numeri di accesso in Genbank: KC119707 – KC119746).

Network degli aplotipi e analisi filogenetica

Le sequenze consenso sono state controllate per la presenza di inserzioni, delezioni e codoni stop che potrebbero dar luogo ad una proteina non funzionale. La distanza media intra- e inter-specifica e tra i campioni delle diverse località è stata calcolata secondo il criterio della *Maximum Likelihood* (ML) usando il programma MEGA 5 (Tamura et al., 2011). I network degli aplotipi per i geni COI e ND1 sono stati ricostruiti utilizzando il metodo *median-joining network* (Bandelt et al., 1999) implementato dal programma NETWORK 4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Per ciascun carattere/sito è stato fissato lo stesso peso predefinito (10), data l'assenza di siti ipervariabili. Il valore del parametro Epsilon è stato fissato come 0. È stato usato il metodo *connection cost* per il calcolo delle distanze e applicata l'opzione *Maximum Parsimony* (MP) (Polzin & Daneschmand, 2003) ai risultati ottenuti con il metodo *median-joining*. Nella ricostruzione del network degli aplotipi per il gene COI sono state incluse anche otto sequenze già pubblicate in GenBank di campioni di *Z. polyxena* provenienti da Francia, Romania e Russia (Nazari et al., 2007; Michel et al., 2008; Dincă et al., 2011c).

I modelli di evoluzione molecolare più appropriati per i dati sono stati valutati tramite il programma JMODELTEST (Posada, 2008), utilizzando il *Bayesian Information Criterion*. I valori di *likelihood* di 88 modelli sono stati calcolati utilizzando un'ottimizzazione *Maximum Likelihood* della topologia degli alberi implementata da Phyml (Guindon & Gascuel, 2003). Ciascun modello è stato testato considerando anche la possibilità di avere differenze nelle frequenze nucleotidiche, tassi di sostituzione diversi tra i siti e una proporzione di siti invariabili. I modelli risultati più adatti ai dati sono stati l'*Hasegawa Kishino and Yano model* – HKY (Hasegawa et al., 1985) per il COI, il *Transition model* – TIM (Posada, 2003) per il ND1 e il modello di Kimura a 2 parametri (K80) (Kimura, 1980) per il wingless. Il modello HKY assume composizione in basi variabile e diversi tassi di sostituzione per le transizioni e le trasversioni. Il *Transition model* (TIM) assume frequenza delle basi variabile, tasso di sostituzione variabile per le transizioni e uguale per le trasversioni. Il modello K80 assume tassi di sostituzione diversi per transizioni e trasversioni e stessa frequenza per le basi.

Una *Partitioned Bayesian analysis* è stata applicata alle sequenze combinate del COI, ND1 e wg, includendo solo i campioni per i quali sono stati sequenziati tutti i marcatori. L'analisi Bayesiana è stata condotta usando il metodo *Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo* implementato da MRBAYES 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), applicando il modello di sostituzione nucleotidica risultato più adeguato per ciascuna partizione di dati. I modelli TIM e K80 non possono essere implementati da MRBAYES. Per questo motivo sono stati applicati per il ND1 il *general time-reversible model* – GTR (Tavaré, 1986), che meglio corrisponde alle assunzioni del modello TIM, e per il wg il modello HKY, stabilendo uguale frequenza per le basi. Il modello GTR assume frequenza delle basi variabile e tassi diversi per ciascuna coppia di sostituzioni nucleotidiche. L'analisi è stata condotta attraverso due corse indipendenti, iniziando con valori “a priori” predefiniti, alberi iniziali casuali e quattro catene di Markov. Sono state eseguite 2×10^6 generazioni, campionando ogni 1000 generazioni. La stazionarietà dell'analisi è stata valutata tramite due parametri diagnostici: la *standard deviation of split frequencies between the two simultaneous runs* e il *potential scale reduction factor* (Lakner et al., 2008; Ronquist & Deans, 2010). Il 25% degli alberi prodotti durante le prime generazioni è stato scartato, in modo da usare solo quelli ottenuti dopo che la catena ha raggiunto la stabilità. Gli alberi rimanenti sono stati utilizzati per costruire un albero di consenso maggioritario (50% *majority rule*). Le sequenze dei Papilionidi *Zerynthia rumina*, *Bhutanitis thaidina* e *Allancastria cretica* già pubblicate in GenBank (Nazari et al., 2007; Michel et al., 2008) sono state usate come outgroup. L'albero filogenetico è stato radicato in base alla sequenza di *Bhutanitis thaidina*.

Modelli di distribuzione

Sono stati individuati 334 siti di presenza per *Z. cassandra* e 575 siti per *Z. polyxena* basandosi sulla distribuzione conosciuta per le due specie (Dapporto, 2010; Kudrna et al., 2011; Dapporto & Zinetti, dati non pubblicati). Le 19 variabili *WorldClim* (Hijmans et al., 2005) sono state utilizzate per stimare modelli di distribuzione di massima entropia. È stata applicata una griglia con risoluzione di 0.04 gradi. Dato che queste variabili generalmente risultano collineari, cosa che può indurre errori nei risultati, sono state selezionate 10.000 celle random nella regione Mediterranea che va da 1°00'00” E a 35°00'00” E e da 33°00'00” N a 70°00'00” N. Per ciascuna cella, è stata analizzata la correlazione tra le variabili *WorldClim*; per i casi nei quali due o più variabili mostravano un coefficiente di correlazione di Pearson maggiore di 0.8 è stata quindi selezionata la variabile maggiormente significativa dal punto di vista biologico. Le variabili biologiche sono state selezionate principalmente basandosi sulle cosenze relative alle esigenze delle specie circa l'attività degli adulti e/o estreme condizioni climatiche in cui vivono le larve.

Le distribuzioni potenziali basate sui dati di presenza delle due specie sono state predette usando il programma MAXENT 3.3.2 (<http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent>). Il programma implementa un algoritmo basato sulla massima entropia per identificare aree con condizioni ambientali idonee alle specie (Phillips et al., 2006). Dal momento che un diverso sforzo di campionamento per le diverse aree può produrre falsi segnali di preferenze climatiche (Phillips et al., 2006), è stato applicato un filtro spaziale per selezionare in modo casuale una singola segnalazione per ciascuna cella di dimensioni 0.4 x 0.4 gradi, usando la funzione *gridSample* implementata dal pacchetto R *DISMO*. L'applicazione del filtro ha dato come risultato 117 punti di presenza per *Z. cassandra* e 287 per *Z. polyxena*. Sono state utilizzate le impostazioni predefinite dei parametri. Ciascun modello è stato replicato 100 volte con un *cross-validation test* applicato sul 10% dei dati di presenza. L'efficienza del modello ottenuto è stata valutata utilizzando il valore dell'area sotto la curva (AUC – *area under curve*) ROC (*receiver operating characteristic*). Valori AUC maggiori di 0.7 indicano che le predizioni del modello sono maggiori dei valori casuali e possono essere considerate efficienti (Elith, 2002). L'importanza relativa del contributo delle diverse variabili è stata valutata tramite *jackknife test*, rimuovendo sequenzialmente una delle variabili (Phillips et al., 2006). Sono stati così ricostruiti i modelli di distribuzione delle specie nelle condizioni climatiche attuali e in seguito le distribuzioni attese sono state proiettate sulla ricostruzione dei dati *WorldClim* durante l'Ultimo Massimo Glaciale. Sono stati implementati due modelli, il *Community Climate System Model* (CCSM) e il *Model for Interdisciplinary Research on Climate* (MIROC), ottenuti dal *Paleoclimate Modelling Intercomparison Project Phase II*, usando le stesse variabili dei modelli climatici attuali.

Risultati

Morfometria geometrica

L'analisi dei genitali di 217 individui maschi ha prodotto 52 *relative warps*. L'analisi PMA ha mostrato che la suddivisione in due gruppi ha il valore più alto (Fig. 2a). Questo risultato conferma la distinzione in due morfotipi. L'assegnazione dei campioni operata dall'analisi PMA conferma che tutti gli individui provenienti dall'Italia a sud del Fiume Po formano un primo gruppo (*Z. cassandra*), mentre le altre popolazioni sono incluse nel secondo gruppo (*Z. polyxena*). I campioni provenienti da Monte Beigua si dividono nei due gruppi (Fig. 2b). La variazione di forma lungo la componente principale 1 (che spiega il 35.16% della varianza) e lungo la componente principale 2 (che spiega il 22.63% della varianza) indica che la maggior parte della varianza di forma è a carico dalla lunghezza dell'apice della valva (Fig. 2b).

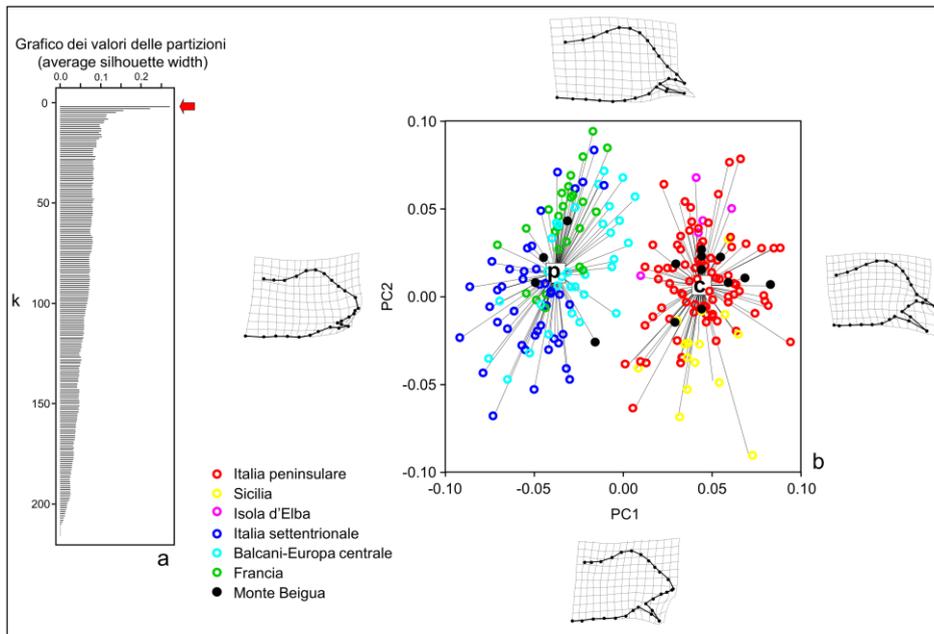


Fig. 2 a) Risultato della *Partitioning Around Medoids (PAM) analysis*. Tra tutte le possibili partizioni, la migliore è quella che assume l'esistenza di due morfotipi. b) Partizione in due gruppi ottenuta dalla PAM e rappresentata tramite le prime due *relative warps* (PC1 e PC2). È mostrata alta concordanza con le origini geografiche per entrambi i morfotipi di *Z. cassandra* (c) e *Z. polyxena* (p), con la sola eccezione per la popolazione del Monte Beigua (cerchi neri), che include individui appartenenti ad entrambe le specie. Griglie di deformazione dei genitali maschili confermano i precedenti risultati sulla diversificazione morfologica tra le due specie studiate (Dapporto, 2010).

Diversità genetica e network degli aplotipi

Un totale di 96 sequenze consenso e 22 aplotipi caratterizzati da 35 siti variabili sono stati ottenuti per il gene COI, mentre 86 sequenze e 14 aplotipi con 23 siti polimorfici per il gene ND1. La sequenza del gene nucleare wg è stata ottenuta per 90 individui. Sono stati individuati quattro genotipi per il wg, caratterizzati da 4 siti polimorfici. Tutti i campioni di *Z. cassandra* mostrano lo stesso genotipo del wg, mentre per *Z. polyxena* sono stati trovati tre diversi genotipi. Tre campioni di *Z. polyxena* sono risultati eterozigoti per due siti polimorfici. La distanza media tra specie calcolata secondo la *Maximum Likelihood* è risultata maggiore di quella interspecifica per tutti i marcatori (Tab. 1).

Tab. 1 Diversità genetica dei geni COI, ND1 e wingless in *Zerynthia cassandra* e *Z. polyxena*. Per ciascuna specie sono riportati: numero di individui per il quale sono state ottenute sequenze consenso (*N*), numero di aplotipi o genotipi (*h*) e frequenza media di A+T. Sono riportate anche le distanze medie inter- e intra-specifiche calcolate attraverso il metodo della *Maximum Likelihood* (ML).

	<i>Zerynthia cassandra</i>			<i>Zerynthia polyxena</i>			ML inter-specifica	ML intra-specifica
	<i>N</i>	<i>h</i>	A+T	<i>N</i>	<i>h</i>	A+T		
COI	74	12	0.71	22	10	0.71	0.014±0.005	0.006±0.002
ND1	75	10	0.77	11	4	0.78	0.032±0.008	0.011±0.003
wg	71	1	0.46	19	3	0.46	0.010±0.005	0.004±0.002

Nel network ricostruito con gli aplotipi del COI *Z. cassandra* e *Z. polyxena* risultano separate da un minimo di 13 mutazioni (tra l'aplotipo C2 e C14, Fig. 3a). C1 è l'aplotipo più comune per *Z. cassandra* e anche l'unico aplotipo di questa specie ritrovato a nord della Toscana. Il secondo aplotipo più comune (C2) è presente in Italia meridionale ed è l'unico presente sull'Isola d'Elba. Altri aplotipi di *Z. cassandra* sono presenti in Italia centrale e meridionale. Il network ricostruito con gli aplotipi del COI per *Z. polyxena* mostra due gruppi principali. Il primo include gli aplotipi della Francia, mentre il secondo comprende aplotipi dell'Est Europa e dell'Italia settentrionale (Fig. 3a). Un aplotipo presente in Francia è stato trovato anche nel nord Italia. Il network ricostruito con gli aplotipi del ND1 mostra uno schema simile, con gli aplotipi di *Z. cassandra* e *Z. polyxena* separati da un minimo di 10 mutazioni (tra gli aplotipi N6-N8 e N11, Fig. 3b). N1 è l'aplotipo di *Z. cassandra* più comune, presente in Italia settentrionale e centrale. Il secondo aplotipo più comune (N2) è presente dalla Toscana alla Sicilia. Il network del ND1 conferma la divisione degli aplotipi di *Z. polyxena* in due gruppi, uno francese e uno per il nord Italia. Il campione italiano che presenta l'aplotipo francese per il COI, presenta anche un aplotipo francese per il ND1. Tutti gli individui provenienti dalla Francia e dalla regione alpina italiana mostrano aplotipi di *Z. polyxena*, confermando i risultati della morfometria geometrica (Fig. 3c). Dall'altro lato, tutti gli individui italiani a sud del Po sono caratterizzati da aplotipi di *Z. cassandra* per tutti i marcatori, ad eccezione dei campioni provenienti dal Monte Beigua, dove aplotipi di entrambi i taxa sono presenti in simpatria, ma comunque separati, in accordo con l'analisi morfometrica (Fig. 3c).

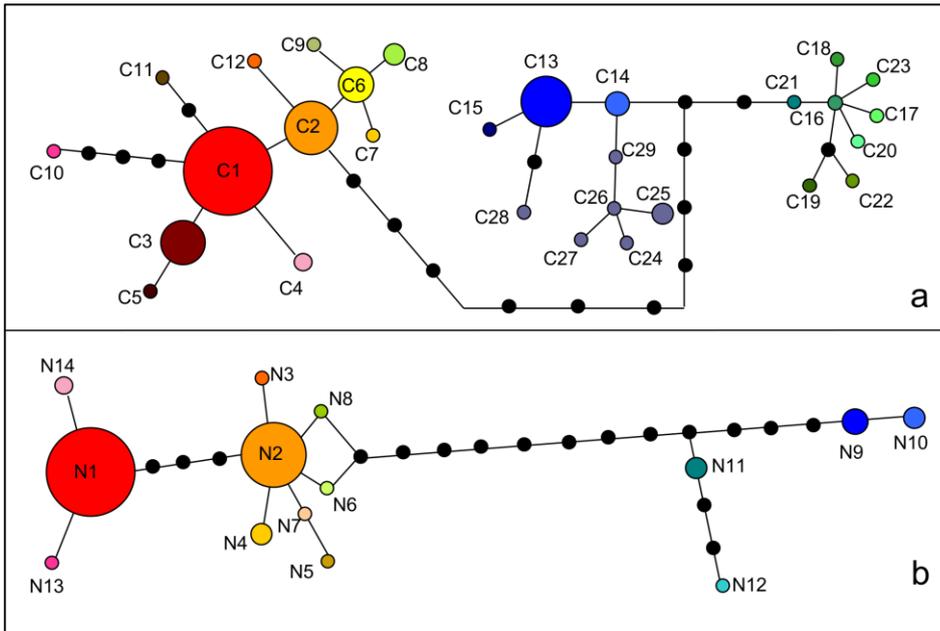
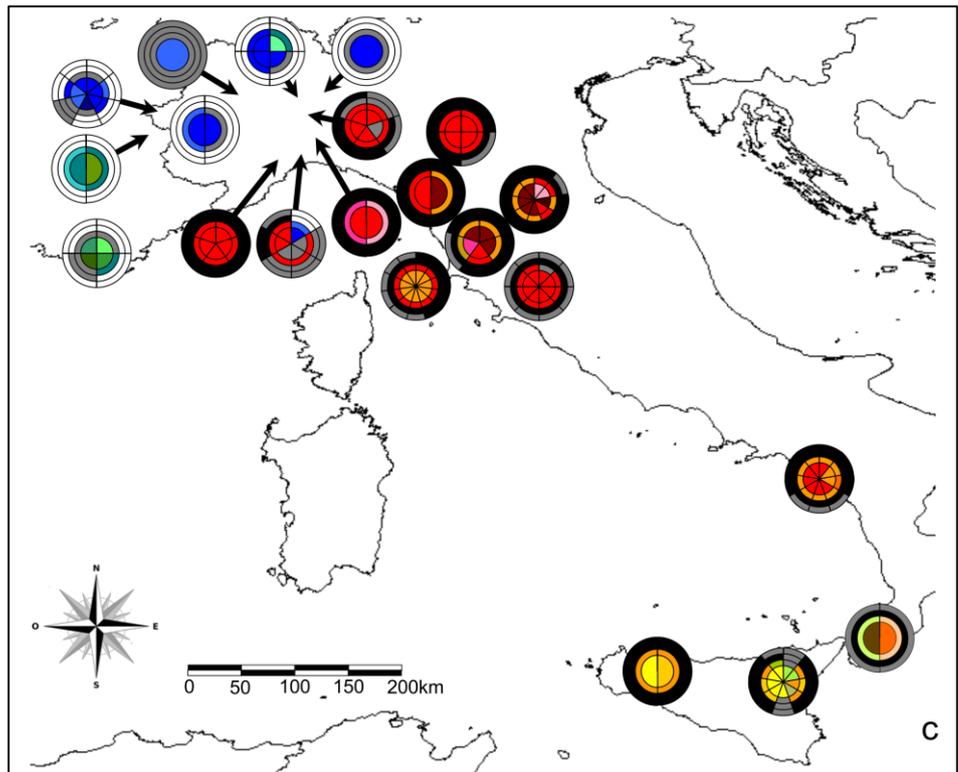


Fig. 3 Network degli aplotipi delle sequenze mitocondriali COI (a) e ND1 (b) di *Zerynthia cassandra* e *Z. polyxena* ricostruiti tramite il metodo *median-joining network*. Gli aplotipi dell'Est Europa (C24-C29) sono rappresentati con lo stesso colore. La mappa (c) nella pagina a fianco mostra la distribuzione degli aplotipi e dei morfotipi dei genitali per ciascun sito di campionamento. Ciascuna torta è divisa in un numero di fette uguale al numero di campioni analizzati per quella località. Ciascuna fetta è ulteriormente divisa in quattro settori. Partendo dal centro della torta, i primi due settori rappresentano i colori (vedi network) degli aplotipi rispettivamente del COI e del ND1 ritrovati in quella località. Il terzo e quarto settore di ciascuna fetta mostrano l'assegnazione rispettivamente del genotipo del wg e del morfotipo dei genitali a *Z. cassandra* (nero) o *Z. polyxena* (bianco). I settori grigi indicano l'assenza del marcatore corrispondente per quell'individuo.



Analisi filogenetica

La topologia dell'albero Bayesiano costruito usando i dati combinati dei tre marcatori evidenzia due linee monofiletiche, supportate da un valore del 100% di probabilità a posteriori (Fig. 4). La prima linea include tutti i campioni morfologicamente attribuiti a *Z. cassandra*, mentre la seconda tutti i campioni attribuiti a *Z. polyxena*. La prima linea comprende due cladi principali. Il primo include i campioni provenienti dall'Italia centrale e meridionale e dalla Sicilia. Tutti i campioni siciliani, tranne uno, sono raggruppati insieme. Il secondo clade comprende i campioni del nord e centro Italia (inclusi quelli della località di simpatría) e dell'Isola d'Elba. La linea di *Z. polyxena* è formata da due cladi ben supportati. Il primo include tutti gli individui francesi e uno del nord Italia (Vercelli), mentre il secondo è costituito da tutti gli altri campioni del nord Italia.

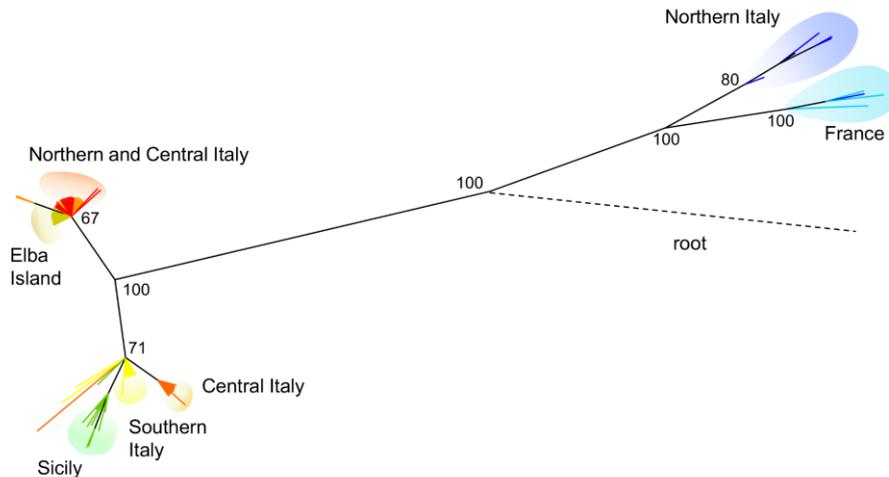


Fig. 4 Albero di consenso maggioritario (50% *majority rule*) ottenuto tramite *Partitioned Bayesian analysis* applicata alle sequenze combinate del COI, ND1 e wg. I valori di probabilità a posteriori sono riportati vicino ai nodi.

Modelli di distribuzione delle specie

I modelli ottenuti tramite MAXENT mostrano un notevole livello di efficienza per entrambe le specie, con valori AUC di 0.861 per *Z. polyxena* e 0.977 per *Z. cassandra* (Fig. 7a e Fig. 8a in Appendice). La valutazione tramite *jackknife test* dell'importanza delle variabili rivela che la temperatura è più influente delle precipitazioni. La temperatura massima nel mese più caldo (variabile BIO5), la temperatura minima nel trimestre più freddo (variabile BIO6), le precipitazioni medie nel trimestre più secco (variabile BIO9) e l'escursione termica diurna media (variabile BIO2) sono risultate le più importanti nel modello di *Z. polyxena*, mentre BIO6, BIO9 e le precipitazioni nel trimestre più caldo (BIO18) sono le variabili più significative nel modello di *Z. cassandra* (Fig. 7b e Fig. 8b in Appendice). L'analisi ROC è stata utilizzata per valutare l'accuratezza dei modelli ottenuti tramite MAXENT e mostra che aree con risposta maggiore di 0.5 corrispondono in larga parte alle distribuzioni osservate delle specie. Unica eccezione è rappresentata dall'Italia peninsulare, che è risultata adatta per *Z. polyxena* dal punto di vista climatico, nonostante la totale assenza della specie in questa area (Fig. 5b,c).

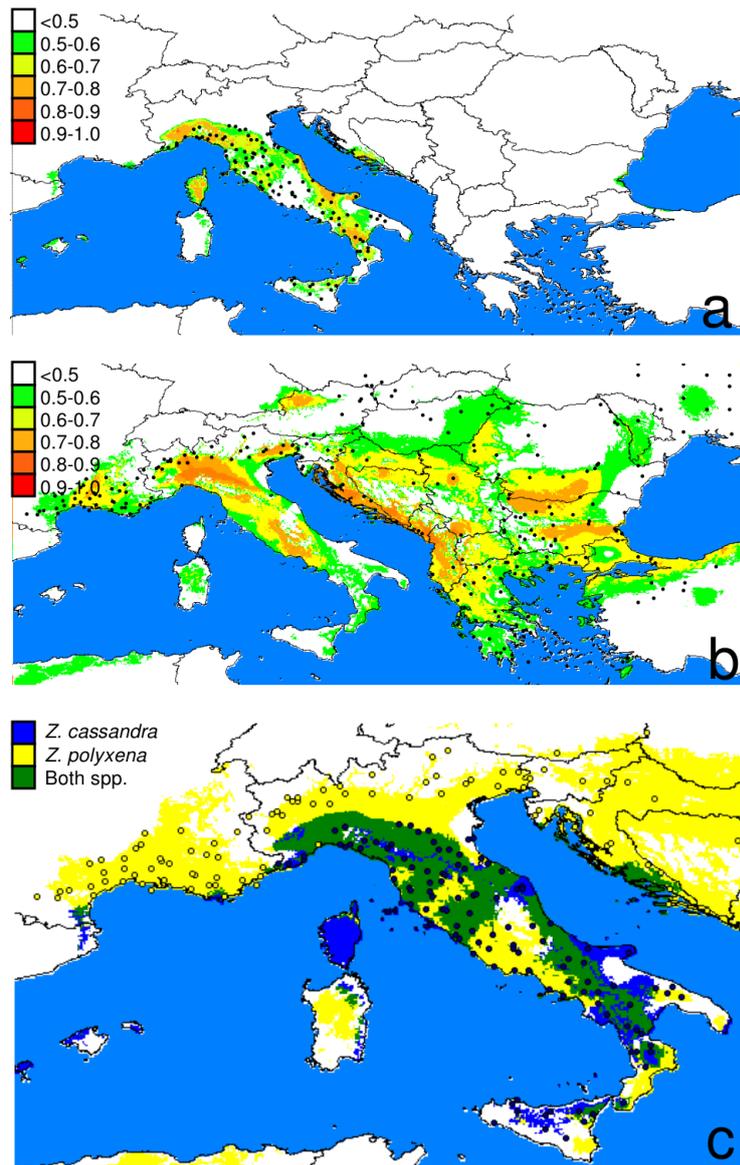


Fig. 5 Rappresentazione dei risultati dell'analisi MAXENT per *Zerynthia cassandra* (a) e *Z. polyxena* (b). Valori > 0.5 indicano la probabile presenza della specie. I cerchi neri mostrano la distribuzione reale. Nella terza mappa (c) le aree in blu e giallo mostrano la distribuzione predetta (*logistic output* > 0.5) rispettivamente per *Z. cassandra* e *Z. polyxena*. In verde sono rappresentate le aree dove è predetta la presenza per entrambe le specie. I cerchi neri e i cerchi bianchi rappresentano la distribuzione reale rispettivamente di *Z. cassandra* e *Z. polyxena*.

Le proiezioni delle due ricostruzioni climatiche per l'Ultimo Massimo Glaciale mostrano risultati molto diversi tra i modelli MIROC e CCSM, soprattutto riguardo alla grandezza delle aree con valori di predizione maggiori di 0.5 (Fig. 6). In queste proiezioni, entrambe le specie mostrano una presenza ridotta nelle zone settentrionali della regione Mediterranea e una distribuzione frammentata nelle regioni meridionali. Tuttavia, entrambi i modelli MIROC e CCSM, prevedono la presenza di *Z. polyxena* nell'Italia peninsulare.

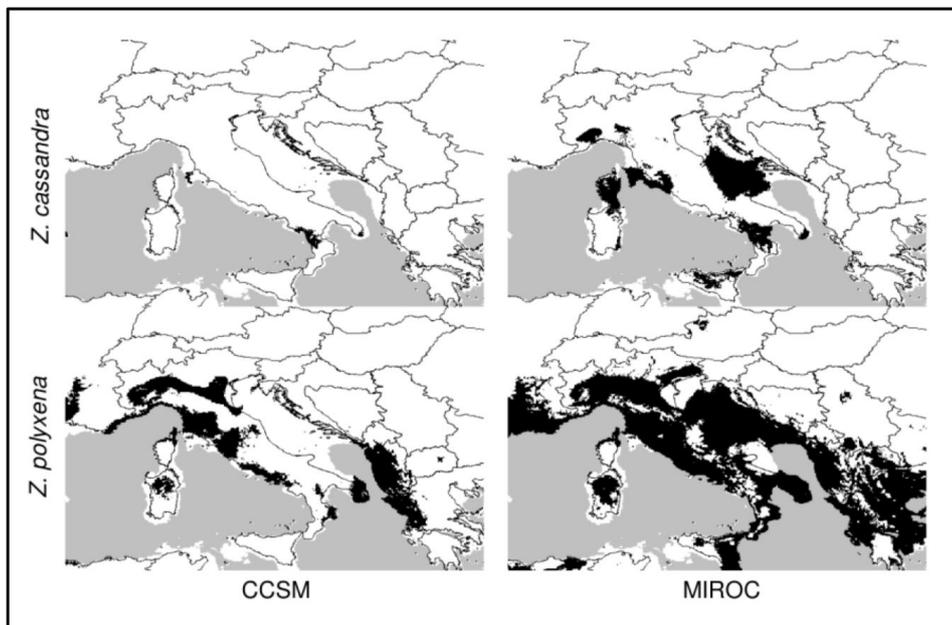


Fig. 6 Proiezione dei modelli MAXENT (basate sulla attuale distribuzione delle specie) sulla ricostruzione climatica per l'Ultimo Massimo Glaciale ottenuta usando i modelli di circolazione CCSM e MIROC. Le aree scure mostrano la distribuzione predetta (*logistic output* > 0.5) per le specie durante l'ultima era glaciale.

Discussione

Divergenza tra le specie

I Papilionidi *Zerynthia cassandra* e *Z. polyxena* mostrano una forte differenziazione sia a livello genetico che morfologico. L'analisi dei geni mitocondriali e nucleari concorda con i dati morfometrici e la ricostruzione filogenetica che ne risulta mostra una chiara divisione dei campioni raccolti dalla Sicilia alla Francia meridionale in due diversi cladi. La divergenza dei

caratteri si mantiene anche nella zona dove *Z. cassandra* e *Z. polyxena* vivono in simpatria, senza segni di ibridazione.

I livelli di divergenza genetica tra *Zerynthia cassandra* e *Z. polyxena* (1.5% per il COI, 3% per il ND1 e 1% per il wg) sono simili o più bassi rispetto ai valori riscontrati nella maggior parte degli studi che hanno messo a confronto specie sorelle/criptiche europee (Cianchi et al., 2003; Wiemers & Gottsberger, 2010; Dincă et al., 2011a, 2011b; Sañudo-Restrepo et al., 2012). Tali studi mostrano anche che la maggior parte dei taxa si ibrida nella zona di contatto. Nella presente ricerca sono state campionate le popolazioni di *Zerynthia cassandra* e *Z. polyxena* geograficamente più vicine (Vercelli, Vigevano e Alessandria), che non presentano barriere geografiche evidenti, e sono stati analizzati anche campioni provenienti dall'unica area dove le specie sono state finora ritrovate in simpatria (Monte Beigua). Non sono stati riscontrati segni di introgressione, sia per i marcatori mitocondriali e nucleari, sia per quelli morfologici. L'assenza di fenomeni di ibridazione è stata verificata, nonostante siano state riscontrate prove di dispersione, come suggerito dal ritrovamento di un campione con aplotipo francese in nord Italia.

Le zone ibride sono generalmente ampie (50-250 km) per le specie di lepidotteri europei nelle quali sono stati evidenziati fenomeni di introgressione (Porter, 2009; Dincă et al., 2011a, 2011b; Mallet et al., 2011; Sañudo-Restrepo et al., 2012). Le specie criptiche *Polyommatus icarus* / *P. celina*, e *Aricia agestis* / *A. cramera*, per esempio, hanno zone ibride larghe rispettivamente 200 e 50 km, e mostrano chiara separazione filogenetica con valori di divergenza del 3% e 5% per le sequenze del COI. Nonostante ciò, queste specie mostrano chiari segni di introgressione morfologica e genetica (Dincă et al., 2011b; Sañudo-Restrepo et al., 2012).

In questa ricerca, i siti di campionamento di Vigevano e Vercelli nella zona di contatto del nord Italia, dove sono state riscontrate solamente sequenze di *Z. polyxena*, distano rispettivamente 37 e 50 km da Alessandria, località dove sono stati trovati campioni con sequenze e morfotipo tipici di *Z. cassandra*. Sebbene un'area di ibridazione molto stretta possa essere presente tra queste località, tale fascia sarebbe notevolmente ridotta rispetto a quelle riscontrate per altre specie europee. Più forte è la selezione di alleli residenti ai due lati di una zona ibrida, più ristretta dovrebbe essere l'area occupata dalla zona di ibridazione (Porter, 2009). Inoltre, quando la selezione contro gli individui ibridi raggiunge livelli alti, la zona di ibridazione tende ad annullarsi. In assenza di meccanismi di riconoscimento che permettono agli individui di accoppiarsi con conspecifici, le aree di ibridazione possono essere viste come *population sinks* ed è improbabile che si estendano su vaste porzioni degli areali occupati dalle due diverse entità (Dasmahapatra et al., 2010). Ciò suggerisce che *Z. cassandra* e *Z. polyxena* possano essere riproduttivamente incompatibili, come risultato di schemi differenziali di fitness, per cui specie differenti possono essere classificate come quelle unità che soffrono in termini di fitness quando scambiano geni con effetti epistatici (Hausdorf, 2011).

Gli areali attuali di *Z. cassandra* e *Z. polyxena* coincidono con le distribuzioni predette dai modelli climatici. L'unica discrepanza di rilievo tra distribuzioni osservate e predette riguarda il centro e sud Italia, aree potenzialmente favorevoli per *Z. polyxena*, ma prive di segnalazioni di presenza per questa specie. In particolare, il modello prevede che entrambi i taxa siano presenti in Corsica e Sardegna, mentre non sono mai state riportate segnalazioni per queste isole. In modo simile, il modello prevede la presenza di *Z. polyxena* nella maggior parte dell'Italia appenninica e in Sicilia, mentre la specie non è mai stata osservata in queste aree.

La proiezione dei modelli climatici nello scenario dell'Ultimo Massimo Glaciale mostra che entrambe le specie, in particolar modo *Z. cassandra*, hanno probabilmente subito una forte contrazione degli areali, che potrebbe aver favorito l'isolamento e la divergenza. Tuttavia, i due modelli utilizzati danno risultati diversi. In particolare, secondo lo scenario predetto attraverso il modello CCSM, l'areale di *Z. cassandra* fu ridotto ad un'area molto piccola nell'Italia meridionale, mentre *Z. polyxena* rimase in due rifugi separati, uno in Grecia e l'altro in Italia settentrionale e Francia. Dall'altro lato, il modello MIROC descrive possibili areali ridotti a piccole aree con condizioni climatiche favorevoli a entrambe le specie nell'Italia peninsulare, Sicilia e in una vasta area attualmente sommersa dal Mar Adriatico.

I risultati delle analisi morfologiche, genetiche e climatiche e i dati riguardanti altri gruppi di lepidotteri (ad es. Descimon & Mallet, 2009) fanno ipotizzare che la divergenza a livello dei genitali e le barriere riproduttive tra *Z. polyxena* e *Z. cassandra* si siano sviluppati in tempi relativamente brevi. Infatti, la maggior parte delle specie sorelle/cryptiche europee mostrano tempi di divergenza simili a quelli riportati per *Z. polyxena* e *Z. cassandra*. Tuttavia, non sono state evidenziate prove di forte diversificazione delle strutture genitali e di completa assenza di fenomeni di introgressione, come invece dimostrato nel presente lavoro (Nazari & Sperling, 2007; Dincă et al., 2011a, 2011b; Sañudo-Restrepo et al., 2012). Un fattore determinante nell'evoluzione di due unità chiaramente distinte a livello genetico e dei genitali potrebbe essere la bassa capacità di dispersione di *Zerynthia* (Celik, 2012). Inoltre, sia i maschi che le femmine di entrambe le specie sono altamente filopatrici e la loro area di attività dipende principalmente dalla presenza della stessa pianta ospite per le larve (*Aristolochia* spp.) (Bollino & Racheli, 2012). Una buona indicazione di questa bassa capacità di dispersione è l'assenza di entrambe le specie dalla maggior parte delle isole mediterranee, nonostante la presenza di condizioni climatiche favorevoli e di potenziali piante ospiti. Popolazioni insulari di *Z. cassandra* si ritrovano solo sull'Isola d'Elba e in Sicilia (Balletto et al., 2007), entrambe vicine alla costa. Analogamente, *Z. polyxena* è conosciuta per poche isole vicine alla Penisola Balcanica (Kudrna et al., 2011). Da questo punto di vista, la presenza di due distinte aree con condizioni climatiche favorevoli per *Z.*

polyxena in Italia settentrionale-Francia e Grecia predette dal modello CCSM per l'Ultimo Massimo Glaciale non implica necessariamente la presenza di *Zerynthia* in entrambe le aree. Nazari & Sperling (Nazari & Sperling, 2007) hanno stimato un tempo di divergenza tra *Z. polyxena* e *Z. cassandra* di circa 1,8 milioni di anni (nel basso Pleistocene). Una serie di fasi glaciali e interglaciali potrebbe quindi aver dato inizio e mantenuto il processo di diversificazione inter e intra-specifica. I network degli aplotipi suggeriscono chiaramente che entrambe le specie hanno una forte struttura genetica. *Z. polyxena*, per esempio, mostra gruppi separati di aplotipi presenti in est Europa (Russia e Romania), nord Italia e Francia. La Toscana è ricca di aplotipi endemici di *Z. cassandra*, suggerendo che questa regione possa aver costituito un rifugio glaciale, come confermato dalle proiezioni dei modelli di distribuzione. Al contrario, l'area a nord-ovest della Toscana (Liguria e Piemonte) sembra che sia stata colonizzata più recentemente da un singolo aplotipo toscano di *Z. cassandra*. *Z. polyxena* mostra una situazione più complessa nell'Italia settentrionale, con la maggior parte degli aplotipi endemici, ma altamente legati al gruppo orientale, e con un solo aplotipo in comune con le popolazioni francesi. Questa situazione suggerisce che durante l'Ultimo Massimo Glaciale *Zerynthia* non sia andata incontro ad un'estesa estinzione nell'area esaminata, e che *Z. cassandra* sia venuta in contatto con *Z. polyxena* dopo un evento relativamente recente di colonizzazione della Liguria e del Piemonte a partire dall'Italia centrale. Pertanto, durante le ultime fasi glaciali, *Z. cassandra* ha probabilmente subito periodi di isolamento in vari micro-rifugi italiani, seguiti da fasi di espansione e contatti marginali con *Z. polyxena* durante le fasi interglaciali. La presenza di un singolo aplotipo endemico sull'Isola d'Elba suggerisce che la colonizzazione dell'isola possa essere stata ostacolata dall'innalzamento del livello del mare alla fine dell'ultima glaciazione, mentre la struttura genetica delle popolazioni continentali sia cambiata a seguito di complessi e successivi eventi di colonizzazione, come mostrato per altre specie di lepidotteri nella stessa area (Dapporto et al., 2011, 2012).

La letteratura recente suggerisce che la speciazione possa verificarsi anche quando le popolazioni sono in contatto e sono capaci di ibridarsi (Hausdorf, 2011). L'epistasi, che conferisce una fitness migliore in aree differenti, può dar luogo a scambio limitato di componenti genetiche associate alla riproduzione. In *Zerynthia* le interazioni genetiche che influiscono sulla forma dei genitali potrebbero aver giocato un ruolo particolare ad uno stadio iniziale di diversificazione, quando i due taxa probabilmente sono venuti ripetutamente in contatto durante le fasi glaciali e interglaciali. D'altronde, esistono prove che altre mutazioni adattative e neutrali possano essere più facilmente scambiate tra le specie (Heliconius Genome Consortium, 2012). Nell'area mediterranea, specie distinte condividono mutazioni adattative dal Maghreb all'Italia (Habel et al., 2010; Dapporto et al., 2011), mentre in lepidotteri neotropici la colorazione adattativa Mülleriana delle ali può essere

scambiata anch tra specie con forte differenziazione genetica (Heliconius Genome Consortium, 2012). Questi esempi possono aiutare a spiegare perché *Z. polyxena* e *Z. cassandra* hanno mantenuto identici disegni e colorazioni aposematiche alari (Rothschild et al., 1972; Sime et al., 2000).

Le specie di *Zerynthia* prese in esame sembrano seguire la regola dell'isolamento riproduttivo richiesta dal concetto biologico di specie. Da questo punto di vista, rappresentano un'eccezione in confronto alla maggior parte delle specie sorelle/criptiche europee. Si suggerisce perciò di considerare *Z. polyxena* e *Z. cassandra* come "buone" specie, anche nell'accezione restrittiva di Descimon & Mallet (2009), e di considerare questi taxa come un importante modello per studiare la speciazione, la correlazione tra caratteri genotipici e fenotipici, l'evoluzione e la conservazione di caratteri adattativi.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con il Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano, il Parco Naturale Capanne di Marcarolo, il Parco fluviale del Po nel tratto vercellese/alessandrino, la Riserva Naturale del Torrente Orba e il Parco Naturale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli. Si ringraziano Chiara Natali per l'aiuto durante il lavoro di laboratorio, Roger Vila per aver fornito tre sequenze del gene mitocondriale COI, Nicola Scatassi e Gabriele Panizza per il loro aiuto durante il lavoro sul campo.

Bibliografia

- Aubert, J., Legal, L., Descimon, H. & Michel, F.** 1999. Molecular phylogeny of swallowtail butterflies of the tribe Papilionini (Papilionidae, Lepidoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12**, 156-167.
- Austin, M.P.** 2007. Species distribution models and ecological theory: a critical assessment and some possible new approaches. *Ecological Modelling*, **200**, 1-19.
- Balletto, E., Bonelli, E. & Cassulo, L.** 2007. Insecta Lepidoptera Papilionoidea. In: *Checklist and Distribution of the Italian Fauna. 10.000 terrestrial and inland water species* (Ed. by S. Ruffo & F. Stoch) pp. 257-261. Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona. **17**, Verona.
- Bandelt, H.-J., Forster, P. & Röhl, A.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.

- Bollino, M. & Racheli, T.** 2012. *Butterflies of the world, supplement 20, Parnassinae (partim), Parnassiini (partim), Luehdorfiini, Zerynthiini.* Goecke & Hevers, Keltern.
- Bookstein, F.L.** 1997. Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, **1**, 225-243.
- Borcard, D., Gillet, F. & Legendre, P.** 2011. *Numerical Ecology with R.* Springer-Verlag, New York.
- Celik, T.** 2012. Adult demography, spatial distribution and movements of *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera: Papilionidae) in a dense network of permanent habitats. *European Journal of Entomology*, **109**, 217-227.
- Cianchi, R., Ungaro, A., Marini, M. & Bullini, L.** 2003. Differential patterns of hybridization and introgression between the swallowtails *Papilio machaon* and *P. hospiton* from Sardinia and Corsica islands (Lepidoptera, Papilionidae). *Molecular Ecology*, **12**, 1461-1471.
- Coyne, F.M. & Orr, H.A.** 2004. *Speciation.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Currat, M., Ruedi, M., Petit, R.J. & Excoffier, L.** 2008. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution*, **62**, 1908-1920.
- Dapporto, L.** 2010. Speciation in Mediterranean refugia and post-glacial expansion of *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera, Papilionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **48**, 229-237.
- Dapporto, L., Habel, J.-C., Dennis, R.L.H. & Schmitt, T.** 2011. The biogeography of the western Mediterranean: elucidating contradictory distribution patterns of differentiation in *Maniola jurtina* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Biological journal of the Linnean Society*, **103**, 571-577.
- Dapporto, L., Bruschini, C., Dincă, V., Vila, R. & Dennis, R.L.H.** 2012. Identifying zones of phenetic compression in West Mediterranean butterflies (Satyrinae): refugia, invasion and hybridization. *Diversity and Distributions*, **18**, 1066-1076.
- Dasmahapatra, K.K., Lamas, G., Simpson, F. & Mallet, J.** 2010. The anatomy of a 'suture zone' in Amazonian butterflies: a coalescent-based test for vicariant geographic divergence and speciation. *Molecular Ecology*, **19**, 4283-4301.
- Descimon, H. & Mallet, J.** 2009. Bad species. In: *Ecology of butterflies in Europe* (Ed. by J. Settele, T. Shreeve, M. Konvička & H. Van Dyck) pp. 219-24. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dincă, V., Lukhtanov, V.A., Talavera, G. & Vila, R.** 2011a. Unexpected layers of cryptic diversity in wood white Leptidea butterflies. *Nature Communications*, **2**, 324.
- Dincă, V., Dapporto, L. & Vila, R.** 2011b. A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus*

icarus and *Polyommatus celina* Common Blue butterflies. *Molecular Ecology*, **20**, 3921-3935.

- Dincă, V., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N. & Vila, R.** 2011c. Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings of the Royal Society B*, **278**, 347-355.
- Elith, J.** 2002. Quantitative methods for modeling species habitat: comparative performance and an application to Australian plants. In: *Quantitative methods for conservation biology* (ed. by S. Ferson & M. Burgma) pp. 39-58. Springer-Verlag, New York.
- Excoffier, L., Foll, M. & Petit, R.J.** 2009. Genetic Consequences of Range Expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**, 481-501.
- Friberg, M., Vongvanich, N., Borg-Karlson, A.-K., Kemp, D.J., Merilaita, S. & Wiklund, C.** 2008. Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **62**, 873-886.
- Guindon, S. & Gascuel, O.** 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696-704.
- Habel, J.C., Rödder, D., Scalercio, S., Meyer, M. & Schmitt, T.** 2010. Strong genetic cohesiveness between Italia and North Africa in four butterfly species. *Biological Journal of the Linnean Society*, **99**, 818-830.
- Hajibabaei, M., deWaard, J.R., Ivanova, N.V., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Kirk, S.L., Mackie, P.M. & Hebert, P.D.N.** 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1959-1967.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.** 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160-174.
- Heliconius Genome Consortium** 2012. Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptation among species. *Nature*, **487**, 94-98.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A.** 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965-1978.
- Hausdorf, B.** 2011. Progress toward a general species concept. *Evolution*, **65**, 923-931.
- Kim, M.I., Baek, J.Y., Kim, M.J., Jeong, H.C., Kim, K.G., Bae, C.H., Han, Y.S., Jin, B.R. & Kim, I.** 2009. Complete nucleotide sequence and organization of the mitogenome of the red-spotted apollo butterfly, *Parnassius bremeri* (Lepidoptera: Papilionidae) and comparison with other lepidopteran insects. *Molecules and Cells*, **28**, 347-363.

- Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Kudrna, O., Harpke, A., Lux, C., Pennerstorfer, J., Schweiger, O., Settele, J. & Wiemers, M.** 2011. *Distribution Atlas of Butterflies in Europe*. Gesellschaft für Schmetterlingsschutz, Halle, Germany.
- Lorković, Z.** 1993. *Leptidea reali* Reissinger, 1989 (= *lorkovicii* Real 1988), a new European species (Lepid., Pieridae). *Natura Croatica*, **2**, 1-26.
- Mallet, J.** 1995. A species definition for a modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*, **10**, 294-299.
- Mallet, J.** 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 229-237.
- Mallet, J.** 2008. Hybridization, ecological races, and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **363**, 2971-2986.
- Mallet, J., Wynne, I.R. & Thomas, C.D.** 2011. Hybridisation and climate change: brown argus butterflies in Britain (*Polyommatus* subgenus *Aricia*). *Insect Conservation and Diversity*, **4**, 192-199.
- Mayr, E.** 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Michel, F., Rebourg, C., Cosson, E. & Descimon, H.** 2008. Molecular phylogeny of Parnassiinae butterflies (Lepidoptera: Papilionidae) based on the sequences of four mitochondrial DNA segments. *Annales de la Société entomologique de France*, **44**, 1-36.
- Nazari, V. & Sperling, F.A.H.** 2007. Mitochondrial DNA divergence and phylogeography in western Palaearctic Parnassiinae (Lepidoptera: Papilionidae): How many species are there? *Insect Systematics & Evolution*, **38**, 121-138.
- Nazari, V., Zakharov, E.V. & Sperling, F.A.** 2007. Phylogeny, historical biogeography, and taxonomic ranking of Parnassiinae (Lepidoptera, Papilionidae) based on morphology and seven genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**, 131-156.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P. & Schapire, R.E.** 2006. Maximum entropy modelling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231-259.
- Polzin, T. & Daneschmand, S.V.** 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, **31**, 12-20.
- Porter, A.H.** 2009. Ecological genetics and evolutionary ecology in hybrid zones. In: *Ecology of butterflies in Europe* (Ed. by J. Settele, T. Shreeve, M. Konvička & H. Van Dyck) pp. 296-311. Cambridge University Press, Cambridge.
- Posada, D.** 2003. Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. In: *Current Protocols in Bioinformatics* (Ed. By A.D.

- Baxevanis, D.B. Davison, R.D.M. Page, G..A Petsko, L.D. Stein & G.D. Stormo) pp. 6.5.1-6.5.14. John Wiley & sons, New York.
- Posada, D.** 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253-1256.
- Rohlf, F.J.** 2010a. *tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.16*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J.** 2010b. *tpsRelw, relative warps analysis, version 1.49*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J.** 2012. *tpsUtil, file utility program, version 1.53*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Ronquist, F. & Deans, A.R.** 2010. Bayesian Phylogenetics and Its Influence on Insect Systematics. *Annual Review of Entomology*, **55**, 189-206.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572-1574.
- Rothschild, M., von Euw, J. & Reichstein, T.** 1972. Aristolochic acids stored by *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera). *Insect Biochemistry*, **2**, 334-343.
- Sañudo-Restrepo, C.P., Dincă, V., Talavera, G. & Vila, R.** 2012. Biogeography and systematics of *Aricia* butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* (in press).
- Sime, K.R., Feeny, P.P. & Haribal, M.H.** 2000. Sequestration of aristolochic acids by the pipevine swallowtail, *Battus philenor* (L.): evidence and ecological implications. *Chemoecology*, **10**, 169-178.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Tavaré, S.** (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: *Some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis* (Ed. by R.M. Miura) pp. 57-86. American Mathematical Society, Providence, RI.
- Wiemers, M. & Gottsberger, B.** 2010. Discordant patterns of mitochondrial and nuclear differentiation in the Scarce Swallowtail *Iphioides podalirius feisthamelii* (Duponchel, 1832) (Lepidoptera: Papilionidae). *Entomologische Zeitschrift*, **120**, 111-115.
- Wu, C.I.** 2001. The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 851-865.

Appendice

Tab. 2 Ulteriori informazioni sui campioni di *Zerynthia polyxena* (*Z. pol*) e *Z. cassandra* (*Z. cas.*) analizzati in questo studio: collezione (coll.), aplotipo del COI (apl. COI), aplotipo del ND1 (apl. ND1), genotipo del wingless (gen. wg), morfotipo dei genitali (morf. gen.), sito di campionamento. Il trattino (-) indica la mancanza di informazioni sui marcatori genetici e morfologici. Collezioni: MZUF - Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze; IBE - Istituto di Biologia Evoluzionistica, Barcellona; ZLT - Laboratorio di Zoologia dell'Università di Torino.

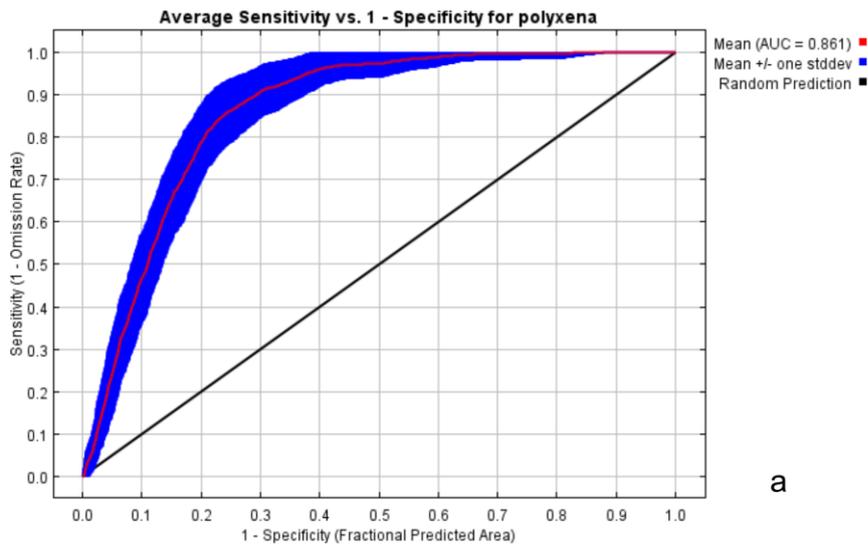
ID dei campioni	Coll.	Taxon	Apl. COI	Apl. ND1	Gen. wg	Morf. gen.	Sito di campionamento
LD1031	MZUF	<i>Z. pol</i>	C16	-	W2	<i>Z. pol</i>	Francia, Sollies Pont, Var
LD1032	MZUF	<i>Z. pol</i>	C17	-	W2	<i>Z. pol</i>	Francia, Sollies Pont, Var
LD1033	MZUF	<i>Z. pol</i>	C18	N11	W2	<i>Z. pol</i>	Francia, Sollies Pont, Var
LD1034	MZUF	<i>Z. pol</i>	C19	-	-	<i>Z. pol</i>	Francia, Sollies Pont, Var
LD1063	MZUF	<i>Z. pol</i>	C21	N12	W2	<i>Z. pol</i>	Francia, Hautes Alpes St Crepin
LD1065	MZUF	<i>Z. pol</i>	C22	N11	W2	<i>Z. pol</i>	Francia, Hautes Alpes St Crepin
LD1020	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	-	W4	<i>Z. pol</i>	Italia, Salbertrand (TO)
LD1021	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	-	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Salbertrand (TO)
LD1025	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	N9	W3	<i>Z. pol</i>	Italia, Salbertrand (TO)
LD1026	MZUF	<i>Z. pol</i>	C14	N9	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Salbertrand (TO)
LD1027	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	N10	W4	<i>Z. pol</i>	Italia, Salbertrand (TO)
LD1028	MZUF	<i>Z. pol</i>	C15	-	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Salbertrand (TO)
LD1030	MZUF	<i>Z. pol</i>	C14	-	-	-	Italia, Salbertrand (TO)
LD1053	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	-	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Val della Torre (TO)
LD1054	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	N10	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Val della Torre (TO)
LD1036	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	N9	W4	<i>Z. pol</i>	Italia, Greggio (VC)

LD1037	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	-	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Greggio (VC)
LD1038	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	N9	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Greggio (VC)
LD1040	MZUF	<i>Z. pol</i>	C20	N11	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Greggio (VC)
LD1018	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	-	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Vigevano (PV)
LDA1	MZUF	<i>Z. pol</i>	C13	N10	W2	<i>Z. pol</i>	Italia, Alpicella (SV)
IV3	ZLT	<i>Z. pol</i>	C14	-	-	-	Italia, Ivrea (TO)
C4	ZLT	<i>Z. cas</i>	C1	N1	-	<i>Z. cas</i>	Italia, Castelnuovo (AL)
C5	ZLT	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Castelnuovo (AL)
C6	ZLT	<i>Z. cas</i>	C1	N1	-	-	Italia, Castelnuovo (AL)
C7	ZLT	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Castelnuovo (AL)
C8	ZLT	<i>Z. cas</i>	-	N1	W1	-	Italia, Castelnuovo (AL)
M10	ZLT	<i>Z. cas</i>	C1	N13	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Marcarolo (AL)
M11	ZLT	<i>Z. cas</i>	C1	N14	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Marcarolo (AL)
LDA2	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Alpicella (SV)
LDA3	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia, Alpicella (SV)
LD3386	MZUF	<i>Z. cas</i>	-	N1	-	-	Italia, Alpicella (SV)
LD3387	MZUF	<i>Z. cas</i>	-	N1	-	-	Italia, Alpicella (SV)
LD3388	MZUF	<i>Z. cas</i>	-	N1	-	-	Italia, Alpicella (SV)
LD3166	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, San Martino-Stella (SV)
LD3167	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, San Martino-Stella (SV)
LD3168	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, San Martino-Stella (SV)

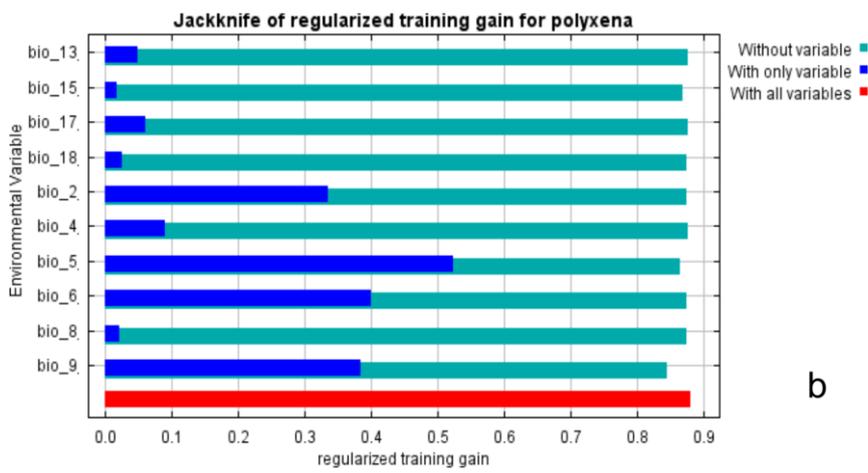
LD3170	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, San Martino-Stella (SV)
LD3171	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, San Martino-Stella (SV)
LD1010	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Brescello (RE)
LD1011	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Brescello (RE)
LD1012	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Brescello (RE)
LD1013	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia, Brescello (RE)
LD19	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, San Rossore (PI)
LD1045	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Marina di Vecchiano (PI)
LD960	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, isola d'Elba (LI)
LD961	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, isola d'Elba (LI)
LD962	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	-	Italia, isola d'Elba (LI)
LD964	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, isola d'Elba (LI)
LD965	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, isola d'Elba (LI)
LD966	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	-	Italia, isola d'Elba (LI)
LD968	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	-	Italia, isola d'Elba (LI)
LD969	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, isola d'Elba (LI)
LD970	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	-	Italia, isola d'Elba (LI)
LD971	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	-	Italia, isola d'Elba (LI)
LD1044	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N1	W1	-	Italia, isola d'Elba (LI)
LD978	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-San Giorgio (PO)
LD983	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-San Giorgio (PO)

LD986	MZUF	<i>Z. cas</i>	C4	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-San Giorgio (PO)
LD987	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-San Giorgio (PO)
LD989	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-San Giorgio (PO)
LD1002	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-San Giorgio (PO)
LD1003	MZUF	<i>Z. cas</i>	C4	N1	W1	-	Italia, Prato-San Giorgio (PO)
LD1006	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-San Giorgio (PO)
LD1043	MZUF	<i>Z. cas</i>	C5	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Prato-Calvana (PO)
LD3351	MZUF	<i>Z. cas</i>	C10	N5	W1	-	Italia, Grecciano (LI)
G1	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Grecciano (LI)
G2	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Grecciano (LI)
G3	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Grecciano (LI)
G4	MZUF	<i>Z. cas</i>	C3	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Grecciano (LI)
LDL1	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	-	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LDL2	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LDL4	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LDL5	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LDL6	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LDL7	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LDL8	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LDL9	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N1	W1	-	Italia; Grosseto (GR)
LD1866	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sansa (SA)

LD1867	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sansa (SA)
LD1868	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sansa (SA)
LD1869	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N2	W1	-	Italia, Sansa (SA)
LD1870	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N2	W1	-	Italia, Sansa (SA)
LD1871	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N2	W1	-	Italia, Sansa (SA)
LD1873	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sansa (SA)
LD1874	MZUF	<i>Z. cas</i>	C1	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sansa (SA)
LD1875	MZUF	<i>Z. cas</i>	C2	N3	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sansa (SA)
LDASP1	IBE	<i>Z. cas</i>	C11	N6	W1	-	Italia, Aspromonte (RC)
LDASP2	IBE	<i>Z. cas</i>	C12	N7	W1	-	Italia, Aspromonte (RC)
LD3130	IBE	<i>Z. cas</i>	C6	N4	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Etna, Ragalna (CT)
LD3131	IBE	<i>Z. cas</i>	C2	N4	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Etna, Ragalna (CT)
LD3132	IBE	<i>Z. cas</i>	C8	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Etna, Ragalna (CT)
LD3133	IBE	<i>Z. cas</i>	C9	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Etna, Ragalna (CT)
LD3134	IBE	<i>Z. cas</i>	C6	N4	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Etna, Ragalna (CT)
LD3135	IBE	<i>Z. cas</i>	C6	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Etna, Ragalna (CT)
RV11-D290	IBE	<i>Z. cas</i>	C8	-	-	-	Italia, Sicilia, Etna, Ragalna (CT)
RV11-I061	IBE	<i>Z. cas</i>	C6	-	-	-	Italia, Sicilia, Randazzo (CT)
LDET1	IBE	<i>Z. cas</i>	C6	N8	W1	-	Italia, Sicilia, Etna (CT)
LD3128	IBE	<i>Z. cas</i>	C6	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Monte Busambra (PA)
LD3129	IBE	<i>Z. cas</i>	C7	N2	W1	<i>Z. cas</i>	Italia, Sicilia, Monte Busambra (PA)

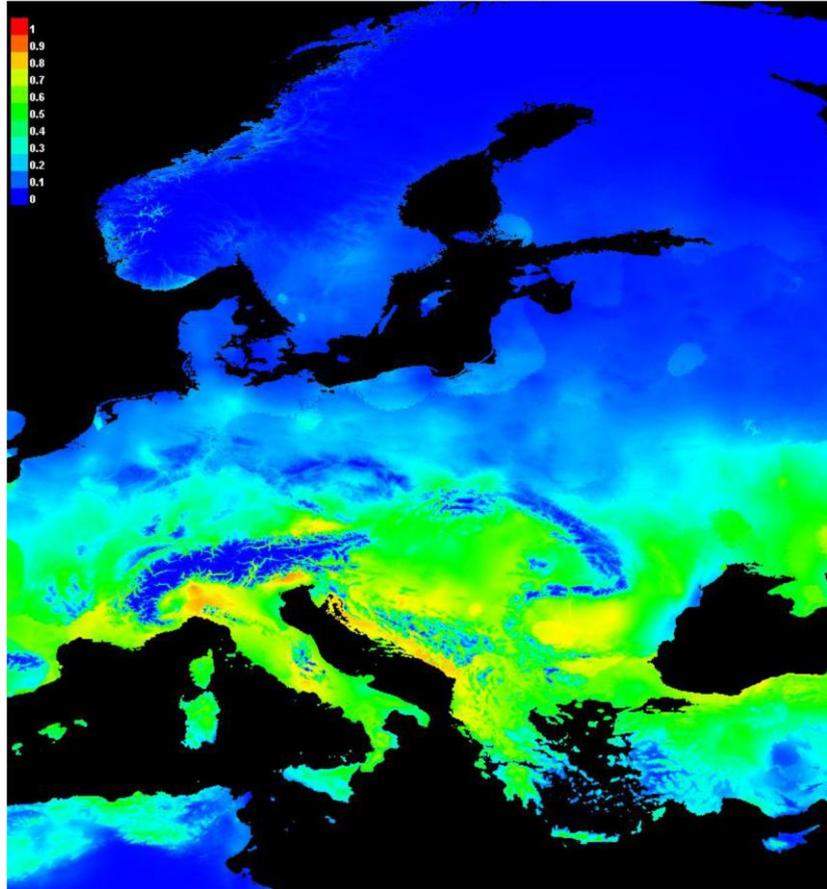


a

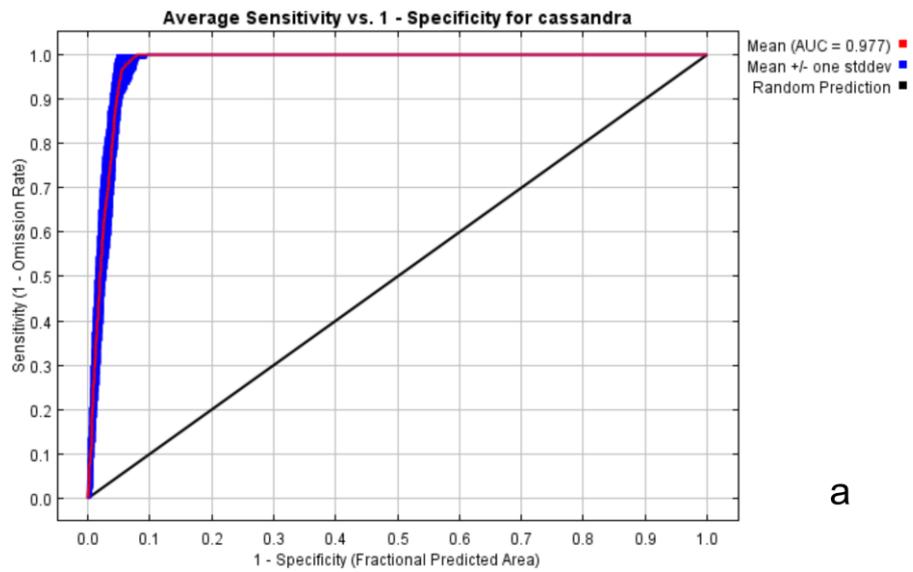


b

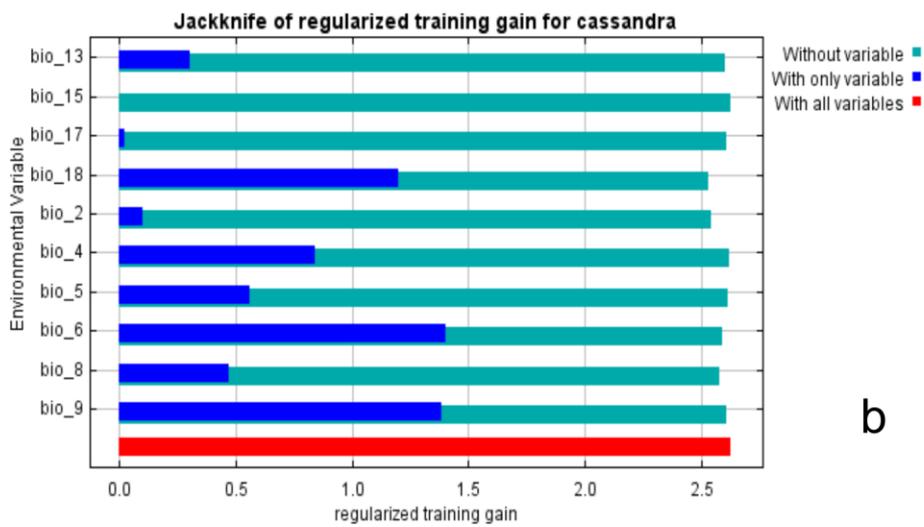
Fig. 7 Risultati supplementari del modello MAXENT per *Z. polyxena*: ROC curve (a); valutazione dell'importanza relativa delle variabili BIOCLIM tramite *jack nife test* (b); risultato logistico per l'intera area (c, nella pagina accanto).



C

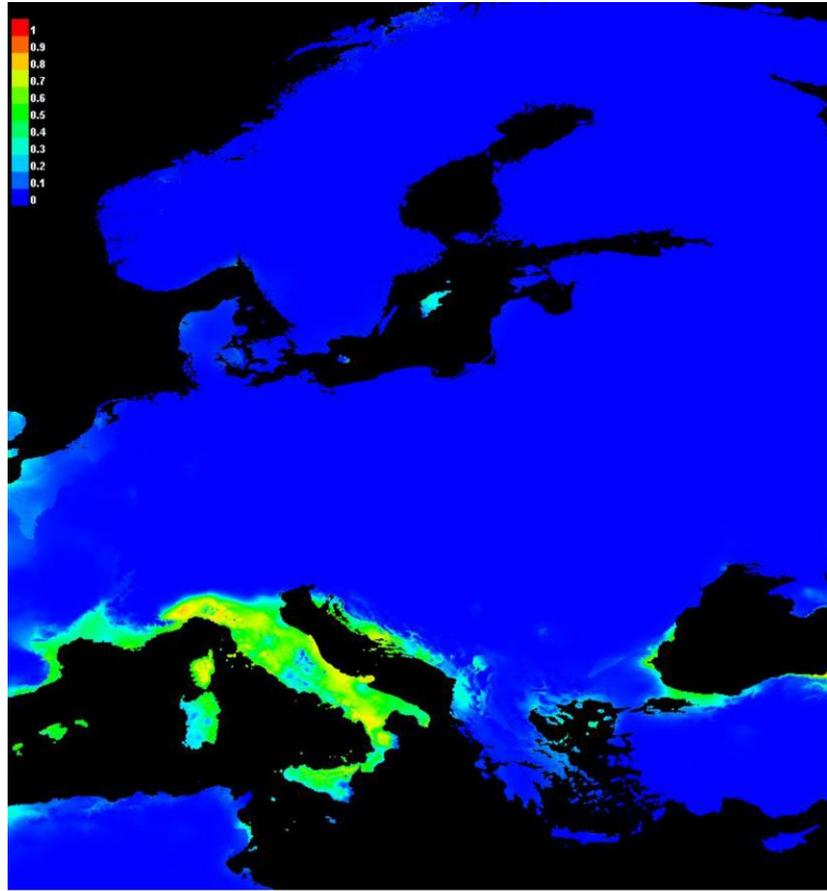


a



b

Fig. 8 Risultati supplementari del modello MAXENT per *Z. cassandra*: ROC curve (a); valutazione dell'importanza relativa delle variabili BIOCLIM tramite *jack nife test* (b); risultato logistico per l'intera area (c, nella pagina accanto).



C

5. CONCLUSIONI

Le ricerche svolte durante il mio dottorato hanno confermato l'utilità dell'applicazione di un approccio integrato alla tassonomia, attraverso l'utilizzo di varie discipline e il confronto critico dei risultati. Questo approccio infatti ha permesso non solo di ottenere risultati più attendibili riguardo alla delimitazione e caratterizzazione delle specie, ma anche di affrontare tematiche più ampie, contribuendo alla conoscenza della storia evolutiva dei taxa studiati e alla loro conservazione.

I due casi di studio sono stati scelti perché riguardavano entrambi specie di particolare interesse conservazionistico ma, allo stesso tempo, presentavano questioni e problematiche differenti, che mi hanno portato ad applicare diversi tipi di analisi e ad approfondire varie tematiche.

Il filo conduttore delle mie ricerche è stato principalmente l'applicazione di tecniche di biologia molecolare e morfometria geometrica. Queste due discipline sono state scelte perché considerate di primaria importanza nell'ottica della tassonomia integrata e utilizzate con risultati interessanti in numerosi studi. Da un lato, i caratteri molecolari sono stati particolarmente utilizzati negli ultimi anni e possono risultare particolarmente efficaci per classificare le specie e ricostruire i loro rapporti filogenetici. D'altro lato, i caratteri morfologici sono sempre stati fondamentali per descrivere e caratterizzare le specie, ma è stata vista la necessità di utilizzare metodi più oggettivi per l'acquisizione e l'analisi dei dati, soprattutto in gruppi dove l'interpretazione di questo tipo di caratteri risulta complicata (Mutanen & Pretorius, 2007; Schilck-Steiner et al., 2010).

Entrambi i casi di studio sono partiti proprio dalla morfologia, o meglio dalla verifica dell'esistenza di caratteri morfologici per distinguere le specie. L'analisi molecolare è servita nel primo caso soprattutto per tentare una prima ricostruzione filogenetica, nel secondo caso per verificare la distinzione delle due specie in questione anche a livello molecolare, escludendo fenomeni di introgressione.

L'applicazione di questo approccio di tipo integrato ha dato risultati interessanti, permettendo di chiarire buona parte delle questioni iniziali e aprendo la strada a ipotesi che vanno oltre la tassonomia in senso stretto.

Per quanto riguarda il caso di studio sul genere *Duvalius*, l'integrazione tra analisi molecolari e morfometriche ha permesso di verificare con maggiore oggettività lo *status* di taxa problematici dal punto di vista tassonomico. L'analisi morfometrica ha permesso anche di evidenziare quali sono i caratteri morfologici determinanti per la caratterizzazione e distinzione dei vari taxa. I risultati delle due analisi concordano a livello di specie, mentre mostrano delle discordanze a livello sottospecifico. Questo tuttavia è piuttosto comune tra gli organismi di grotta. Le grotte, infatti, rappresentano micro-habitat con caratteristiche altamente specifiche che possono condurre ad una rapida

selezione di caratteri morfologici in tempi relativamente brevi (Caccone & Sbordonì, 2001).

Le analisi morfometriche hanno dimostrato che gli individui delle varie grotte presentano combinazioni peculiari di caratteri che permettono di distinguerli, suggerendo fenomeni di deriva genetica e/o di micro-adattamento alle caratteristiche particolari delle singole grotte. Le singole popolazioni possono essere considerate per questo unità evolutive significative e dovrebbero essere conservate per non perdere un'importante fetta di biodiversità.

La ricerca su *Duvalius* conferma anche l'importanza dei campioni museali, soprattutto nel caso di specie rare e protette. La maggior parte delle specie di *Duvalius* vive in piccole popolazioni estremamente localizzate, spesso in una singola grotta. Il campionamento in questi ambienti è difficile e richiede in genere l'utilizzo di particolari trappole a caduta. Per questi motivi, logistici e conservazionistici, la mia ricerca si è basata principalmente su campioni museali. Questo ha comportato un notevole impegno nello sviluppo di protocolli di laboratorio adeguati a lavorare con DNA degradato. Inoltre, trattandosi di specie per le quali attualmente si hanno informazioni molto scarse sulla struttura genomica, è stato necessario un lungo lavoro per la caratterizzazione di marcatori molecolari specie-specifici adatti alla ricostruzione delle relazioni filogenetiche.

I risultati della ricostruzione filogenetica devono essere considerati come preliminari, dato che si basano su una sequenza piuttosto breve (504 bp) di un solo marcatore; sarebbero quindi auspicabili ulteriori analisi su altri marcatori con più elevato tasso di mutazione, per poter chiarire anche i rapporti a livello di sottospecie. I risultati ottenuti possono comunque essere considerati più che soddisfacenti, considerando anche che si tratta del primo lavoro specifico su questo genere a livello molecolare.

Nel secondo caso di studio, l'analisi molecolare ha confermato appieno i risultati della precedente analisi morfometrica fatta da Dapporto (2010), cioè la presenza in Italia di due specie nettamente separate di *Zerynthia*. Rispetto al precedente lavoro di Dapporto, l'analisi morfometrica è stata integrata con un maggior numero di campioni, andando a studiare soprattutto la zona di contatto tra le due specie. In questo caso la ricerca si è basata su campioni prevalentemente raccolti in natura, che non presentavano le problematiche dei campioni museali; ciò ha permesso di estendere l'analisi molecolare ad un vasto numero di campioni e di sviluppare marcatori genetici sia del DNA nucleare che mitocondriale. Integrando i dati morfometrici con quelli molecolari, è risultata completa concordanza tra tutti i marcatori per i campioni di tutte le località, permettendo di escludere con discreta certezza fenomeni di introgressione tra le due specie. Questo risultato è particolarmente interessante perché invece la maggior parte delle specie sorelle/criptiche di lepidotteri europei mostra fenomeni di ibridazione nelle loro zone di contatto. Il confronto tra i dati morfologici, genetici e climatici e le informazioni relative ad altre specie di lepidotteri suggerisce che le barriere riproduttive tra *Z. polyxena* e *Z. cassandra*

si siano sviluppate in tempi relativamente brevi. Infatti, la maggior parte delle altre specie sorelle/criptiche europee mostrano livelli di divergenza genetica comparabili o addirittura maggiori rispetto a quelli tra le due specie di *Zerynthia*, ma non presentano una forte differenziazione dei genitali e assenza di introgressione.

L'applicazione di modelli di distribuzione delle specie ha permesso di fare ipotesi sui processi che hanno determinato l'isolamento riproduttivo tra le due specie di *Zerynthia* e la loro attuale distribuzione. Anche in questo caso, l'integrazione tra discipline diverse si è dimostrata proficua. Infatti, la distribuzione degli aplotipi e i modelli climatici fanno ipotizzare che durante le fasi glaciali gli areali delle due specie abbiano subito una contrazione e isolamento, seguiti da espansioni durante le fasi interglaciali. La bassa capacità di dispersione di *Zerynthia* è stato molto probabilmente uno dei fattori che ha contribuito alla formazione di due entità nettamente distinte dal punto di vista morfologico e genetico in tempi relativamente brevi.

L'integrazione tra tutti i dati ha permesso non solo di confermare con maggior evidenza che *Z. polyxena* e *Z. cassandra* presentano i requisiti richiesti dal concetto biologico di specie, ma anche che queste due specie rappresentano un'eccezione rispetto alla maggior parte delle specie sorelle/criptiche di lepidotteri europei. Per questo possono rappresentare un interessante modello per studiare la speciazione e l'evoluzione dell'isolamento riproduttivo.

Bibliografia

- Caccone, A. & Sbordoni, V.** 2001. Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from Bathysciine beetles. *Evolution*, **55**, 122-130.
- Dapporto, L.** 2010. Speciation in Mediterranean refugia and post-glacial expansion of *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera, Papilionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **48**, 229-237.
- Mutanen, M. & Pretorius, E.** 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology*, **32**, 371-386.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. & Crozier, R.H.** 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, **55**, 421-438.