



DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE (DEB)

**DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE
BIOLOGICHE (XXIV CICLO)**

TESI DI DOTTORATO:

**FRAMMENTAZIONE GEOGRAFICA, IBRIDAZIONE INTROGRESSIVA E NASCITA
DELL' 'HOTSPOT DI DIVERSITA' GENETICA IN ITALIA MERIDIONALE**

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: BIO/07

DOTTORANDO:

FRANCESCO PAOLO CAPUTO

COORDINATORE:

DOTT. ROBERTA CIMMARUTA

TUTOR:

DOTT. DANIELE CANESTRELLI

1	INTRODUZIONE	4
1.1	Obiettivi della ricerca	4
1.2	La penisola italiana	7
1.2.1	Paleogeologia	7
1.2.2	Paleoclimatologia	10
1.2.3	Filogeografia	11
1.3	Il tritone italiano	14
1.3.1	Distribuzione e habitat	14
1.3.2	Cenni di storia naturale	15
1.3.3	Stato di conservazione	16
1.3.4	Biogeografia della specie	17
2	MATERIALI E METODI	19
2.1	Campionamento	19
2.2	Analisi di laboratorio	20
2.2.1	Analisi elettroforetica di sistemi gene-enzima	22
2.2.1.1	Nomenclatura e pattern elettroforetici	23
2.2.2	Marcatori di sequenza	28
2.2.2.1	DNA mitocondriale	28
2.2.2.2	DNA nucleare	28
2.2.2.3	Estrazione del DNA.	29
2.2.2.4	Amplificazione mediante reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)	30
2.2.2.5	Sequenziamento.	31
2.3	Elaborazioni statistiche	31
2.3.1	Dati allozimici	31
2.3.1.1	Diversità genetica	31
2.3.1.2	Struttura delle popolazioni	32
2.3.1.3	Analisi gerarchica della varianza	33
2.3.1.4	Analisi di flusso genico nella zona di contatto	34
2.3.1.4.1	Definizione dei transetti	34
2.3.1.4.2	Simulazioni	34
2.3.2	Dati Mitocondriali	35
2.3.2.1	Analisi filogenetiche	35
2.3.2.2	Struttura e differenziamento genetico delle popolazioni	36
2.3.2.3	Il tempo di coalescenza	36
2.3.3	Sequenze nucleari	37

2.3.3.1	Analisi di ricombinazione	38
2.3.3.2	Analisi filogenetiche	38
2.3.4	Paesaggi genetici	39
2.3.5	Modellizzazioni della distribuzione della specie	40
3	RISULTATI	42
3.1	Dati allozimici	42
3.1.1	Diversità genetica	42
3.1.2	Struttura delle popolazioni	51
3.1.1	Analisi gerarchica della varianza	55
3.1.2	Analisi di flusso genico nella zona di contatto	55
3.1.2.1	Transetto Catena Costiera-Serre	55
3.1.2.2	Transetto piana del Crati-Sila greca	56
3.1.2.3	Simulazioni	56
3.2	Dati mitocondriali	58
3.2.1	Analisi delle sequenze	58
3.2.2	Analisi filogenetiche	59
3.2.3	Struttura e differenziamento genetico delle popolazioni	62
3.2.4	Il tempo di coalescenza (TMRCA)	62
3.3	Sequenze nucleari	63
3.3.1	Beta fibrinogeno (Fib)	63
3.3.2	Ormone della crescita (Gh)	64
3.3.3	Fattore di crescita derivato dalle piastrine (Pdgrf).	65
3.4	Paesaggi genetici	69
3.5	Modellizzazioni della distribuzione della specie	70
4	DISCUSSIONE	71
4.1	Storia evolutiva di <i>Lissotriton italicus</i>	72
4.2	Principali implicazioni	79
4.2.1	Genesi dell'hotspot di diversità genetica	80
4.2.2	Presenza di due specie criptiche	82
4.2.3	Aspetti conservazionistici	84
5	BIBLIOGRAFIA	87

1 INTRODUZIONE

1.1 OBIETTIVI DELLA RICERCA

Le penisole mediterranee, Iberica, Italiana e Balcanica, sono considerate tra i più importanti *hotspot* di biodiversità del Paleoarctico (Myers et al 2000; Mittermeier et al 2003) in termini sia di diversità di specie, sia di ricchezza di linee endemiche, sia di diversità intraspecifica (Hewitt 2011). Inoltre, anche il differenziamento genetico tra le popolazioni all'interno delle singole specie è maggiore in queste aree piuttosto che in quelle situate più a nord, in linea con quanto osservato in varie regioni del pianeta (Martin e McKay, 2004). Esistono diverse ipotesi per spiegare questo generale cline latitudinale di diversità che derivano fondamentalmente dal crescente apporto di energia (dai poli verso l'equatore) e dalla distribuzione degli habitat (Currie et al 2004). Diversi studi con l'utilizzo di fossili, marcatori molecolari e più recentemente modellizzazioni della nicchia ecologica, hanno accertato il ruolo delle oscillazioni climatiche del Quaternario e delle caratteristiche geomorfologiche delle differenti aree, nel determinare le variazioni nel tempo degli areali di distribuzione delle specie. Ciò ha fornito un contesto generale, ampiamente condiviso dagli studiosi, per comprendere gli attuali pattern di diversità genetica delle specie (per un'ampia rassegna vedi Hewitt 1996, 2004). La persistenza a lungo termine di condizioni ambientali favorevoli in quelle che sono chiamate aree di rifugio (situate generalmente alle basse latitudini) avrebbe permesso il mantenimento di ampie popolazioni stabili e geneticamente variabili. Al contrario la ri-colonizzazione degli habitat precedentemente inospitali, a causa delle restrittive condizioni climatiche, potrebbe essere avvenuta attraverso colli di bottiglia nel fronte di espansione oppure con fenomeni noti come 'effetti del fondatore', determinando una progressiva perdita di variabilità e il conseguente stabilirsi di popolazioni impoverite geneticamente (Hewitt 1996, 1998; Taberlet et al. 1998; Carnaval et al 2009; Weiss & Ferrand 2007).

Gli scenari sopradescritti mettono implicitamente in risalto i processi di riduzione della diversità genetica per spiegare i diversi pattern di variabilità genetica delle popolazioni, tralasciando il coinvolgimento di processi atti ad aumentare la diversità genetica di una specie. Infatti in questo modo la formazione degli *hotspot* di diversità genetica sarebbe legata principalmente alla stabilità delle popolazioni all'interno di rifugi e dunque alla mancata perdita di variazione. Tuttavia recenti studi filogeografici e di genetica delle popolazioni

hanno evidenziato la presenza di differenti aree di rifugio all'interno dei *range* principali dove si suppone le specie si siano rifugiate (per una estesa rassegna sulle penisole europee vedi Hewitt 2011 e citazioni all'interno). Gli autori di questi studi imputano gli alti livelli di diversità genetica trovati nelle popolazioni di queste aree al fatto che le specie hanno subito ripetuti cicli di frammentazione, differenziamento allopatrico, eventualmente seguiti da eventi di contatto secondario con scambio di geni. Questo scenario, mette in risalto i processi micro-evolutivi che possono incrementare la diversità oltre che mantenerla (Gomez e Lunt, 2006). Questi stessi processi evolutivi sono stati anche usati per spiegare perché le specie endemiche delle aree di rifugio mostrano inaspettatamente alti livelli di diversità genetica se comparate a specie congeneriche che hanno al contrario areali ampi e diffusi (e.g. Lewis & Crawford, 1995; Derieg *et al.*, 2008; Canestrelli *et al.*, 2010), violando l'atteso *trend* positivo tra l'area di distribuzione e la diversità genetica di una specie (ad es. Coates *et al.*, 2003; Gitzendanner e Soltis 2000). Riformulando una nota frase di Petit *et al.* (2003), le aree di rifugio Plio-pleistoceniche sarebbero *hotspot* precisamente perché sono anche *melting-pot* (zone di incontro) di diversità intraspecifica (Canestrelli *et al.* 2010).

Stabilità a lungo termine e flusso genico intraspecifico non sono necessariamente mutualmente esclusivi per spiegare la formazione di *hotspot* di diversità. Tuttavia esiste la possibilità che il ruolo del flusso genico sia stato sottovalutato, alterando la nostra percezione della sua rilevanza in questo contesto. Il disegno sperimentale di campionamento appare cruciale in questo senso. Molto spesso quando si studia il pattern di diversità di una specie a livello del suo areale di distribuzione solo un numero limitato di campionamenti cadono nell'area di rifugio (che è spesso circoscritta rispetto al range complessivo di una specie), tralasciando in questo modo la possibilità di individuare l'esistenza di diverse linee evolutive (che spesso sono concentrate proprio in queste aree) e, quindi, di complessi pattern di ibridazioni introgressive (ad es. Canestrelli *et al.* 2010, 2011). In questo modo appare facile interpretare erroneamente la diversità riscontrata come frutto unico di ampie e stabili popolazioni (Taberlet 1998; Gomez & Lunt 2007; Canestrelli *et al.* 2006a). Il set di marcatori utilizzati per effettuare gli studi sui pattern di diversità è un altro problema fondamentale a questo riguardo. Infatti molti studi di filogeografia passati si sono avvalsi di una sola classe di marcatori, con eredità uniparentale (DNA mitocondriale o cloroplastico) oppure biparentale (allozimi, microsatelliti, etc) per fare inferenze sulla storia evolutiva di una specie, rischiando in questo modo di ometterne una parte. Per esempio un evento di contatto secondario con introgressione di geni tra due distinte linee evolutive di una specie, che potrebbe essere

evidente studiando il DNA nucleare, può essere completamente non rivelabile con l'uso di soli marcatori mitocondriali, i quali sono particolarmente inclini a introgressione massiva, la quale omogeneizza il pattern di diversità tra linee divergenti (Chan and Levin, 2005; Avise 2004; Ballard & Whitlock 2004; Canestrelli et al. 2008; Currat et al. 2008). Alternativamente, introgressioni del DNA mitocondriale possono essere le uniche tracce di eventi antichi di ibridazione tra linee evolutive anche molto diverse (ad es. Weisrock et al. 2005; McGuire et al. 2007; Canestrelli e Nascetti 2008; Hofman et al 2007). In alcuni casi solo l'uso congiunto di diversi marcatori mitocondriali e nucleari in un campionamento capillare possono aiutare a distinguere tra eventi passati e recenti di introgressione (Wirtz 1999; Goncalves et al., 2009), tra migrazione e isolamento (Nielsen and Wakeley, 2001) e tra polimorfismi ancestrali ancora condivisi (*incomplete lineage sorting*) e processi estensivi di ibridazione introgressiva (Hey et al, 2004; Weisrock et al, 2005; Canestrelli et al 2007a), fattori che molto spesso possono confondere le inferenze evolutive in una specie (vedi Maggs et al. 2008).

L'obiettivo generale di questa ricerca è stato quello di studiare il ruolo dell'ibridazione tra forme differenziate nell'incrementare la diversità genetica in specie endemiche di un *hotspot* di biodiversità. La penisola italiana è riconosciuta un'area ad alta endemicità e sede di rifugi per molte specie vegetali ed animali, pertanto un'importante *hotspot* di biodiversità del Paleoartico. La complessa e ben documentata storia paleogeografica di questa regione (Ghisetti 1979, 1981; Tortorici 1981; Bonfiglio *et al.* 2002) sembra essere alla base dell'esistenza di più aree di rifugio per molte specie che hanno subito probabilmente fasi di isolamento allopatrico durante gli interglaciali in cui, a causa delle trasgressioni marine, la regione è andata incontro a forte insularizzazione (ad es. Caloi *et al.* 1989; Santucci *et al.* 1996; Canestrelli et al. 2011). L'ibridazione introgressiva, che seguiva le fasi di isolamento, sembra aver giocato un ruolo sostanziale nel determinare l'alta diversità genetica intraspecifica riscontrata nella porzione meridionale della penisola (vedi l'esempio emblematico del mammifero fossorio *Talpa romana* in Canestrelli et al. 2010). Recenti studi condotti con marcatori mitocondriali hanno fatto emergere per un piccolo urodelo endemico dell'Italia centro-meridionale, il tritone italiano, l'esistenza di due cladi principali fortemente divergenti, a loro volta differenziati in vari sub-cladi, che suggeriscono la presenza di otto zone di rifugio nel ristretto areale di distribuzione di questa specie (Canestrelli et al. 2011). La storia Pleistocenica di questo endemismo sembra essere caratterizzata da ripetuti cicli di frammentazione attraverso la formazione di barriere geografiche che hanno determinato divergenza genetica, ma che sono stati inevitabilmente seguiti da altrettanti cicli in cui,

instaurandosi aree di contatto secondario, si lasciava spazio al flusso genico e quindi alla possibilità di introgressione. La totale assenza di copresenza di aplotipi appartenenti ai due cladi principali, anche in popolazioni geograficamente vicine, lascia ipotizzare la possibile esistenza di due specie criptiche, richiamando la necessità di un campionamento più dettagliato e l'uso di marcatori genetici nucleari per valutare i modelli di ibridazione e introgressione tra le principali linee evolutive.

Utilizzando 17 loci allozimici, tre loci nucleari di sequenza e due regioni del DNA mitocondriale come marcatori molecolari si è scelto di studiare la struttura genetica delle popolazioni del tritone italiano *Lissotriton italicus* ad una scala geografica fine, concentrando l'attenzione in differenti zone di possibili contatti secondari. Tramite lo studio del pattern di introgressione genica ai diversi loci si pensa di inferire dove, quando e in quale forma popolazioni distinte geneticamente si sono ibridate. In questo modo ci si aspetta sia possibile poter stimare quanta della diversità riscontrata sia imputabile alla stabilità storica delle popolazioni e quanto invece alla loro frammentazione e successiva ibridazione. Inoltre si è interessati a valutare se e in che modo siano coinvolti altri fattori di isolamento riproduttivo, oltre a quelli geografici, nel determinare la marcata discontinuità filogenetica riscontrata tra le popolazioni dei due cladi principali.

1.2 LA PENISOLA ITALIANA

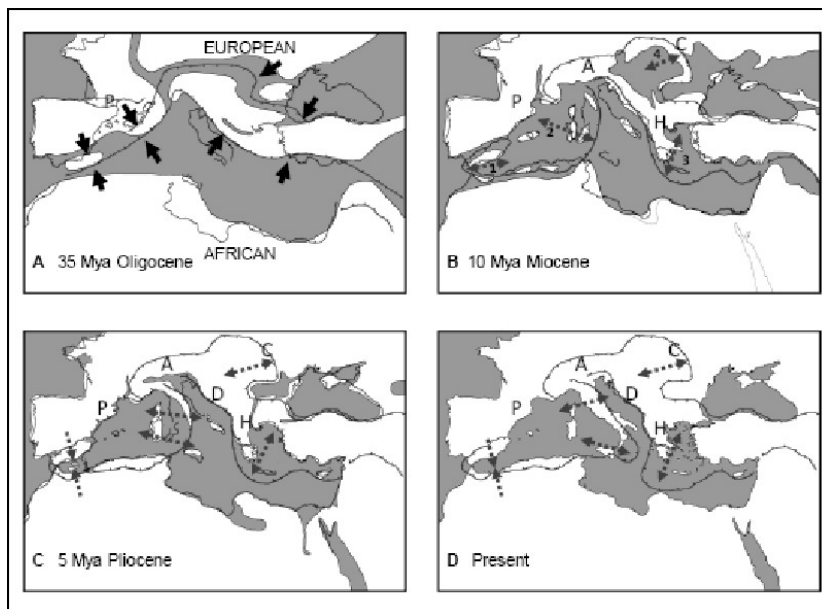
L'alta diversità genetica e di specie che si trova nelle penisole del Mediterraneo è di importanza teoretica e concettuale, ma ha anche un grande valore conservazionistico. Capire come questa diversità si è evoluta nel tempo a livello sia di popolazioni che di specie ci permette di prendere decisioni chiare e precise su quali processi bisogna preservare per garantire una conservazione a lungo termine della biodiversità (Allendorf e Luikart, 2007). Considerando questo, lo studio e conoscenza di tre aree di recente sviluppo sono di fondamentale importanza: la Paleogeologia, la Paleoclimatologia e la Filogeografia.

1.2.1 Paleogeologia

La collisione delle placche tettoniche africana ed europea, con la conseguente complessa strutturazione della terra e delle acque del bacino del Mediterraneo a partire dall'inizio del Cenozoico (65My), produsse ponti terra, fosse marine e, infine, le molto diverse penisole di Iberia, Italia e Balcani (Figura 1-1; Robertson & Grasso 1995; Carminati & Doglioni 2005;

Jolivet et al 2006). I dettagli di questo processo sono ancora molto discussi e ricercati, ma alcuni punti sembrano particolarmente rilevanti per l'evoluzione dei *biota* nelle penisole. La massa di terra iberica è antica e l'orogenesi dei Pirenei avvenne presto, il loro sollevamento si concluse con l'Eocene. In questo momento vi è stata una significativa fase di orogenesi ellenica e dei Balcani, con numerose creste e canali sommersi, in continuità con la proto-Turchia. Tuttavia le Alpi stavano solo iniziandosi a formare, con la subduzione della piattaforma Apula sotto quella Europea, il culmine dell'orogenesi alpina fu nel Miocene (~20My). La penisola italiana, emerse molto più tardi, come un insieme di componenti iberiche, africane ed elleniche (Figura 1-1).

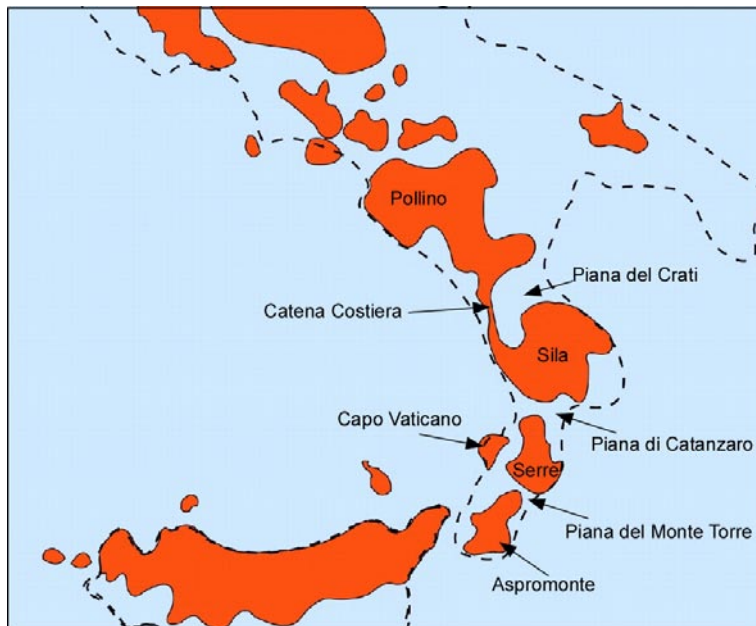
Figura 1-1: Evoluzione geologica delle penisole mediterranee. P: Pirenei; A: Alpi; C: Carpazi; H: monti Ellenici; D: monti Dinarici. (modificato da Carminati e Doglioni, 2005)



Tra i 34 e 6 Mya sezioni della placca iberica si spinsero verso l'Appennino, lasciando la Corsica, la Sardegna e le Isole Baleari nel mezzo del Mediterraneo. L'Appennino settentrionale emergente entrò in connessione con le Alpi a metà del Pliocene, e molte parti dell'Italia si riunirono nel tardo Pliocene, mentre Calabria e la Sicilia solo nel Pleistocene (2My; Bonfiglio et al 2002). A partire dal Pliocene inferiore, intensi fenomeni tettonici hanno generato nell'arco calabro-peloritano, costituito da Calabria e Sicilia nord-orientale, un complesso sistema di faglie e di fosse (Ghisetti, 1979; Tortorici, 1981). La regione si presentava allora come un arcipelago di isole costituite dalle vette della Sila, delle Serre, Capo Vaticano e dell'Aspromonte e da una penisola che aveva come limite meridionale l'area sommitale del Pollino e si protendeva a settentrione collegandosi al resto della catena

appenninica. I principali graben erano costituiti dall'attuale piana del fiume Crati, la piana di Catanzaro e lo stretto di Messina. La paleoprovincia Calabrese è stata interessata da un processo generale di sollevamento già dal Tortoniano, ma le aree di fossa sono state soggette a cicliche trasgressioni marine fino al Pleistocene superiore (Figura 1-2). In particolare, il nord e il centro della Calabria si trovarono in connessione tra loro solo a partire del Pleistocene inferiore con l'orogenesi della Catena Costiera; la piana di Crati-Sibari ha iniziato il processo di sollevamento nel medio-tardo Pleistocene mentre la piana di Catanzaro, che separava centro e sud della Calabria, ha mostrato una definitiva tendenza al sollevamento solamente dal Pleistocene superiore (Ghisetti, 1979). In queste zone il tasso medio di sollevamento non è stato mai inferiore a 1 mm all'anno negli ultimi 600 mila anni e si deve non solo ai movimenti tettonici ma anche all'importante apporto di sedimenti sia di natura marina che fluviale che si sono concentrati in queste aree (Cucci, 2004). Lo stretto di Messina rappresenta un'altra area di fossa che, pur presentandosi attualmente sommersa, durante gran parte del Pleistocene è stata soggetta ad un'intensa attività tettonica che ha favorito frequenti connessioni tra Calabria e Sicilia (Caloi *et al.*, 1989).

Figura 1-2: Ricostruzione dell'Italia meridionale nelle fasi interglaciali



1.2.2 Paleoclimatologia

Il clima sulla terra è andato incontro a un processo di raffreddamento attraverso il Quaternario con oscillazioni marcate, e nell'ultimo milione di anni abbiamo avuto circa 10 ere glaciali principali con altrettante fasi interglaciali. L'entità delle glaciazioni è stata varia, e ha avuto il suo picco massimo durante l'ultimo massimo glaciale (LGM, 25-18ky). All'origine di tali oscillazioni vi sono fenomeni di differente natura, che interagiscono fra loro e incidono sul clima a scale temporali diverse e con intensità variabile. Le variazioni più drastiche sono riconducibili a fenomeni tettonici e producono effetti apprezzabili in tempi dell'ordine di 10^5 - 10^7 anni. Variazioni cicliche di entità più modeste avvengono sia su scala millenaria con periodicità di circa 10^3 - 10^4 anni, sia su scala di 10^4 - 10^5 anni. Le prime sono riconducibili a mutamenti della composizione atmosferica, principalmente delle concentrazioni di CO_2 e di CH_4 , ed hanno effetti prevalentemente sulla quantità di radiazione solare assorbita dall'atmosfera, mentre le seconde sono le cosiddette "oscillazioni di Milankovitch" (per una rassegna vedi Zachos *et al.*, 2001 e riferimenti all'interno). Si tratta di alterazioni cicliche dell'orbita terrestre che causano variazioni nell'entità delle radiazioni solari incidenti sull'atmosfera terrestre, che consistono nella discontinuità del moto di precessione (periodo di 21.000 anni), dell'inclinazione dell'asse terrestre (periodo di 41.000 anni) e dell'eccentricità dell'orbita della terra intorno al sole (periodo di 100.000 e 400.000 anni) (Crowley, 2002 e riferimenti all'interno). Tali eventi hanno determinato l'alternanza di fasi glaciali e interglaciali, che ha influito in maniera differente sulle varie aree del pianeta sia in riferimento all'entità che alle modalità (Hewitt, 2004a). Hanno subito alterazioni le variabili ambientali, come ad esempio il regime monsonico (ad es. Lu *et al.*, 2000), i bacini fluviali, con variazioni nella portata, nella quantità e nella natura dei sedimenti nonché nello stesso tracciato dei fiumi (ad es. Vandenberghe, 2002), come pure le temperature ed il livello dei mari (ad es. Scott & Collins, 1996).

In particolare per quanto riguarda l'Europa, Van Andel & Tzedakis (1996) riportano il seguente quadro generale: durante le fasi pleniglaciali i ghiacci artici si espansero verso Sud fino al 52° parallelo, ai cui margini si estese un deserto polare seguito da terreni gelati fino al 45° parallelo, i quali, sciogliendosi durante il periodo estivo, consentirono la presenza di una copertura di piante erbacee - tundra su terreni impermeabili ed umidi mentre steppa su quelli ben drenati ed aridi - che invasero tutto il continente. Le catene montuose meridionali, i Pirenei e le Alpi, furono ricoperte dai ghiacci mentre le penisole del sud presentarono un

paesaggio dominato da steppa arida, con alcune aree silvestri rifugiali ove consentito dall'umidità. Boschi di conifere sopravvissero nel nord dei Balcani, sugli Appennini settentrionali e nel nord-ovest della Spagna, mentre verso sud, in tutte e tre le penisole, italica iberica e balcanica, le conifere furono sostituite prima da alberi decidui, poi da foresta mediterranea sempreverde (ad es. Lowe *et al.*, 1996; Magri, 1999; Ghinassi *et al.*, 2004). Le temperature scesero, assumendo valori medi annuali di circa 7-8°C inferiori agli attuali, con medie estive intorno a 10°C nell'Europa centro-occidentale; le precipitazioni fecero registrare medie annue del 70-80 % più basse rispetto alle odierne (Van Andel & Tzedakis, 1996). Il livello dei mari regredì di 100-130 m prosciugando l'Adriatico a nord del 40° parallelo ed i principali arcipelaghi divennero un'unica isola, mentre la Sicilia formò un continuum con la Calabria (Ridente & Trincardi, 2002; Carboni *et al.*, 2005). I periodi interglaciali furono caratterizzati dalla regressione dei ghiacciai: quelli artici si ritirarono all'interno del circolo polare, quelli alpini si ridussero entro margini simili a quelli attuali; le temperature crebbero superando di 3-4°C quelle dei nostri giorni nell'Europa centrale e meridionale; anche le temperature marine crebbero e nel Mediterraneo si registrarono valori di 3-4°C superiori a quelli di oggi (Van Andel & Tzedakis, 1996). Si verificarono trasgressioni marine con conseguenti allagamenti delle pianure alluvionali, quale ad esempio la pianura Padana, e delle aree di fossa come la piana del fiume Volturno, la piana di Crati-Sibari, che separa la Calabria dal resto della penisola, la piana di Catanzaro, che separa la Calabria meridionale da quella centrale e la piana del Monte Torre (Figura 1-2; Romano *et al.*, 1994; Barra *et al.*, 1996 e riferimenti all'interno; Bernasconi *et al.*, 1997; Chiocci *et al.*, 1997; Amorosi & Milli, 2001; Bonfiglio *et al.*, 2002; Cucci, 2004). Durante queste fasi, come già precedentemente descritto, la Calabria appariva come un arcipelago le cui isole furono l'Aspromonte, le Serre, il massiccio di Capo Vaticano, la Sila (Bonfiglio *et al.*, 2002).

1.2.3 Filogeografia

La Filogeografia è la disciplina che si occupa dei principi e dei processi che hanno determinato l'attuale distribuzione geografica delle linee genealogiche dei geni, all'interno delle specie e tra specie strettamente affini (Avise *et al.*, 1987). Tra i fattori storici che hanno maggiormente contribuito a strutturare l'attuale distribuzione geografica delle specie e della variazione genetica all'interno di esse, vi sono le oscillazioni climatiche del Quaternario. Evidenze fossili (ad es. Bonfiglio *et al.*, 2002), palinologiche (ad es. Tzedakis *et al.*, 2002) e genetiche, indicano che numerose specie animali e vegetali sopravvissero alle condizioni

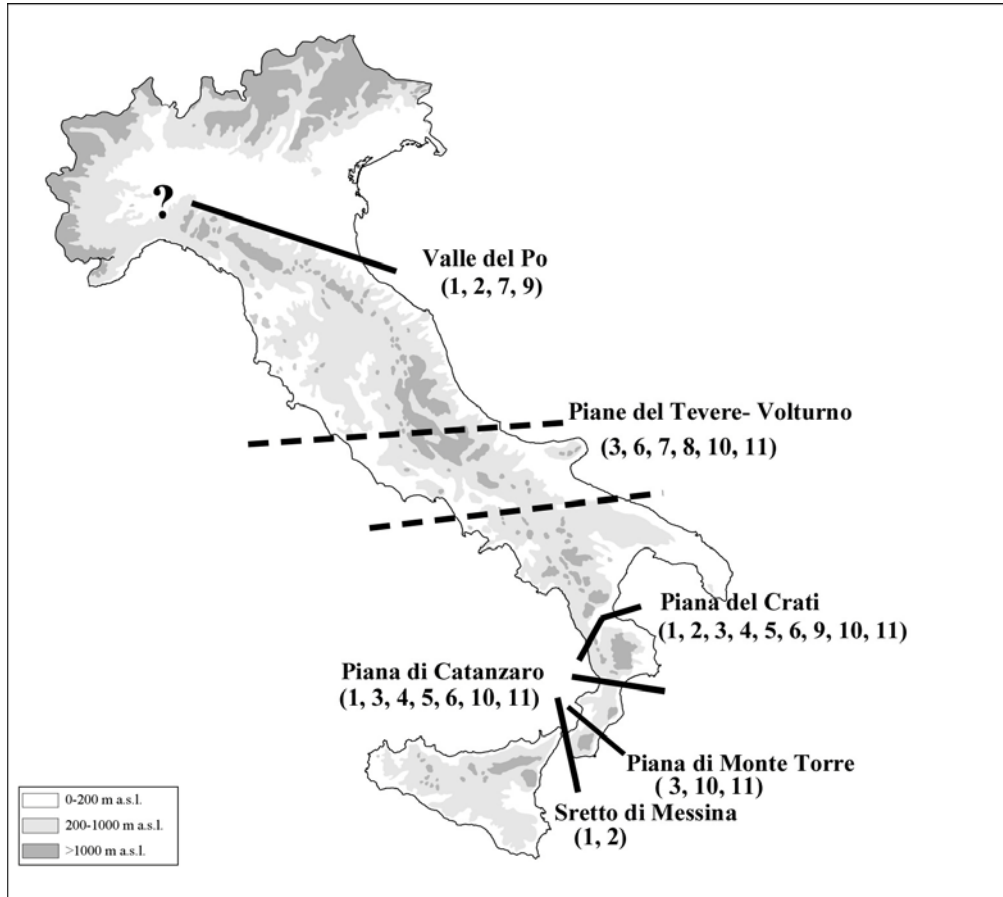
climatiche avverse proprie delle fasi glaciali, rifugiandosi prevalentemente nelle penisole mediterranee e molto spesso proprio nella loro porzione meridionale (Hewitt, 2000; Stewart & Lister, 2001). La penisola italiana è riconosciuta un'area ad alta endemicità e sede di rifugi per molte specie vegetali ed animali.

Attualmente esistono numerose evidenze dell'esistenza di rifugi multipli nella penisola italiana, forniteci principalmente da studi di genetica delle popolazioni dell'ultima decade (vedi Hewitt 2011) e proprio gli effetti della complessa storia paleogeografica e paleoclimatica di questa regione (descritta nei due paragrafi precedenti) sembrano spiegare un tale scenario. Differenti specie mostrano chiari segni genetici che supportano un quadro di rifugi multipli: taxa vegetali (Vettori et al 2004; Heuertz et al 2006; Magri, 2008), invertebrati (Nieberding *et al.* 2005), uccelli (Hourlay et al. 2008), numerosi rettili (Joger et al 2007, Podnar et al. 2005, Ursenbacher et al. 2006, Fritz et al 2005, Bohme et al 2007, Giovannotti et al. 2007), anfibi (Santucci *et al.* 1996; Steinfartz et al. 2000; Nascetti et al 2005; Canestrelli *et al.* 2006a, 2007a, 2007b, 2008, 2011; Canestrelli & Nascetti, 2008; Sacco 2010) e mammiferi (Pierpaoli et al. 1999; Seddon et al. 2001; Vernesi et al. 2002; Fickel et al. 2008; Castiglia et al. 2008; Grill et al. 2009; Canestrelli et al. 2010; Vega et al. 2010). La maggior parte di questi taxa studiati della penisola italiana, a differenza delle altre principali penisole del mediterraneo, contengono divergenze solo a partire dal Pleistocene, e ciò potrebbe essere dovuto in gran parte alla recente formazione della penisola (Hewitt, 2011). Molte di queste specie mostrano differenti componenti genetiche nel nord, centro e sud Italia, che possono essere correlate alle catene montuose più importanti (Figura 1-3). I principali rilievi montuosi del nord Italia, quelli maggiormente soggetti a glaciazioni, hanno costituito importanti barriere alla dispersione per diverse specie animali. L'Appennino settentrionale, ad esempio, identifica il limite settentrionale o meridionale dell'areale di diverse entità, tra cui diversi Anfibi, come *Rana italica* e *Bombina pachypus*, endemiche dell'Italia peninsulare, le due specie *Salamandrina perspicillata* e *Salamandrina terdigitata*, endemiche appenniniche e vicarianti a nord ed a sud della piana del Volturno (Nascetti *et al.*, 2005; Canestrelli *et al.*, 2006b) e *Rana latastei*, il cui areale è pressappoco coincidente con la pianura Padana, (Lanza, 1983). Secondo Bianco (1994) l'Appennino settentrionale ha rappresentato una barriera alla dispersione anche per numerose specie di pesci d'acqua dolce.

L'Italia meridionale, pur essendo stata meno soggetta ai fenomeni glaciali rispetto al resto della penisola, come poc'anzi ricordato, è stata interessata durante tutto il Plio-Pleistocene da

ampie fluttuazioni glacio-eustatiche del livello del mare, nonché dagli effetti di importanti eventi geologici (Giraudi, 2004). La distribuzione della diversità genetica appare particolarmente frammentata in quest'area, specialmente nella sua porzione più meridionale (Canestrelli et al 2006a, 2008, 2010, 2011; Canestrelli & Nascetti 2008). Molti dei cladi descritti sono associati con i principali massicci montuosi Calabresi, che, come abbiamo visto, sono state le isole emergenti e successivamente unitesi alla penisola nel corso del Quaternario ma che durante le fasi interglaciali, si sono separate più volte a causa delle trasgressioni marine che coinvolgevano le principali piane (piana del Crati-Sibari, la pianura di Catanzaro, lo stretto di Messina ma anche la piana del monte Torre; Figura 1-2). Queste piane, nei periodi in cui furono sommerse, sembrerebbero aver agito come barriere contro la dispersione di molte specie, ipotesi supportata anche da dati fossili (Caloi *et al.*, 1989; Figura 1-3). Al contrario, le piane nei periodi glaciali appaiono come zone dove differenti linee evolutive si sono ritrovate in contatto secondario con la possibilità di flusso genico (Canestrelli et al 2007b; 2010). La storia evolutiva inferita per il già citato mammifero endemico *Talpa romana* esemplifica molto chiaramente il ruolo preponderante di eventi di contatto secondario con flusso genico nella formazione dell'*hotspot* di diversità genetica. Le maggiori discontinuità nella distribuzione geografica della variazione genetica di questa specie sono tutte localizzate in prossimità delle aree storicamente inondate durante le fasi interglaciali del Pleistocene (specie n.10 in Figura 1-3) e quelle localizzate nella Calabria sono risultate con un *pattern* per lo più di tipo clinale e quindi che supportano l'occorrenza d'introggressione a seguito di contatti secondari; contatti che sembrano essere avvenuti in almeno due occasioni durante la storia evolutiva di questo mammifero (Canestrelli et al 2010). E' possibile affermare che all'aumentare dei casi di studio riferiti all'Italia meridionale, aumenta anche l'evidenza che quest'area appaia un luogo di incontro (*melting pot*) di diversità intraspecifica piuttosto che un'area di stabilità a lungo termine, dove le specie sono sopravvissute all'instabilità climatica del Quaternario.

Figura 1-3: Principali discontinuità geografiche in 11 specie con distinte linee genetiche della Penisola Italiana. Specie: 1 *Rana lessonae*; 2 *Hyla intermedia*; 3 *Rana italica*; 4 *Bombina pachypus*; 5 *Podarcis sicula*; 6 *Rana dalmatina*, 7 *Salamandra salamandra*; 8 *Vipera aspis*; 9 *Fagus sylvatica*; 10 *Talpa romana*; 11 *Lissotriton italicus* (modificato da Hewitt, 2011).



1.3 IL TRITONE ITALIANO

1.3.1 Distribuzione e habitat

Il tritone italiano, *Lissotritons italicus* (Peracca, 1898), della famiglia Salamandridae, è una specie endemica dell'Italia peninsulare (Figura 1-4), il suo areale è delimitato a Nord da una ipotetica linea che va dalle Marche (a sud di Ancona) al golfo di Gaeta (Bucci-Innocenti et al., 1983). Il massiccio dell'Aspromonte rappresenta il limite meridionale di distribuzione della specie. Nelle parti meridionali dell'areale, all'incirca dalla Campania centrale, il tritone italico sembra essere l'urodelo più comune e diffuso. La distribuzione altitudinale di questa specie varia dal livello del mare a 1855 m (Monte Pollino) ma è maggiormente frequente tra i 300 e i 700 m. s.l.m. (Scillitani et al., 2004). E' una specie di piccole dimensioni, i maschi non superano la lunghezza di 80 mm mentre le femmine, leggermente più lunghe, quella di 95

mm; pertanto le capacità dispersive sono relativamente molto ridotte, anche a causa del fatto di essere molto legato ad ambienti acquatici di tipo lentic, generalmente di piccola superficie.

Il tritone italiano è una specie euriecia, presenta infatti un notevole grado di adattabilità a condizioni climatiche e idrobiologiche differenti. Sebbene preferisca in maniera piuttosto evidente raccolte d'acqua ferma, sia naturali che artificiali, la specie è adattata a colonizzare anche ambienti estremi ed effimeri, talvolta caratterizzati da acque debolmente correnti. Gli ambienti più frequentati in molte parti dell'areale, specie in quelle più meridionali, sono corpi d'acqua ferma di origine antropica, quali vasche per l'irrigazione, abbeveratoi per il bestiame e fontanili, che garantiscono un costante afflusso d'acqua nel corso dell'anno ed abbondanti riserve di invertebrati acquatici (Giacoma et al., 1988; Scillitani et al., 2004; Sperone e Tripepi, 2005). Tra gli ambienti naturali, la specie colonizza frequentemente pozze e stagni, anche quelli soggetti a completo essiccamento durante la stagione estiva. Nei biotopi di acqua lotica la specie può essere rinvenuta quasi esclusivamente nelle raccolte d'acqua formatesi per la deviazione parziale del corso d'acqua o per la concavità del suolo. I siti riproduttivi sono condivisi un po' con tutte le specie di anfibi presenti nell'areale, principalmente a causa dell'alta versatilità della specie. Rari sono i casi di sintopia con la specie congenerica *L. vulgaris* nel Lazio, Abruzzo e Molise.

1.3.2 Cenni di storia naturale

Il tritone italiano mostra un tipico ciclo riproduttivo annuale a pattern dissociato suddivisibile in quattro fasi: 1) fase acquatica; 2) fase di emigrazione; 3) fase terrestre; 4) fase di immigrazione (Scillitani e Tripepi, 2007). La fase acquatica comprende il periodo più esteso, grosso modo, dalla fine di ottobre a quasi tutto maggio. Il periodo di massima frequenza degli animali in acqua comprende tuttavia i mesi di dicembre, gennaio e febbraio, mentre negli altri mesi si ha sempre attività riproduttiva, ma in acqua è presente un numero di esemplari minore; in particolare, col procedere della primavera gli animali iniziano la fase di alimentazione e si preparano poi ad affrontare la fase terrestre. Il corteggiamento avviene in acqua, con il maschio che esegue una complessa danza per attirare la femmina. Il comportamento di corteggiamento è stereotipato, con lunghe sequenze di interazioni stimolo-risposta tra i sessi. In *L. italicus* si osserva il tipo di corteggiamento tollerante (Giacoma e Balletto, 1988) caratterizzato da scarsa territorialità, corteggiamento simultaneo di più maschi intorno ad una stessa femmina e stimoli per lo più di tipo olfattivo. Le femmine depongono da

200 a 300 uova, facendole aderire alle foglie delle piante acquatiche che afferrano con gli arti posteriori. Le larve compaiono in acqua già da gennaio e di solito completano il loro sviluppo prima dell'inizio della fase terrestre anche se la neotenia è piuttosto frequente (Scillitani et al., 2004).

La fase di emigrazione inizia verso la fine di maggio e si protrae fino tutto giugno. Questa può essere definita come una fase di transizione durante la quale si osserva uno spostamento dei tritoni dall'acqua all'ambiente esterno. La fase terrestre ha inizio all'incirca a luglio e termina alla fine di agosto. Le dimensioni diminuiscono notevolmente in ambo i sessi. I cambiamenti maggiori si riscontrano nella coda: infatti oltre alla riduzione in lunghezza si assiste al riassorbimento sia della cresta dorsale che di quella ventrale. Le parti dorsali si colorano di un marrone brunoastro e la pelle risulta più secca e ruvida. In questa fase i tritoni alloggiano sotto i sassi e/o sotto le foglie e legno marcescente, dove è presente una certa, anche se minima, umidità. La fase di immigrazione si estende dalla fine di settembre agli inizi di novembre e può essere considerata una fase di transizione, con una parte della popolazione ancora presente a terra ed una parte già in acqua. La fedeltà al sito di nascita è molto elevata: in due anni di osservazioni di due pozze collegate da un breve canale in territorio di Martina Franca (puglia) solo in sei casi su 1430 gli animali marcati in una pozza sono stati ritrovati in un'altra (Scillitani e Tripepi, 2007).

1.3.3 Stato di conservazione

Nonostante la relativa plasticità adattativa, la specie sembra in declino in gran parte dell'areale, a causa di perdita di habitat, legata a trasformazioni o distruzione di corpi idrici, inquinamento e introduzione di specie acquatiche alloctone. Scillitani et al. (2004) hanno campionato 154 popolazioni in gran parte dell'areale per definire delle linee guida di conservazione; di queste, 22 popolazioni precedentemente segnalate sono risultate estinte. Il *L. italicus* è inserito nell'Allegato IV della Direttiva Habitat che include le "specie animali e vegetali di interesse comunitario che richiedono una protezione rigorosa" (Direttiva 92/43/CEE e successive modifiche). La specie è inoltre citata in Appendice III della "Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats" (Convenzione di Berna). Infine, essa è protetta da leggi regionali in alcune regioni italiane (Lazio, Abruzzo, Molise e Calabria). Nonostante alcuni autori hanno suggerito uno *status* "Vulnerable" (Scillitani et al., 2004; Scillitani e Tripepi, 2007), *L. italicus* viene considerato dalla IUCN come specie "Least Concern" (IUCN, 1996).

1.3.4 Biogeografia della specie

La variazione geografica di *L. italicus* è stata studiata su base morfologica (Scillitani, 1992; 1998; Scillitani et al., 1993), cariológica (Ragghianti et al., 1980; Bucci-Innocenti et al., 1986), elettroforetica di sistemi gene-enzima (Ragghianti & Wake, 1986; Cataudo et al., 2000) e mitocondriale (Canestrelli et al., 2011). I dati morfologici non mostrano differenze geografiche riscontrabili a causa dell'elevata variabilità interpopolazione presente nella specie. I primi studi condotti sul pattern di distribuzione geografica della diversità genetica sono stati tra i primi lavori dove per una specie della penisola italiana è stato ipotizzato uno scenario a rifugi multipli (Bucci-Innocenti et al., 1986 e Ragghianti & Wake, 1986). L'analisi della variazione genetica condotta sia a livello del cromosoma XII (Bucci-Innocenti et al., 1986) sia ai loci allozimici (Ragghianti & Wake, 1986; Cataudo et al., 2000), infatti, misero in evidenza come nel complesso le popolazioni campionate potevano essere raggruppate in due gruppi principali, uno settentrionale (Marche, Abruzzo, Lazio, Campania) ed uno meridionale (Puglia, Basilicata e Calabria) probabilmente di origine Pleistocene- medio, e come tra i due gruppi ci fosse un'ampia zona di transizione, frutto di un probabile contatto secondario. Tuttavia, in nessuno degli studi citati sono presenti campioni delle popolazioni della Calabria meridionale, dove il tritone è molto frequente e dove il recente lavoro di Canestrelli et al. (2011) ha evidenziato essersi svolto il più antico capitolo della storia evolutiva di questa specie.

Infatti lo studio della diversità di due frammenti del DNA mitocondriale (Canestrelli et al. 2011), su un campionamento distribuito lungo tutto l'areale della specie, ha mostrato l'esistenza di due cladi principali S e N, con divergenza datata all'inizio del Pleistocene, di cui uno distribuito unicamente nella Calabria meridionale e l'altro in tutto il resto dell'areale. La specie sembra essere andata incontro a ripetuti cicli di frammentazione allopatrica durante tutto il Pleistocene attraverso la formazione di barriere geografiche che hanno determinato una forte differenziazione genetica intraspecifica. La specie probabilmente ha passato l'ultimo ciclo glaciale in otto aree di rifugio, come suggerito dalla presenza di otto cladi terminali nell'albero filogenetico. Le principali aree di discontinuità sembrano essere localizzate nella Piana di Crati-Sibari (per i cladi principali N e S), nella piana di Catanzaro (per sottocladi di S) che ha agito da barriera almeno in due occasioni durante il pleistocene medio e l'ultima localizzata orientativamente tra gli Appennini centrali e quelli settentrionali (per i sottocladi di N, Figura 1-3). La totale assenza di copresenza di aplotipi appartenenti ai due lineamenti

principali anche nelle zone dove popolazioni di tipo S e N sono in prossimità geografica, lascia supporre la presenza di due specie criptiche, invocando la necessità di un campionamento più dettagliato e l'uso di marcatori genetici nucleari per valutare i modelli di ibridazione e introgressione tra le due principali linee evolutive.

La piccola taglia, la dipendenza da ambienti acquatici lenticivi, la fedeltà al sito di nascita e di conseguenza la scarsa capacità dispersiva fanno di questa specie un modello per studi di biogeografia storica (Canestrelli *et al.*, 2011). Diversi autori considerano le specie appartenenti al genere *Lissotriton* particolarmente interessanti da studiare in quanto fortemente inclini a mantenere le impronte genetiche dell'evoluzione Paleoeologica del loro habitat e dei processi micro-evolutivi da essa innescati (Martínez-Solano *et al.*, 2006; Babik *et al.*, 2005; Canestrelli *et al.*, 2011).

Figura 1-4: *Lissotriton italicus*



2 MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONAMENTO

In questo lavoro sono stati utilizzati 488 campioni di *Lissotriton italicus* raccolti in 44 differenti siti (da qui in poi nominati anche popolazioni) distribuiti per tutto l'areale di distribuzione della specie. Un totale di 287 campioni sono stati raccolti tra ottobre 2008 e Aprile 2010 durante differenti sessioni di campionamento, mentre i restanti 201 esemplari sono stati raccolti in una precedente fase del lavoro (vedi Sacco 2010 e Canestrelli et al. 2011).

Due criteri principali sono stati usati per realizzare uno schema di campionamento che potesse essere il più possibile esaustivo per i nostri obiettivi, data la forte strutturazione genetica già descritta da Canestrelli et al. (2011) per la specie in oggetto. In primo luogo abbiamo integrato il campionamento della precedente fase del lavoro in tutte le macro-aree mancanti dell'areale complessivo della specie nonché abbiamo cercato di aumentare, ove possibile, il numero di individui per popolazione. In questo modo abbiamo campionato in 3 stazioni nella parte nord dell'areale, 7 nel massiccio del Pollino e due nella catena montuosa delle Serre (Figura 2-1). Nel massiccio della Sila sono state effettuate diverse escursioni ma non sono stati trovati individui di *L. italicus* eccetto nel versante nord-est (Sila greca). Il secondo criterio è stato quello di campionare, ad una scala geografica più fine, nelle possibili zone di contatto secondario tra i due principali cladi (N e S) emersi dalle analisi mitocondriali della precedente fase del lavoro (vedi Sacco 2010 e Canestrelli et al. 2011). Abbiamo campionato seguendo due transetti (Figura 2-1): 1) il primo nella Catena Costiera, con una orientazione nord-sud, tra le stazioni Lago dei due Uomini (IDUE, n° 31 in Figura 2-1) e Nocera Terinese (INOC, n°38 in Figura 2-1), dove sono stati catturati esemplari in 5 siti; 2) il secondo nella Piana del Crati-Sibari, con una orientazione est-ovest, tra le stazioni di Lago dei due Uomini (IDUE, n° 31) e Crosia (ICRO, N° 27 in Figura 2-1) dove abbiamo campionato tritoni in altri 4 siti. La provenienza geografica e i dettagli di tutti i siti sono riportati in Tabella 2-1. I campionamenti sono stati effettuati durante la stagione riproduttiva (da maggio a settembre), quando si suppone di trovare gli animali in acqua. I luoghi considerati possibilmente idonei per la presenza di siti di riproduzione venivano selezionati tramite un'analisi di immagini satellitari del territorio con l'utilizzo del programma Google Earth e con l'ausilio delle segnalazioni riportate in letteratura (Scillitani et al, 2004). Le escursioni sul campo sono state

effettuate sia ricercando individui a vista che effettuando ripetuti retinamenti in tutti i ruscelli, sorgenti, pozze naturali o artificiali ed impaludamenti presenti nell'area selezionata. Ogni individuo catturato è stato anestetizzato sul posto attraverso un'immersione in una soluzione allo 0.02% di *Tricaina Metansolfonato* (MS222) e quindi è stata praticata l'asportazione della porzione terminale della coda (*toe-clipping*), secondo il protocollo suggerito da Heyer et al. (1994). Dopo questa procedura ogni tritone è stato rilasciato nell'esatto punto di campionamento e i tessuti prelevati sono stati trasferiti in laboratorio in azoto liquido e quindi conservati in congelatori regolati a -80 °C.

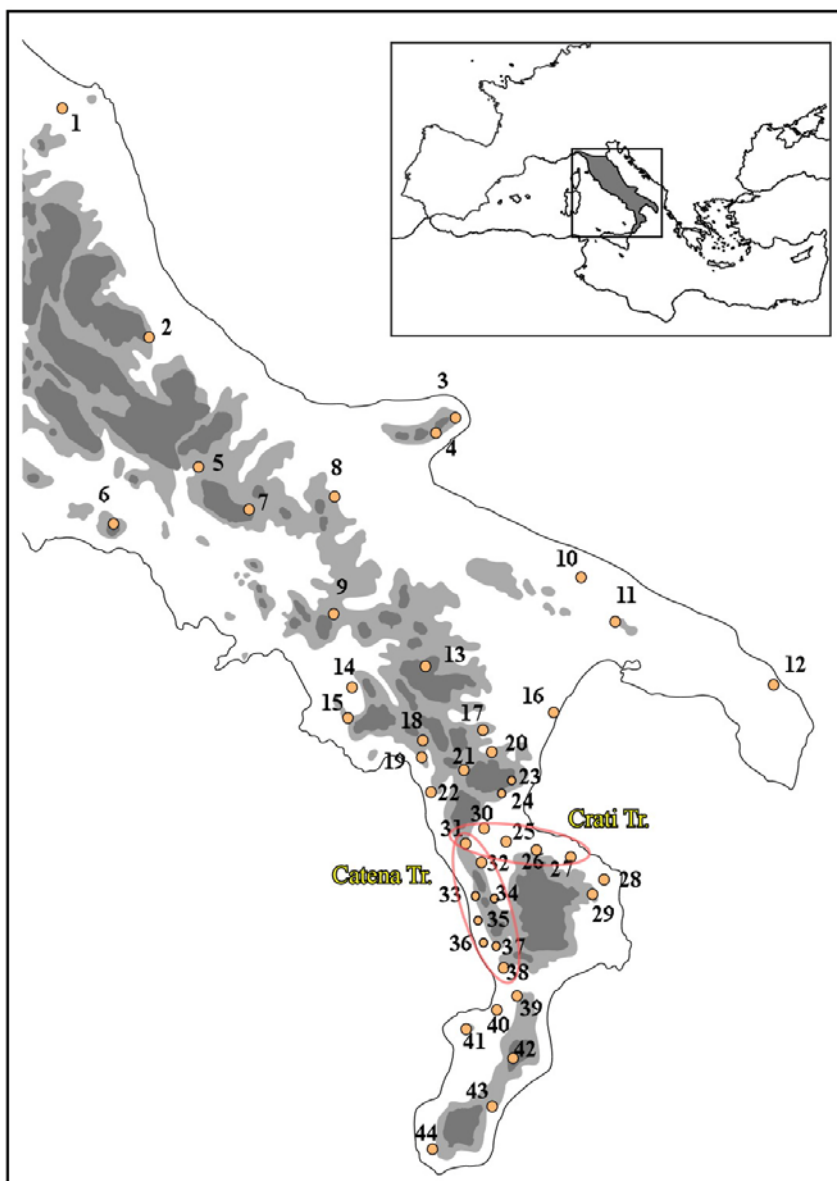
2.2 ANALISI DI LABORATORIO

Per 414 campioni è stato studiato il pattern di variazione a 17 presunti loci allozimici. L'analisi delle sequenze di due regioni del DNA mitocondriale sono state effettuate per 358 individui, utilizzando i dati presentati in Canestrelli et al (2011) completati con sequenze di individui provenienti da altre 12 popolazioni. Un sub set di campioni rappresentanti 42 dei 44 siti campionati sono stati utilizzati per ottenere sequenze da tre differenti geni nucleari. Il numero di individui di ogni popolazione usati in ognuna delle differenti analisi è riportato in Tabella 2-1.

Tabella 2-1: Localizzazione geografica dei 44 siti di campionamento e numero degli individui analizzati.

<i>Località di campionamento</i>			Coordinate			Numero				
			sigla	long.	latit.	Allozimi	mtDNA	BFX	Gh	Pdgfr
<i>App. nord</i>	1	Serra San Quirico	IQUI	13.0169	43.4336	2	2	2	2	1
	2	Cascata Vitello Orc	IORO	13.8078	42.4250	-	1	5	4	3
<i>Gargano</i>	3	Foresta Umbra	IUMB	16.0216	41.8561	8	3	-	3	3
	4	Mattinata	IMAT	16.0604	41.7587	4	1	3	3	3
<i>App. centrale</i>	5	Pescolanciano	IPES	14.3336	41.6669	14	16	5	4	2
	6	Monte Redentore	IREN	13.6169	41.3003	11	14	3	6	2
	7	Guardiaregia	IGUA	14.5715	41.3964	-	3	4	-	-
	8	Roseto Valfortore	IROS	15.0836	41.3669	9	12	5	3	6
	9	Conza	ICNZ	15.3095	40.8754	-	4	4	6	6
<i>Puglia</i>	10	Lago Castiglione	ICST	17.1169	40.9503	16	12	6	6	5
	11	Alberobello	IALB	17.1957	40.7867	-	6	5	2	2
	12	Le Cesine	ILEC	18.1742	40.3356	-	7	3	5	3
<i>Lucania</i>	13	Rifreddo	IRIF	15.8169	40.5503	-	6	5	3	4
<i>Cilento</i>	14	Ottati	IOTT	15.3169	40.4503	13	13	6	5	4
	15	Stio	ITIO	15.2503	40.3003	7	7	6	4	4
	16	Policoro	IPCO	16.7024	40.1741	-	18	6	2	6
	17	Conserva	ICON	16.2637	40.0178	7	7	-	-	-
<i>Pollino</i>	18	Acqualisparti	IACQ	15.8797	39.9885	12	4	7	2	4
	19	Massadita	IMAS	15.8346	39.9453	11	6	5	3	3
	20	Lago Fondo	INDO	16.2836	39.9669	11	16	3	4	3
	21	Mormanno	IMOR	15.9430	39.8884	13	9	7	3	5
	22	S.Domenica Talao	ITAO	15.8731	39.8283	16	6	4	2	4
	23	Civita	ICIV	16.3004	39.8638	16	9	5	4	4
	24	Frascineto	IFRA	16.2579	39.8392	-	2	2	-	-
	25	Tarsia	ITAR	16.3093	39.6174	10	9	5	6	8
<i>Piana Crati</i>	26	San Demetrio	ISDE	16.3918	39.6070	10	9	5	3	5
	27	Crosia	ICRO	16.7670	39.5669	8	8	6	6	7
<i>Sila greca</i>	28	Umbriatico	IUBR	16.9185	39.3778	3	-	2	2	2
	29	Verzino	IVER	16.8669	39.3169	10	8	3	5	4
<i>Piana Crati</i>	30	Ficara	IFIC	16.1244	39.6616	12	7	4	3	5
<i>Catena Costiera</i>	31	Due Uomini	IDUE	16.0225	39.5521	18	8	4	3	3
	32	S.Benedetto Ullano	IULL	16.1064	39.4298	9	8	4	5	4
	33	San Lucido	ILUC	16.0859	39.2962	23	6	6	7	7
	34	Cerisano	ICER	16.1510	39.2623	16	9	5	3	4
	35	Fiumefreddo	IFIU	16.0612	39.2500	13	6	12	6	4
	36	Belmonte Calabro	IBMC	16.0668	39.1529	13	8	3	3	5
	37	S. Pietro Amantea	ITEA	16.1111	39.1321	10	6	4	5	6
	38	Nocera Tirinese	INOC	16.1503	39.0336	15	14	8	8	7
<i>Serre nord</i>	39	Polia	IPOL	16.3415	38.7449	13	12	9	3	6
	40	Angitola	IANG	16.2243	38.7414	15	11	7	5	4
<i>Capo Vaticano</i>	41	Zungri	IZUN	15.9890	38.6718	7	6	5	5	5
<i>Serre sud</i>	42	Serra San Bruno	ISSB	16.3078	38.5556	14	9	5	1	3
<i>Aspromonte</i>	43	S. Ilario Jonio	IJON	16.1836	38.2169	11	18	10	4	6
	44	Madonna Leandro	ILEA	15.7330	38.0174	14	12	5	7	5
Totale						414	358	213	166	177

Figura 2-1: Distribuzione geografica dei siti di campionamento numerati come in tabella 1. Le aree cerchiare in rosso rappresentano le zone dove sono stati effettuati i transetti.



2.2.1 Analisi elettroforetica di sistemi gene-enzima

Complessivamente sono stati studiati 13 enzimi codificati da 17 loci (Tabella 2-2) mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido. Il gel è stato preparato usando amido della Connaught Laboratories (*Starch-hydrolyzed*), disciolto in proporzione del 10% nella soluzione tampone specifica per ogni enzima (Tabella 2-3). La soluzione è stata quindi riscaldata fino all'ebollizione e poi degassata con una pompa a vuoto. Il gel è stato infine versato in piastre di vetro di 18 cm x 24 cm x 0,7 cm e lasciato raffreddare. Le analisi sono state effettuate su frammenti di tessuto conservati a -80°C . Questi sono stati omogenizzati

meccanicamente con pestelli in ceramica aggiungendo qualche goccia di acqua distillata e l'omogenato è stato assorbito su cartellini di carta *Whatman* n°3 di 5mm x 5mm. I cartellini sono stati poi inseriti sul lato lungo della piastra, in un taglio praticato nel gel per mezzo di un taglierino. Le piastre sono state portate in una camera termostata a circa +4°C e posti in delle vaschette di *plexiglas* provviste di elettrodi e contenenti i sistemi tampone specifici per la corsa dei vari enzimi (Tabella 2-3). Il contatto tra gel ed elettrodi è assicurato da apposite spugnette. Il gel è stato quindi sottoposto ad un campo elettrico che permette alle proteine di migrare, ciascuna nella direzione e ad una velocità che dipendono dalla carica netta a quel determinato pH, nonché dalle dimensioni e dalla forma della proteina stessa. Il voltaggio e la durata della migrazione nel campo elettrico dipendono dall'enzima in esame e dal sistema tampone usato, (*range*: 5-8V; 2-7 h). Al termine della migrazione i cartellini sono stati estratti dal gel e lo stesso è stato tagliato orizzontalmente con un filo di nylon ($\varnothing$ 0,2 mm) e ciascuna parte è stata colorata per visualizzare uno specifico enzima (per le colorazioni vedi Tabella 6). Tale soluzione è composta da un substrato su cui agisce l'enzima, un coenzima (NAD o NADP) ed un colorante che si lega al prodotto della reazione. Alcune soluzioni sono state usate direttamente allo stato liquido, altre invece rese solide con agar allo 0.8% in soluzione tampone tris HCl 0,05 M (pH 8), precedentemente portato ad ebollizione e poi lasciato raffreddare fino alla temperatura di circa 48°C. Dopo la colorazione, i gel sono stati messi ad incubare al buio, in una stufa a 37 °C per un tempo variabile tra i 15 minuti e le 2 ore, in funzione dell'enzima. Alla fine del processo descritto, sul gel sono apparse delle bande colorate e, a seconda del loro numero e posizione, è stata determinato il genotipo di ciascun individuo al locus che codifica per quel particolare enzima.

2.2.1.1 Nomenclatura e pattern elettroforetici

I vari isozimi (enzimi con la stessa funzione ma codificati da loci diversi) sono stati numerati in ordine crescente a partire da quello che è migrato per primo verso l'anodo, ad esempio *Pgm-1*, *Pgm-2* e così via. Gli allozimi (enzimi codificati da diversi alleli dello stesso locus) sono stati denominati in base alla loro mobilità, in una corsa standard rispetto all'allele più comune di quel locus nella popolazione di riferimento, al quale viene assegnato il numero 100. La mobilità degli alleli rispetto a quello più comune viene determinata dalla distanza in mm tra le varie bande che compaiono sul gel dopo la fase di colorazione precedentemente descritta.

Nell'interpretazione dei pattern è basilare la conoscenza della struttura dell'enzima, in particolare se esso è un monomero o un polimero. In entrambi i casi, gli omozigoti sono caratterizzati da un'unica banda in quanto entrambi gli alleli codificano per la stessa sequenza aminoacidica. Per gli eterozigoti, l'interpretazione è più complessa; di norma è possibile identificare il numero di subunità della struttura quaternaria dell'enzima, in base al numero di bande che compaiono negli individui eterozigoti, presupponendo che le sub unità dell'enzima completo, possano aggregarsi casualmente a formare isozimi omomeri ed eteromeri (Harris & Hopkinson, 1976). Nei monomeri gli eterozigoti si presentano con due bande (una per ciascun allozima); poiché entrambe le forme allozimiche sono attive, gli alleli di quel locus sono detti codominanti. Quando l'enzima è polimerico, l'eterozigote presenta una struttura composta da più bande; sono infatti presenti due bande omomeriche, rappresentanti le combinazioni delle subunità dello stesso allozima, e altre bande eteronome che corrispondono a molecole ibride formate dalla combinazione delle catene polipeptidiche dei due alleli (Allendorf & Utter, 1979). Per gli enzimi dimerici quindi l'eterozigote è costituito da tre bande (a_2 , ab , b_2), per i trimeri si hanno quattro bande (a_3 , a_2b , ab_2 , b_3), nel caso dei tetrameri sono presenti cinque bande (a_4 , a_3b , a_2b_2 , ab_3 , b_4) e così via. In generale se la proteina è costituita da n subunità, nell'eterozigote si avranno $n+1$ isozimi di cui 2 omomeri e $n-1$ eteronomi. L'intensità delle bande è diversificata in funzione del contributo di ciascun allozima all'attività enzimatica totale: i rapporti d'intensità seguono i coefficienti dello sviluppo di potenza ennesima di un binomio, per i dimeri si ha 1:2:1, per i trimeri 1:3:3:1, per i tetrameri 1:4:6:4:1, ecc..

Tabella 2-2: Enzimi analizzati, loci codificanti e sistema tampone utilizzato per ciascun enzima (sistemi tampone numerati come in Tabella 2-3)

Enzima	Codice internazionale	Locus codificante	Sistema tampone
α -Glicerofosfato deidrogenasi	1.1.1.8	α -Gpdh	5
Lattato deidrogenasi	1.1.1.27	Ldh-2	3
Malato deidrogenasi	1.1.1.37	Mdh-1	5
		Mdh-2	
Enzima malico	1.1.1.40	Mdhp-1	3
		Mdhp-2	
Isocitrato deidrogenasi	1.1.1.42	Idh-1	1
		Idh-2	
6-Fosfogluconato deidrogenasi	1.1.1.44	6-Pgdh	1
Nucleoside fosforilasi	2.4.2.1	Np	2
Glucosio-6-fosfato deidrogenasi	1.1.1.8	G6pdh	4
Peptidasi	3.4.11.23	Pep-b	1
Trioso-fosfato isomerasi	5.3.1.1	Tpi	4
Mannosio fosfato isomerasi	5.3.1.8	Mpi	2
Fosfoglucoisomerasi	5.3.1.9	Gpi	2
Fosfoglucomutasi	5.4.2.2	Pgm-1	1
		Pgm-2	

Tabella 2-3: Sistemi tampone utilizzati (le quantità sono per litro di soluzione)

TAMPONI	ELETTRODI	GEL
1. Tris/citrato continuo (Selander et al., 1971)	Tris 0,678 M, acido citrico 0,157 M, pH 8 (83,2 g di Tris, 30 g di ac.citrico monoidrato)	Tris 0,023M , ac. Citrico 0,005 M, pH 8 (2,77 g di Tris, 1,1 g di ac. citrico)
2.Tris/versene/ borato I (Brewer & Sing, 1970)	Tris 0,21 M, acido borico 0,15 M, EDTA 0,006 M, pH 8 (25,4 g di Tris, 9,27 g di ac. borico, 2,20 g di EDTA)	Tris 0,021 M, ac. Borico 0,02 M, EDTA 0,007 pH 8,6 (2,5 g di Tris, 1,24 g di ac. borico, 0,25 g di EDTA)
3. Tris/maleato (Brewer & Sing, 1970)	Tris 0,1 M, acido maleico 0,1 M, EDTA 0,01 M, MgCl ₂ 0,015M, NaOH 0,125 M, pH 7,2 (12,11 g di Tris, 11,61 g di ac. maleico, 3,72 g di EDTA, 3,05 g di MgCl ₂ , 5 g di NaOH)	Tampone elettrodi diluito 1:10, pH 7,2
4. Litio/borato discontinuo (Soltis et al., 1983)	LiOH 0,038 M, acido borico 0,188 M pH 8.1 (1,6 g di LiOH, 11,6 g di ac. borico)	Tris 0,045 M, ac citrico 0,007 M, LiOH 0,004 M, ac. Borico 0,019 M pH 8.3 (5,45 g di Tris, 1,28 g di ac. citrico in 900 ml, portare a volume con 100 ml di tampone elettrodi 9:1).
5. Fosfato/Citrato (Harris & Hopkinson, 1976)	Citrato di sodio tribasico 0,15 M, fosfato di sodio monobasico 0,24M pH 6,3 (44,11 g di citrato di sodio, 32,12 g NaH ₂ PO ₄)	Tampone elettrodi diluito 1:40, portare a pH 6,3 con acido citrico 1M).

Tabella 2-4: Tecniche di colorazione

Enzima	Tamponi di colorazione	coenzimi	enzimi	substrati	metodi di visualizzazione
α-Gpdh	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NAD 15 mg		α -glicerofosfato 300 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Ldh	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NAD 15 mg		acido L-lattico 50 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Mdh	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NAD 15 mg		acido L-malico 1M pH 7 5ml	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Mdhp	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg		acido L-malico 1M pH 7 5ml	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
G6pdh	0,05 M Tris/HCl pH 8 45 ml	NADP 15 mg		Glucosio-6-fosfato 380mg	NBT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
6-Pgdh	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg		gluconato-6-fosfato 20 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Np	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml		EC 1.2.3.2 XO 0,1 mg	inosina 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Tpi	0,2 M Tris/HCl pH 8 50 ml	NAD	EC 1.2.1.12 Gapdh	Deidrossiacetone fosfato 5mg EDTA 20mg	Acido arsinico 300mg PMS 2 mg agar 0,8%
Pep	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml		EC 1.11.1.7 PER 0,04 ml EC 1.2.3.1 AO 0,02 ml	L-leucil-leucil-leucina 20 mg orto-dianisidina 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Mpi	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg	EC 1.1.1.49 G6Pdh 0,02 mg EC 5.3.1.9 GPI 0,04 mg	mannosio-6-fosfato 25 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Gpi	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg	EC 1.1.1.49 G6Pdh 0,02 mg	fruttosio-6-fosfato 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%
Pgm	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg	EC 1.1.1.49 G6Pdh 0,02 mg	glucosio-1-fosfato 80 mg glocosio 1-6-difosfato 0,5 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%

2.2.2 Marcatori di sequenza

2.2.2.1 DNA mitocondriale

In questo studio sono stati amplificati e sequenziali due frammenti di mtDNA. Il primo frammento (da qui in poi denominato ND2) comprende la 3' porzione del gene tRNA-Met, l'intero gene codificante per la NADH deidrogenasi sub unità 2 e la 5' porzione del tRNA-Trp. Il secondo frammento (ND4) comprende il 3' gene per la NADH deidrogenasi, tutto il gene tRNA-His e parte del tRNA-Ser. I primers utilizzati e le specificità del programma di PCR sono fornite in Tabella 2-5.

Tabella 2-5: Primers, numero di cicli e temperature di *annealing* utilizzate per l'amplificazione dei diversi frammenti di DNA mitocondriale e nucleare. Per ogni regione sono riportate le grandezze dei frammenti puliti e utilizzati nelle analisi successive.

Regione		Primer	Sequenza primer	N. cicli	T. annealing (C°)	G. frammento (bp)
mtDNA	ND2	H5018 (Babik et al., 2005)	5'-TCTGGGTTGCATTCAGAAGA-3'	35	57,5	1137
		L3780 (Babik et al., 2005)	5'-TCGAACCTACCCTGAGGAGAT-3'			
	ND4	ND4 (Babik et al., 2005)	5'-CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC-3'	35	54	760
		Leu (Babik et al., 2005)	5'-CATTACTTTTACTTGGATTTCACCA-3'			
nuDNA	Fib	FIBX7 (Sequeira et al., 2006)	5'-GGAGANAACAGNACNATGACAATNCAC-3'	40	50	
		FIBX8 (Sequeira et al., 2006)	5'-ATCTNCCATTAGGNTTGGCTGCATGGC-3'			
		BFXF (Sequeira et al., 2006)	5'-CAGYACTTTYGAYAGAGACAAYGATGG-3'	40	56	
		BFXR (Sequeira et al., 2006)	5'-TTGTACCACCAKCCACCACCTCTTC-3'			
	Pdgrfr	PdgrfritR1	5'-GTAGATATTTTGGATATGTTTGCAG-3'	37	53	619
		PdgrfritF1	5'-TTCTTCCTGAGGTTAAAATAGTATC-3'			
	Gh	GHitalF1	5'-CAGTCGCAAGCTTAAGTACAATCAT-3'	37	56	525
		GHitalR4	5'-GTAGGTGAAAGGTTGTTAACGAAGA-3'			

2.2.2.2 DNA nucleare

Per quanto riguarda i marcatori nucleari di sequenza sono stati amplificati e sequenziati tre frammenti del DNA. Una porzione del settimo introne della subunità Beta del gene fibrinogeno (Fib), una del quarto introne dell'ormone della crescita (Gh), e una dell'undicesimo introne del fattore di crescita derivato dalle piastrine recettore alpha (Pdgrfr).

Per l'amplificazione del frammento del gene fibrinogeno si è utilizzata una PCR doppia (*nested* PCR) seguendo il protocollo fornito da Sequeira et al. (2006). Prima veniva amplificato un segmento lungo dal DNA genomico usando i primers FIBX7 e FIBX8, il prodotto di PCR ottenuto, con una diluizione 1:5 in acqua bi-distillata, era poi usato come *templato* in una successiva PCR, usando i primers BFXF e BFXR.

Nel caso dei loci *Pdgfr* e *Gh*, sono stati messi a punto dei primers specie-specifici. Inizialmente il DNA di alcuni individui è stato amplificato utilizzando protocollo e primers come descritto da Nadachowska e Babik (2009). Successivamente, dal momento che non si riusciva ad avere un prodotto di PCR sempre pulito, sono stati disegnati dei primers interni con il programma Primer3, (Rozen e Skaletsky, 2000).

I primers utilizzati, le specificità dei programmi di PCR e il numero di paia di basi sequenziate sono fornite in Tabella 2-5, mentre i dettagli delle procedure di laboratorio di seguito.

2.2.2.3 Estrazione del DNA.

L'estrazione del DNA totale è stata effettuata con il metodo C-TAB/fenol-cloroformio (Doyle & Doyle, 1987). Questo metodo prevede una prima fase di lisi dei tessuti e delle DNAasi attraverso l'incubazione a 55° C del tessuto (circa 200 mg) per circa 12 ore in 600 µl di tampone C-TAB [(C-TAB (bromuro esadeciltrimetilammonio) 2%; NaCl 1.4 M; Tris-HCl 0.1 M, pH 8; EDTA 0,02 M; 2-β-mercaptoetanolo 0,2%)] e 15 µl di Proteinasi-K alla concentrazione di 20 mg/ml. Nelle metodiche di indagine non ha interferito l'eventuale presenza di RNA; non è stato, pertanto, necessario sottoporre la soluzione ottenuta a trattamento con RNAasi. Per separare i prodotti di digestione dal DNA vengono aggiunti 600 µl di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) e la soluzione viene agitata per circa 5 minuti e poi centrifugata per 10 minuti a 13.000 giri/min provocando la precipitazione delle proteine e la separazione delle due fasi. La fase più pesante contenente i prodotti proteici della digestione viene a trovarsi nella parte inferiore della provetta rispetto alla fase acquosa che, essendo più leggera, si trova nella parte superiore (supernatante) e, di conseguenza, è facilmente prelevabile e viene quindi messa in tubi puliti. Questo passaggio viene ripetuto altre due volte, prima con fenolo: cloroformio: alcol isoamilico (25:24:1), e poi con il cloroformio:alcol isoamilico (24:1), in questo modo le fasi si possono separare più accuratamente. Gli acidi nucleici contenuti nella fase acquosa vengono fatti precipitare a -20

°C con 1000 µl di etanolo assoluto in presenza di NaCl (20µl, 5 mM). Un'ulteriore centrifugazione (15¢ a 13000 giri/minuto) permette di far concentrare DNA ed RNA in fondo ai tubi a formare il pellet in modo da poter eliminare l'etanolo. A questo punto, un successivo *step* è costituito da un lavaggio mediante etanolo al 70% (500 µl) il quale permette di allontanare i sali residui. Si elimina quindi l'etanolo al 70%, il pellet viene asciugato all'aria per almeno 4 ore e successivamente risospeso in 50 µl di TE (tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8). La soluzione di DNA così ottenuta viene conservata a -20 °C fino al successivo utilizzo.

2.2.2.4 Amplificazione mediante reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)

La soluzione ottenuta attraverso il protocollo sopra descritto risulta molto eterogenea contenendo molecole sia di DNA che di RNA, di lunghezza e provenienza diverse (DNA nucleare e mitocondriale, RNA di varia natura), in un numero di copie variabile di alcuni ordini di grandezza (da alcune centinaia nel caso dei geni nucleari a molte migliaia per geni mitocondriali e RNA). Tale soluzione di acidi nucleici viene successivamente sottoposta alla tecnica di PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Saiki et al., 1988). In questo caso la reazione a catena della DNA polimerasi ha un ruolo estremamente importante in quanto permette: i) l'amplificazione selettiva di porzioni specifiche di DNA mediante l'utilizzo di opportuni oligonucleotidi d'innescio (*primers*). ii) la produzione di un elevatissimo numero di copie del prodotto desiderato. La disponibilità di un alto numero di copie di un frammento rende possibile sia la sua visualizzazione mediante tecniche non specifiche (come il bromuro di etidio o il *silver staining*), sia il sequenziamento di tale frammento.

Per quanto riguarda l'amplificazione dei diversi frammenti di DNA la miscela di reazione per ogni regione conteneva: circa 10 ng di DNA; 2,5 u/µl di Taq DNA polymerase (Promega) con il tampone di reazione fornito dal produttore; MgCl₂ 1 mM; dNTP 0.2 mM; ciascun primer 0.2 µM. La soluzione (50 µl) è stata quindi sottoposta a PCR, utilizzando un "thermal cycler" GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Per ogni regione è stato utilizzato un programma specifico messo a punto nella fase iniziale del lavoro, in modo da ottenere prodotti di PCR il cui sequenziamento possa fornire delle letture di facile interpretazione e con interferenze minime. Il programma utilizzato per i diversi frammenti era costituito da una fase iniziale di denaturazione a 94° C per 5' seguita da un numero di cicli di amplificazione (specificato in Tabella 2-5) ciascuno comprendente: 45'' a 94° C per la denaturazione, 1' alla Temperatura di *annealing* adatta per l'appaiamento delle diverse coppie di primers alla sequenza di DNA da analizzare (vedi Tabella 2-5) e 1' e 30'' a 72° C per l'estensione del

frammento; all'ultimo ciclo si faceva seguire da una fase di estensione finale dei filamenti per 10' a 72° C.

2.2.2.5 Sequenziamento.

I prodotti di PCR degli individui saggiati sono stati successivamente spediti alla ditta Macrogen Inc. in Korea dove sono stati purificati e quindi sequenziati. Il principio del sequenziamento automatico è una modificazione del sequenziamento descritto da Sanger *et al.* (1977), basato sulla terminazione controllata della replicazione enzimatica in vitro del DNA. La reazione risulta essere analoga alla PCR sopra descritta, ma con l'utilizzazione di un solo primer; viene sintetizzato un solo filamento usando l'altro come stampo (templato); di conseguenza non si verifica un aumento esponenziale del prodotto, caratteristico della PCR. Sono stati utilizzati gli stessi primers della reazione di PCR. Per ogni campione entrambi i filamenti vengono sequenziati in modo da effettuare un accurato controllo della lettura della sequenza mediante la procedura dell'allineamento e del controllo reciproco da cromatogramma. In caso di ambiguità il campione è stato nuovamente sequenziato. Le sequenze sono state controllate direttamente dal cromatogramma per entrambi i filamenti mediante l'ausilio del programma CHROMAS 2.01 (McCarthy-Technelysium Pty. Ltd., 1998-2005) e successivamente sono state allineate con il programma Clustal X versione 1.81 (Thompson *et al.*, 1994;1997).

2.3 ELABORAZIONI STATISTICHE

2.3.1 Dati allozimici

2.3.1.1 Diversità genetica

Il programma BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1999) è stato utilizzato per calcolare le frequenze alleliche, le stime di variabilità genetica (eterozigosi osservata e attesa, numero medio di alleli per locus e proporzione di loci polimorfici calcolato con il criterio del 95%), nonché per stimare la divergenza genetica tra i campioni studiati, calcolando i valori distanza genetica standard di Nei (1978) tra coppie di popolazioni. Scostamenti significativi dall'atteso equilibrio di Hardy-Weinberg sono stati valutati mediante test esatti implementati con il programma GENEPOP-online (Rousset, 2008). Lo stesso programma è stato anche usato per computare test esatti di Fisher al fine di valutare deviazioni dall'atteso equilibrio da *Linkage* per ogni paio di loci e in tutti i siti di campionamento. Ciascuna analisi è stata ripetuta

applicando la correzione sequenziale di Bonferroni (Rice, 1989), al fine di ridurre l'incremento della probabilità di rigettare un'ipotesi nulla nel caso in cui essa fosse in realtà vera (errore α o di I tipo), incremento associato all'applicazione di test multipli. Infine per valutare il grado di divergenza genetica tra le popolazioni si è scelto di usare anche l'indice di distanza (Da) di Cavalli-Sforza (1969) con le modifiche apportate da Nei et al. (1983). Quest'indice è stato scelto in quanto risulta particolarmente indicato nell'analisi di dataset che includano anche campioni di ridotte dimensioni e alleli con basse frequenze, inoltre ci ha fornito accuratezza ed efficienza maggiore nella costruzione del fenogramma (vedi di seguito).

2.3.1.2 Struttura delle popolazioni

A partire dalla matrice di distanza genetica tra coppie di popolazioni Da è stata effettuata una analisi gerarchica dei cluster utilizzando l'algoritmo UPGMA (Sneath & Sokal, 1973). La significatività dei singoli nodi del fenogramma così ottenuto è stata poi testata attraverso una procedura di *bootstrap* condotta sui loci, ed effettuata a partire da 1000 pseudorepliche del data set originario.

La struttura delle popolazioni è stata ulteriormente indagata attraverso un'analisi *Bayesiana* dei cluster utilizzando il metodo di Pritchard *et al.* (2000), sviluppato nel software Structure 2.3.3. Questo metodo, attraverso l'analisi del genotipo multi locus, consente di individuare gruppi di popolazioni geneticamente omogenei e tra loro differenziati, definendo la migliore opzione di raggruppamento (k) come quella che minimizza le deviazioni dagli equilibri di *HW* e di *linkage*. L'algoritmo utilizzato nel programma permette inoltre di stimare il grado d'ibridazione (*admixture*) tra i diversi gruppi, fornendo per ogni popolamento campionato le medie (Q) delle probabilità di appartenere ad ognuno dei k gruppi. Rispetto ad altri metodi che applicano i medesimi criteri (v.d. ad es. Corander e Mattinen, 2006), quello utilizzato consente di non tener in conto, durante l'analisi, la dipendenza spaziale della struttura genetica, ed è senza dubbio il metodo più usato sia a fini medici (p.e. Pritchard & Donnelly 2001; Satten *et al.* 2001) sia nella analisi di ibridazione introgressiva (p.e. Beaumont *et al.* 2001; Goossens *et al.* 2002; Randi & Lucchini 2002) e sia negli studi di migrazione e flusso genico (p.e. Arnaud *et al.* 2003; Cegelski *et al.* 2003; Berry *et al.* 2004). Sono state effettuate complessivamente 75 corse indipendenti, 5 per ogni valore di k, con il numero dei gruppi (k) compreso tra 1 e 15, in modo da verificare la consistenza dei risultati. Sono state effettuate corse per un numero di gruppi (k) compreso tra 1 e 15, replicando 5 corse per ogni valore di

k, al fine di verificare la consistenza dei risultati tra ogni corsa. È stato scelto il modello di *admixture* con il settaggio dei parametri del programma impostato sui valori di default, come suggerito dal manuale di istruzione (Pritchard e Wen, 2003). In ogni corsa sono state impostate 500.000 repliche delle catene di Markov, di cui 100.000 repliche scartate come *burn-in*. Il programma fornisce nell'output la stima logaritmica della probabilità dei dati $\Pr(X/K)$ di appartenere ad ogni k (equazione 12 in Pritchard *et al.* 2000), permettendo così successivamente di stimare il numero più verosimile di gruppi. Questa stima è stata effettuata seguendo le raccomandazioni fornite dagli autori del programma (vedi anche Waples e Gaggiotti, 2006), ovvero analizzando la curva costruita con le medie dei differenti logaritmi $\Pr$ per ogni valore di k. Successivamente al valore di K prescelto il programma è stato fatto correre altre 10 volte e sono state calcolate le proporzioni medie dei membri di ogni popolamento campionato (Q) di appartenere ad ognuno dei gruppi inferiti. I risultati medi delle 15 corse sono stati riassunti con l'utilizzo dell'algoritmo implementato dal programma CLUMMP. Per rappresentare in mappe le variazioni geografiche dei valori di Q è stata usata una procedura di interpolazione geografica polinomiale *Spline*, implementata con il software ARCGIS 9.1 (ESRI 2005). Si sono utilizzati i settaggi: *Spline type = tension; weight = 0,4 ; number of points = 12*. Abbiamo preferito questo metodo tra i tanti disponibili in quanto nelle località di campionamento impone alle superfici di interpolazione di passare con il valore fornito dai dati. Pertanto mentre in tutti gli altri punti geografici la rappresentazione deve considerarsi un'ipotesi basata sui dati e frutto dell'interpolazione, nelle località di campionamento i valori sono esatti (pari quindi alla media dei valori di Q forniti dalle analisi precedenti) e possono essere letti alla stregua delle rappresentazioni geografiche convenzionali di dati (p.e. diagrammi di frequenze a torta).

Per valutare la presenza di due gruppi principali, eventualmente in accordo con le due linee materne divergenti (Canestrelli *et al.*, 2011), e per localizzare la possibile zona di contatto tra di essi, abbiamo calcolato le medie dei risultati delle cinque corse per $k=2$ e queste sono state messe in relazione con i risultati del fenogramma UPGMA.

2.3.1.3 Analisi gerarchica della varianza

Sulla base dei gruppi di popolazioni individuate dall'analisi non gerarchica dei cluster è stata condotta un'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992). Tale analisi ci permette di valutare statisticamente come la varianza totale risulti ripartita nei componenti di covarianza a causa di differenze “fra gruppi di popolazioni”, “fra popolazioni

all'interno dei gruppi" e "fra individui all'interno delle popolazioni". La significatività dei componenti di covarianza associati con i possibili livelli di struttura genetica (all'interno delle popolazioni, tra popolazioni all'interno di gruppi e tra gruppi) è stata testata usando una procedura di 10.000 permutazioni non parametriche attraverso il software ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

2.3.1.4 Analisi di flusso genico nella zona di contatto

Per valutare l'ipotesi di flusso genico attuale tra i due principali gruppi emersi dalle analisi sulla struttura delle popolazioni (UPGMA e structure per $K=2$) è stato usato il modello basato su metodi statistici *Bayesiani* per identificare le specie ibride applicato nel software NewHybrid 1.1 (Anderson and Thompson 2002). Questo metodo stima la probabilità posteriore che il genotipo multi locus di ogni individuo sia attribuibile ad una delle classi riconosciute parentali oppure ad una ibrida (F1, F2, reincrocio Bk).

2.3.1.4.1 Definizione dei transetti

Per rendere minima l'interferenza dovuta alla presenza di più di due gruppi genotipici nel data-set si è deciso di realizzare questa analisi usando sub set di dati con il criterio che 1) le popolazioni siano in continuità geografica, 2) le popolazioni appartengano a soli due *cluster* differenti emersi dall'analisi *Bayesiana* (con valori di Q la cui somma è maggiore di 0,70). Secondo questo criterio sono stati scelti due transetti, uno lungo la Catena Costiera fino le Serre (tra la popolazione 31 e la 42) e l'altro nella Piana del Crati fino alla Sila-greca (tra la popolazione 25 e la 31) (vedi Figura 2-1). Per ogni data-set ottenuto il programma è stato fatto correre sia senza alcuna informazione a priori sullo stato ibrido o parentale di alcun individuo e sia, imponendo come parentali 20 individui per ogni forma genotipica. Questi sono stati scelti tra le popolazioni più distanti geograficamente dalla possibile area di contatto e tali da avere il minimo grado di *intermixing* come risultato dall'analisi *Bayesiana* dei *cluster*. Per ogni corsa sono state valutate le probabilità posteriori dopo 100.000 iterazioni delle catene di Markov Monte Carlo.

2.3.1.4.2 Simulazioni

Il problema intrinseco con tutte le analisi *bayesiane* è che la validità della distribuzione presunta non può essere confermata statisticamente (Gelman et al. 1995). Di conseguenza, un approccio di simulazione deve essere attuato per ogni set di dati per una valutazione caso per

caso del potere statistico di individuare correttamente l'origine degli individui, parentali o ibridi (confr. Vaha e Primmer, 2006, Randi, 2008, Sanz e al 2009). Pertanto è stata valutata mediante simulazioni la potenza dell'analisi precedente di rilevare ibridi, dato il numero di marcatori e il livello di differenziazione genetica tra le popolazioni di parentali. Gli stessi gruppi di 20 individui parentali, selezionati per l'analisi precedente, sono stati usati per generare 30 genotipi di ognuna delle classi parentali e ibride (F1, F2 e Bk), con il programma Hybridlab 1.1 (Nielsen et al. 2001, 2006). Il programma stima le frequenze alleliche per ogni locus e in ognuna classe parentale; successivamente genera genotipi multi locus di ibridi F1, scegliendo in maniera *random* un allele ad ogni locus in funzione delle distribuzioni di frequenze alleliche per ognuna delle due classi specificate. I genotipi simulati sono stati inseriti in un nuovo set di dati, e l'analisi di ibridazione è stata ripetuta con il programma NewHybrid 1.1, con lo stesso settaggio dell'analisi precedente e senza fornire alcuna informazione aprioristica. I risultati sono stati usati per calcolare la proporzione di individui ibridi e parentali del data set simulato e correttamente identificati dal programma.

2.3.2 Dati Mitochondriali

Per lo studio dei dati mitocondriali si è scelto di ripetere le stesse analisi descritte in Canestrelli et al. (2011) con il nuovo set di dati, in modo da rendere i risultati comparabili e perché ritenute idonee per i nostri fini.

Sul dataset ottenuto concatenando per ogni campione le sequenze dei due frammenti del mtDNA amplificato, è stato effettuato il test dell'*omogeneità della partizione* (Farris et al., 1995), tale test permette di verificare l'esistenza di una significativa eterogeneità nel segnale filogenetico nei due frammenti utilizzati. Poiché l'ipotesi nulla di omogeneità del segnale filogenetico non è stata respinta dal test ($P > 0,05$), tutte le analisi sono state condotte utilizzando i due frammenti combinati.

Il numero di siti polimorfici, la loro posizione, il numero delle mutazioni e il numero complessivo di aplotipi sono stati accertati con il programma DnaSP.

2.3.2.1 Analisi filogenetiche

Le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi individuati sono state indagate attraverso la costruzione di un albero filogenetico utilizzando il metodo di Maximum Likelihood (ML). Si è scelto di usare solo questo metodo per la costruzione dell'albero in quanto i risultati riportati

in Canestrelli et al. (2011) dimostravano come i risultati ottenuti con altri metodi portavano a topologie pressoché identiche. L'albero filogenetico è stato costruito attraverso il software PHYML-ONLINE (Guindon e Gascuel, 2003). Il modello di evoluzione delle sequenze è stato scelto con il test basato sul *Criterio d'Informazione Bayesiano* attraverso il programma jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). Questo test ha indicato il modello TrN+ Γ , con gamma pari a 0,142 (Tamura & Nei, 1993), come il più adatto tra gli 88 modelli alternativi per il nostro set di dati. Come outgroups sono state utilizzate una sequenza ottenuta da un individuo di *L. vulgaris* e una da un individuo di *Mesotriton alpestris*. Il supporto statistico associabile alla topologia dell'albero è stato ottenuto mediante la procedura del *bootstrap* non-parametrico, su 1000 pseudorepliche. Infine le relazioni di affinità tra gli aplotipi state indagate anche attraverso la costruzione di un *network* di parsimonia statistica, con metodo di Templeton *et al.* (1992) implementato nel software TCS 1.21. Il software TCS determina la probabilità di una connessione parsimoniosa tra ciascuna coppia di aplotipi e trattiene gli aplotipi nel *network* solo se essi possono essere connessi con un livello di confidenza superiore al 95%. Data la presenza nelle sequenze di alcuni gap multipli, queste sono state trattate come dati mancanti (*missing data*, TCS), ovvero come un unico evento di mutazione.

2.3.2.2 Struttura e differenziamento genetico delle popolazioni

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) è stata effettuata anche sul dataset mitocondriale del *L. italicus*, con il programma ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), impostando il modello TrN+ Γ (con gamma 0,142). Si è utilizzato come raggruppamento delle popolazioni la distribuzione dei 10 cladi terminali individuati dall'analisi filogenetica. Con lo stesso programma è stata stimata la diversità genetica dei maggiori gruppi di aplotipi attraverso i parametri di diversità nucleotidica (π ; Nei 1987) e di diversità aplotipica (h ; Nei 1987). La variazione nucleotidica e la divergenza media netta tra i gruppi maggiori di aplotipi (Nei, 1987) è stata calcolata utilizzando il software Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007).

2.3.2.3 Il tempo di coalescenza

Per stimare il tempo per l'antenato comune più recente (*The time to the most recent common ancestor*, TMRCA) dei due principali cladi individuati dall'analisi filogenetica, abbiamo usato il programma BEAST 1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2006, 2007). Il modello di evoluzione delle sequenze utilizzato è stato TrN+ Γ . L'analisi è stata condotta scegliendo il

modello dell'orologio molecolare rilassato (*Relaxed clock*), e assumendo una distribuzione log-normale non correlata. Questo modello assume che il tasso di sostituzione possa variare nei diversi rami dell'albero filogenetico e che il tasso di sostituzione di un ramo non sia correlato con quello del ramo da cui discende. Recenti studi hanno rilevato come questo modello sia risultato il più accurato e preciso nello stimare le relazioni filogenetiche e nella ricostruzione dei tempi di divergenza, e come tale modello risulti accurato anche quando il tasso di sostituzione è uniforme tra i rami, come previsto nel classico modello dell'orologio molecolare stretto (Drummond *et al.*, 2006). Il *Bayesian Skyline* è stato utilizzato come modello di coalescenza poiché tra quelli esistenti è considerato uno dei più flessibili e richiede solo poche assunzioni sui dati (Drummond *et al.*, 2007). Sono state effettuate cinque corse, ognuna delle quali era costituita da 30 milioni di step (Markov chain Monte Carlo; MCMC), campionati ogni 1000 step, di cui era stato scartato il primo 10% come burn-in. Queste impostazioni hanno dato alti valori per l'effettiva taglia dei campioni (ESS) per tutti i parametri. La convergenza e la stazionarietà sono state verificate con Tracer1.4. (Rambaut e Drummond, 2007). Data l'assenza di punti di calibrazione interni e di un valore affidabile per il tasso di sostituzione, per datare la radice dell'albero filogenetico si è utilizzato il tempo stimato da Zhang *et al.* (2008) per la divergenza tra *Mesotriton alpestris* e *L. vulgaris*. Questo valore è stato scelto poiché ricavato con un dataset costituito da genomi interi e utilizzando più punti di calibrazione, e poiché meglio concorda con inferenze indipendenti di tipo biogeografico (Zhang *et al.*, 2008). Pertanto la radice dell'albero è stata calibrata a 20,6 milioni di anni. Per tale valore è stata assunta una distribuzione normale con una deviazione standard settata in modo da riflettere l'incertezza della stima data dagli autori. Il 95% del range centrale della distribuzione di questo “*prior*” è risultata pari a 17.1-24.3 milioni di anni.

2.3.3 Sequenze nucleari

Numerose sequenze di tutti e tre i loci nucleari studiati, hanno mostrato più di una posizione in eterozigosi, determinando ambiguità nello stabilire la fase gametica, ovvero quali alleli sono presenti in eterozigosi. Pertanto, prima di qualsiasi analisi successiva abbiamo ricostruito la fase di tutte le sequenze con l'algoritmo *Bayesiano* utilizzato nel software PHASE (Stephens *et al.*, 2001). Questo programma usa delle catene di Markov Monte Carlo per stimare la probabilità posteriore di una potenziale coppia di aplotipi per ogni genotipo ambiguo osservato. Il software però non è in grado di trattare sequenze in eterozigosi per inserzioni- delezioni (indels). Pertanto generalmente queste vengono risolte con metodi di

clonazione, oppure se considerate poco influenti ne viene rimosso il polimorfismo. Nel nostro set di dati abbiamo riscontrato diversi polimorfismi da inserzione-delezione (indel) per una sola base azotata, anche in eterozigosi. Abbiamo deciso di trattare ognuno di questi come un altro singolo evento di mutazione, mantenendo la base nelle inserzioni ed inserendone una *ad hoc* nelle delezioni. In questa maniera abbiamo potuto nominare l'eterozigote per l'indels con un codice IUPAC appropriato, che è riconosciuto dal programma Phase. E' stato così possibile ricostruire gli aplotipi di questi individui alla stregua e insieme a tutte le altre sequenze. La fase delle sequenze con eterozigosi doppie per gli indels sono state risolte con il metodo descritto da FLOT et al. (2006). Le delezioni che coinvolgevano più posizioni non sono mai state trovate in eterozigosi. Abbiamo deciso di utilizzare questo approccio piuttosto che rimuovere l'indel perché questo avrebbe ridotto il numero di siti polimorfici, diminuendo le informazioni contenute nei dati.

2.3.3.1 Analisi di ricombinazione

La possibilità di ricombinazione nei geni nucleari studiati è stata valutata effettuando due statistiche: 1) *R_m* di Hudson e Kaplan (1985), con il programma DnaSP (Librado e Rozas, 2009), che calcola il numero minimo di eventi di ricombinazione, 2) Φ_w di Bruen et al. (2006), con il programma Splitstree v.4.11 (Huson & Bryant, 2006), che usa l'indice di omoplasia a coppie. Quest'ultima, come mostrato da studi di simulazione, è risultata meno sensibile ai tassi di mutazione rispetto alla prima che sembra essere incline ad inferire erroneamente ricombinazione quando i livelli di ricorrenza di alcune mutazioni sono alti (Bruen et al. 2006). Il programma Splitstree fornisce i valori di *p* per l'accettazione dell'ipotesi nulla di non ricombinazione.

2.3.3.2 Analisi filogenetiche

Al fine di illustrare le relazioni tra gli aplotipi abbiamo costruito network filogenetici con il software TCS 1.2.1 (Clement et al., 2000), che usa l'algoritmo statistico di parsimonia descritto in Templeton et al. (1992). Abbiamo preferito questo metodo di rappresentazione delle genealogie rispetto agli alberi filogenetici perché i livelli di polimorfismo osservati ai loci nucleari sono risultati molto meno pronunciati rispetto a quelli osservati nelle sequenze del DNA mitocondriale. In queste situazioni, infatti, quando i geni ancestrali e quelli derivati è probabile che siano copresenti nel dataset, i *network* di aplotipi costituiscono una via più appropriata per descrivere le relazioni di affinità genealogiche (Posada & Crandall, 2001). Le

ambiguità nel *network* sono state risolte seguendo le raccomandazioni in Pfenninger and Posada (2002). In particolare abbiamo usato tre criteri per decidere tra soluzioni alternative dei loops: 1) un criterio di frequenza, gli aplotipi è più facile che siano connessi ad aplotipi con alte frequenze piuttosto che rari; 2) un criterio topologico: gli aplotipi è più probabile che siano connessi ad aplotipi interni piuttosto che terminali; 3) un criterio geografico: è più prevedibile che aplotipi siano connessi ad altri appartenenti alla stessa o popolazioni vicine piuttosto che a popolazioni distanti.

2.3.4 Paesaggi genetici

Per visualizzare e analizzare il pattern geografico della variabilità, divergenza e introgressione genetica di *L. italicus* si sono effettuate tre interpolazioni geografiche utilizzando tre indici genetici calcolati in base alle analisi precedenti. Come indice di diversità genetica si è scelto di utilizzare la stima dell'eterozigosi attesa (H_e) di ogni popolazione calcolata ai loci allozimici. Per l'indice di introgressione si è utilizzato il valore di *admixture* Q fornito dall'analisi sulla strutturazione genetica implementata con il software Structure. Per ogni popolazione si è scelto il valore più alto (Q_m) tra le medie di Q , e si è calcolato il valore $Q_a = 1 - Q_m$ per fare in modo che l'indice da interpolare (Q_a) sia crescente al crescere del grado di introgressione. Il pattern geografico di differenziazione genetica è stato investigato sulle sequenze di DNA mitocondriale, usando una versione modificata del metodo proposto da Miller (2005) del *Genetic Landscape Shape* (GLS) e attualmente in uso con il software AIS (Miller, 2005). L'analisi è stata modificata con lo scopo di tenere in conto il modello di evoluzione più adatto alle nostre sequenze (scelto nel paragrafo 2.3.4) e per ottenere una rappresentazione geografica bidimensionale di GLS che è confrontabile con quelle ottenute dai due indici precedentemente presentati, oltre ad essere anche di più facile interpretazione rispetto alla versione originale in tre dimensioni fornita dal programma AIS. Per prima cosa con il software QuantumGis (Quantum GIS Development Team, 2011. *Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project*. <http://qgis.osgeo.org>) è stato costruito un network geografico che connette i popolamenti campionati con una procedura di triangolazione di Delauny (Brouns et al. 2003). Secondo, con il programma MEGA 4 (Tamura et al., 2007) abbiamo calcolato una matrice di distanza netta genetica tra popolazioni (D_t , Tamura e Nei, 1993) utilizzando il modello di evoluzione delle sequenze TrN+ Γ , con gamma pari a 0,142. Terzo, abbiamo importato i valori ottenuti di

divergenza in QuantumGis, geo-referenziandoli ai punti medi dei lati delle triangolazioni di Delanuy che connettono le corrispondenti coppie di popolazioni.

Per tutti e tre gli indici sopradescritti è stata realizzata una interpolazione geografica con il software QuantumGis utilizzando il metodo della Distanza Inversa Ponderata (IDW, coefficiente di distanza p pari a 4; Watson e Philips, 1985) e mascherando l'analisi per la penisola italiana, l'areale di distribuzione della specie. L'interpolazione oltre a produrre le mappe che rappresentano la distribuzione geografica dei tre indici, fornisce tre file tipo ASCII (file di testo di indicizzazione dei dati geografici ottenuti dalle interpolazioni) che possono essere confrontati statisticamente. Pertanto si è calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson tra le interpolazioni di He e Qa, utilizzando il software ENMtools (Warren et al., 2010), allo scopo di inferire quanto le aree di *Hotspot* di diversità genetica corrispondano effettivamente a quelle di ibridazione introgressiva.

2.3.5 Modellizzazioni della distribuzione della specie

La modellazione della nicchia ecologica (ENM) fornisce la possibilità di stimare la nicchia di una specie in base alle località conosciute dove la specie è presente e a parametri ambientali caratterizzati negli insiemi di dati GIS. Questa stima viene poi utilizzata per prevedere la distribuzione geografica potenziale della specie anche in quelle aree dove non si hanno segnalazioni disponibili oppure dopo aver fatto variare le caratteristiche ambientali.

In questo studio abbiamo ricostruito la nicchia di idoneità bioclimatica del tritone italico usando le condizioni climatiche attuali e quelle dell'ultimo massimo glaciale (LGM) al fine di verificare se la distribuzione ha subito cambi evidenti (contrazioni, espansioni e/o spostamenti) durante questi due estremi del Quaternario, e di testare quindi la presenza di presunte barriere climatiche durante la storia evolutiva della specie. A questo proposito abbiamo usato l'approccio di *Maximum Entropy* fornito dal programma Maxent 3.0 (Phillips et al. 2006) che utilizza solo dati di presenza insieme a informazioni ambientali per fornire probabilità logistiche continue e georeferenziate su quanto un habitat è adatto per la specie in oggetto. Un totale di 79 località di presenza della specie sono state usate per costruire il modello. Queste includevano i 44 siti di campionamento più 35 località dove si sono personalmente osservati siti di riproduzione oppure esistono segnalazioni in letteratura localizzabili con precisione (Scillitani et al, 2004). Sono stati usati i parametri di default del programma, impostando la soglia di convergenza (*Convergence Threshold*, 10^{-5}) e il numero

di iterazioni (500). Per verificare la consistenza del modello di predizione, il 75% delle località sono state usate per la formazione del modello e il restante 25% per testarlo. I dati ambientali attuali (ad una risoluzione di 30 arc-sec) e quelli di LGM con la predizione MIROC (*Model for Interdisciplinary Research on Climate*; risoluzione di 2,5 arc-min; Hasumi & Emori, 2004) sono stati scaricati dal database online WorlClim (www.worldclim.org). Il database fornisce 19 variabili bioclimatiche (vedi Tabella 2-6) che sono state usate per costruire un primo modello e per proiettarlo alle condizioni dell'ultimo glaciale. Successivamente per assicurarci di non aver costruito un modello con troppi parametri si è deciso di costruirne altri quattro con un sub set di variabili. Sono state eliminate sia le variabili la cui stima del contributo all'analisi era inferiore a 0.5% e sia le variabili con valori di correlazione alti e significativi, mantenendo, tra queste, quelle che a nostro avviso possono essere considerate biologicamente importanti per la specie. La correlazione esistente tra coppie di variabili è stata calcolata con il programma ENMtools (Warren et al., 2010). Si è finito per costruire un modello a quattro, cinque, nove e dodici variabili. Le performance dei cinque modelli sono state comparate usando il software ENMtools (*model selection*), il quale fornisce quattro stime per la qualità e trasferibilità di ogni modello. Si è utilizzato il valore di AIC-c (akaike information criterion corretto, Akaike 1974, Warren et al., 2010) considerato il più adatto e con le migliori performance nella selezione di modelli (Warren e Seifert, 2011).

Tabella 2-6: Varibili bioclimatiche utilizzate per la costruzione del modello di idoneità bioclimatica per *L.italicus*.

Variabili bioclimatiche			
BIO1	Temperatura media annuale	BIO11	Temp. media del quarto più freddo
BIO2	range medio diurno di temperatura	BIO12	Precipitazioni annuali
BIO3	Isotermalità (BIO1/BIO7) * 100	BIO13	Precipitazioni del periodo più piovoso
BIO4	Temperatura stagionale (coefficiente di variazione)	BIO14	Precipitazioni del periodo più secco
BIO5	Temp. massima del periodo più caldo	BIO15	Precipitazioni stagionali (coefficiente di variazione)
BIO6	Temp. minima del periodo più freddo	BIO16	Precipitazioni del quarto più piovoso
BIO7	Range annuale di temperatura	BIO17	Precipitazioni del quarto più secco
BIO8	Temp. media del quarto più piovoso	BIO18	Precipitazioni del quarto più caldo
BIO9	Temp. media del quarto più secco	BIO19	Precipitazioni del quarto più freddo
BIO10	Temp. media del quarto più caldo		

3 RISULTATI

3.1 DATI ALLOZIMICI

3.1.1 Diversità genetica

Dei 17 loci analizzati, 4 sono risultati monomorfi per lo stesso allele in tutte le popolazioni studiate (*G6pdh*, *Ada*, *Idh-2* ed *Tpi2*). Gli altri 13 loci hanno mostrato diversi gradi di polimorfismo, con un numero massimo di alleli per un singolo locus pari a 9 (*Mdh-1*). Le frequenze alleliche per i loci polimorfici vengono riportate in Tabella 3-1.

Nei loci polimorfici studiati la distribuzione delle frequenze alleliche presenta una correlazione più o meno importante con la geografia, anche se con pattern diversi ed in un caso (*Pgm-1*) a nostro avviso incomprensibili. Il polimorfismo ai loci *Mdh-2* e *Idh-1* è risultato legato alla presenza di alleli rari presenti a frequenze molto basse. Nel caso dell'*idh-1* un allele è presente nelle popolazioni del Pollino fino al nord della Catena Costiera; per l'*Mdh-2* un allele raro è presente in due popolamenti del Pollino e un altro si ritrova tra la porzione più meridionale della Catena Costiera e il sud delle Serre. Anche per i loci *Mpi*, *Np* e *Idh-2* il polimorfismo è legato ad alleli presenti in popolamenti di aree geografiche delimitate, caratterizzati però da frequenze più alte, senza mai essere esclusivi. Nel locus *Mpi*, oltre all'allele comune a tutte le popolazioni, esiste un allele caratteristico della Sila-greca ed uno delle popolazioni più meridionali, tra la porzione sud della Catena Costiera e le pendici dell'Aspromonte, con frequenze massime (0.64) a Serra San Bruno. Nel caso del locus *Np* un allele privato è presente ad alte frequenze nelle due popolazioni campionate del massiccio dell'Aspromonte, mentre un altro, a basse frequenze, è caratteristico del Gargano. Per il locus *Idh-2* oltre all'allele più comune ne esiste uno presente con frequenze molto basse in alcuni popolamenti della porzione centrale della Catena Costiera, mentre con frequenze più alte (intorno allo 0.50) in quelli della porzione più a sud e nelle Serre. Per quanto riguarda il locus *Mdh-1*, sebbene sia quello con un maggior numero di polimorfismi, in termini di varianti alleliche (n=9 alleli), esso non presenta alleli esclusivi con valore diagnostico, se non per la popolazione relitta del nord delle Marche (IQUI), dove però il campionamento è di soli 2 individui. In linee generali oltre l'allele *Mdh-1*¹⁰⁰, il più comune in tutte le popolazioni (ad eccezione di IQUI), è presente un allele (*mdh-1*⁹⁰) in tutte le popolazioni degli Appennini del versante centro-nord, compreso Cilento e Puglia, con frequenze variabili fino allo 0,5; un

allele (*Mdh-1*¹¹⁰) distribuito dal massiccio del Pollino fino alle pendici dell'Aspromonte, sempre con frequenze variabili; e altri 6 alleli rari a basse frequenze, tre dei quali privati di una sola popolazione campionata.

Il locus *Gpi* è risultato essere anch'esso molto polimorfico (n=7 alleli) e con un pattern geografico estremamente complesso. È presente un allele *Gpi*⁹⁷ ad alte frequenze nella piana del Crati e nella porzione centro-nord della Catena Costiera ma completamente assente sia nelle popolazioni limitrofe della porzione sud della Catena e nella Sila Greca, che in quelle più meridionali delle Serre, dove invece è frequente, ed in alcuni casi fissato, il locus *Gpi*¹¹⁰. All'estremo sud dell'Aspromonte e nelle popolazioni più nordiche degli Appennini è invece fissato l'allele *Gpi*¹⁰⁰, mentre nell'area del Pollino si possono trovare tutti e 7 gli alleli riconosciuti. Nel locus *Mdhp-1* oltre ad un allele privato a frequenza molto bassa, ne sono stati trovati due (*Mdhp-1*¹⁰⁰ e *Mdhp-1*¹⁰⁸), presenti entrambi nell'areale nord della specie, il primo in linea generale più frequente nella zona settentrionale con frequenze che vanno diminuendo più ci spostiamo verso sud, fino a scomparire dalla porzione meridionale della Catena Costiera e dalla Sila Greca, dove quindi il secondo diventa esclusivo. Nei restanti loci polimorfici (*Mdhp-2*, *Pgm-2*, *6Pgdh* e *Pep-b*) esiste una evidente strutturazione geografica delle frequenze alleliche (Figura 3-1). Tra questi, i primi tre presentano degli alleli esclusivi con valore diagnostico tra le popolazioni dell'Appennino centro-settentrionale rispetto alle popolazioni campionate nel sud della Calabria: Sila Greca, Serre e Aspromonte. Frequenze alleliche intermedie tra i due gruppi sono state osservate nelle popolazioni geograficamente intermedie, ovvero in quelle campionate nell'area compresa tra il Pollino e la Catena Costiera, con prevalenze dell'allele "Nord" o "Sud" diverse ai vari loci per le varie popolazioni. Inoltre, al locus *6Pgdh* si osservano alleli che caratterizzano non solo le popolazioni più meridionali ma anche alleli che distinguono le popolazioni dell'Appennino centro-settentrionale da quelle della Puglia.

Tabella 3-1: Frequenze alleliche ai 17 loci polimorfici individuati in 36 popolazioni di *L. italicus* (numerate come in Tabella 1).

	Popolaz.	IQUI	IUMB	IMAT	IPES	IRE	IROS	ICST	IOTT	ITIO	ICON	IACQ	IMAS	INDO	IMOR	ITAO	ICIV	ITAR	ISDE	ICRO	IUBR	IVER	IFIC	IDUE	IULL	ILUC	ICER	IFIU	IBMC	ITEA	INOC	IPOL	IANG	IZUN	ISSB	IJON	ILEA
	1	2	3	5	6	8	10	14	15	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
Mpi	94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38	0.67	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.63	0.33	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.92	0.90	0.83	0.62	0.63	0.86	0.36	0.82	1.00
	103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08	0.10	0.17	0.38	0.37	0.14	0.64	0.18	-	
	108	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pgm1	83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	
	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.11	0.11	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.27	0.07	0.17	-	-	
	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.27	-	-	0.05	-	-	0.09	0.07	-	-	-	
	95	0.50	0.94	1.00	0.69	1.00	0.69	0.88	0.12	0.36	0.79	0.72	0.72	0.61	0.95	0.86	0.55	0.75	0.70	1.00	1.00	1.00	0.67	0.88	0.80	0.73	0.69	0.85	0.95	0.95	1.00	0.96	0.64	0.86	0.75	1.00	1.00
	98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	0.50	0.06	-	0.31	-	0.31	0.06	0.81	0.57	0.14	0.17	0.17	0.33	0.05	0.14	0.45	0.25	0.15	-	-	-	0.29	0.13	0.20	-	0.31	0.15	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-
	105	-	-	-	-	-	-	0.06	0.08	0.07	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pgm2	82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.36	-
	90	0.75	-	-	-	-	0.11	0.06	0.31	0.14	-	-	0.05	0.14	0.19	0.13	0.04	0.15	0.05	1.00	1.00	0.95	0.45	0.19	0.11	0.61	0.50	0.35	0.42	0.40	0.80	0.88	0.97	0.86	1.00	0.64	1.00
	100	0.25	1.00	1.00	0.96	1.00	0.89	0.94	0.65	0.86	0.93	1.00	0.95	0.86	0.81	0.59	0.92	0.85	0.95	-	-	0.05	0.55	0.81	0.89	0.37	0.50	0.65	0.58	0.60	0.20	0.12	0.03	0.14	-	-	-
	105	-	-	-	0.04	-	-	-	0.04	-	0.07	-	-	-	-	0.06	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gpi	85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-	-	-	-	0.14	-	-	-	0.05	-	-	0.19	-	-	-	-	-	0.04	0.03	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	97	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.21	-	-	0.09	0.05	0.12	-	-	0.60	0.22	-	-	-	0.38	0.33	0.92	0.41	0.44	0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	1.00	0.75	1.00	0.60	1.00	0.44	0.96	0.73	0.36	0.80	0.77	0.77	0.45	0.50	0.75	0.38	-	0.33	0.29	0.33	0.45	0.33	0.47	-	0.41	0.19	0.31	-	0.10	-	0.35	-	0.14	0.25	0.45	1.00
	108	-	-	-	0.25	-	-	0.04	-	-	0.10	-	0.05	0.23	0.23	0.15	0.15	0.30	-	-	-	-	0.04	0.06	-	0.02	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-
	110	-	0.25	-	0.15	-	0.56	-	0.23	0.29	0.10	0.23	0.09	0.18	0.15	0.10	0.23	0.10	0.44	0.71	0.67	0.55	0.17	0.11	0.08	0.14	0.31	0.12	1.00	0.90	1.00	0.58	1.00	0.86	0.75	0.55	-
	117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PepB	90	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	96	1.00	1.00	1.00	1.00	0.91	1.00	0.50	0.72	0.75	0.50	0.31	0.09	0.23	0.10	0.42	0.58	0.22	0.15	-	-	-	0.25	0.50	0.61	0.29	0.27	0.21	-	-	-	-	-	0.43	0.25	-	-
	100	-	-	-	-	0.09	-	0.50	0.17	0.25	0.40	0.06	0.55	0.45	0.45	0.27	0.38	0.78	0.75	0.64	0.17	0.25	0.67	0.08	0.22	0.71	0.54	0.33	0.96	0.85	0.95	1.00	1.00	0.57	0.68	1.00	1.00
	108	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-	-	0.63	0.27	0.32	0.40	0.31	0.04	-	-	0.36	0.83	0.75	0.08	0.42	0.17	-	0.12	0.46	0.04	0.15	0.05	-	-	-	0.07	-	-
	114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	0.05	-	-	-	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

In quattro casi, nei campionamenti di Mormanno ($n=2$), Acqualisparti e Tarsia, sono stati riscontrati significativi scostamenti dall'atteso equilibrio di HW ($p < 0,05$). Per quattro coppie di loci su 696 test effettuati e appartenenti a tre popolazioni campionate (sito 33 due coppie, 38 e 39 una) si sono riscontrati disequilibri di Linkage con livelli di significatività inferiori allo 0,05. A seguito della correzione di Bonferroni non si sono evidenziati disequilibri significativi per nessun test.

Le stime della variabilità genetica delle popolazioni sono presentate in Tabella 3-2. Il numero medio di alleli per locus varia da 1,1 ad 1,9; mentre la proporzione di loci polimorfici da 5,9% a 52,9%. L'eterozigosi osservata ed attesa hanno invece mostrato variazione nei range 0,025-0,250 e 0,025-0,238 rispettivamente. Complessivamente, le stime dei parametri di diversità genetica con valori più bassi sono state registrate nella popolazioni situate agli estremi Nord e Sud dell'areale di distribuzione della specie, assumendo valori minimi in Aspromonte (sito 44). Valori particolarmente elevati a tutti gli indici calcolati sono stati osservati invece nelle popolazioni del Pollino, Piana del Crati e la porzione nord della Catena Costiera, con valori massimi nella popolazione di Ficara (sito 30), le pendici a sud-ovest del massiccio del Pollino.

In Tabella 3-3 sono mostrate la matrici delle distanze genetiche tra coppie di popolazioni calcolate in base all'indice di distanza (D_N) di Nei (1978) e l'indice di distanza (D_A) di Cavalli Sforza (1969) con le modifiche apportate da Nei (1983). Valori massimi di distanza genetica si sono osservati tra le popolazioni degli Appennini settentrionali e le Serre Calabresi ($D_N=0,41$ e $D_A=0,50$).

Figura 3-1: Variazione geografica delle frequenze alleliche a 4 loci polimorfici individuati in 36 popolazioni di *L. italicus*.

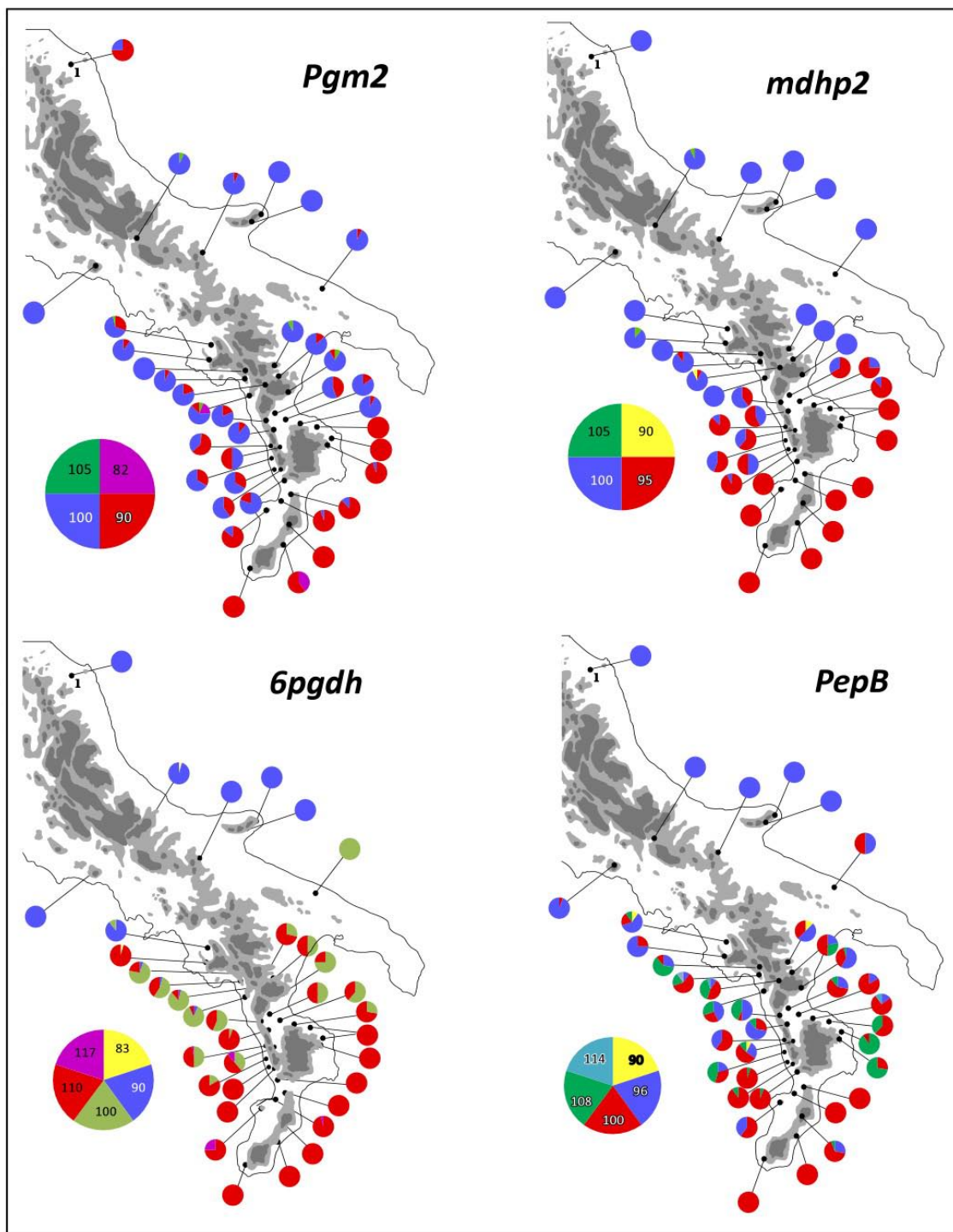


Tabella 3-2: Stime dei parametri di diversità genetica per le 36 popolazioni campionate studiate con gli allozimi (la numerazione segue la Tabella 1).

<i>popolazione</i>		<i>N</i>	<i>HE</i>	<i>Ho</i>	<i>A</i>	<i>P 95</i>
<i>App. nord</i>	1	2	0.10 (0.05)	0.12 (0.07)	1.2 (0.1)	17.6
<i>Gargano</i>	2	8	0.08 (0.04)	0.07 (0.04)	1.2 (0.1)	23.5
	3	4	0.04 (0.03)	0.04 (0.03)	1.1 (0.1)	11.8
<i>App. centrale</i>	5	14	0.12 (0.05)	0.11 (0.05)	1.5 (0.2)	23.5
	6	11	0.06 (0.03)	0.04 (0.02)	1.2 (0.1)	17.6
	8	9	0.13 (0.05)	0.16 (0.07)	1.3 (0.1)	29.4
<i>Puglia</i>	10	16	0.07 (0.03)	0.07 (0.04)	1.4 (0.2)	23.5
<i>Cilento</i>	14	13	0.17 (0.05)	0.15 (0.05)	1.8 (0.2)	47.1
	15	7	0.19 (0.06)	0.22 (0.08)	1.6 (0.2)	47.1
<i>Pollino</i>	17	7	0.18 (0.05)	0.18 (0.06)	1.7 (0.2)	52.9
	18	12	0.15 (0.05)	0.12 (0.04)	1.6 (0.2)	35.3
	19	11	0.20 (0.06)	0.18 (0.05)	1.9 (0.3)	47.1
	20	11	0.21 (0.07)	0.19 (0.06)	1.8 (0.3)	47.1
	21	13	0.20 (0.06)	0.15 (0.05)	1.9 (0.3)	52.9
	22	16	0.18 (0.06)	0.19 (0.05)	1.8 (0.2)	47.1
	23	16	0.15 (0.06)	0.13 (0.06)	1.6 (0.3)	35.3
<i>Piana Crati</i>	25	10	0.17 (0.05)	0.17 (0.06)	1.5 (0.2)	41.2
	26	10	0.16 (0.05)	0.17 (0.06)	1.6 (0.2)	41.2
<i>Sila greca</i>	27	8	0.12 (0.05)	0.09 (0.05)	1.3 (0.1)	23.5
	28	3	0.08 (0.05)	0.06 (0.04)	1.2 (0.1)	17.6
	29	10	0.11 (0.04)	0.12 (0.05)	1.4 (0.1)	35.3
<i>Piana Crati</i>	30	12	0.25 (0.06)	0.24 (0.06)	1.9 (0.3)	52.9
<i>Cat. Costiera</i>	31	18	0.20 (0.06)	0.21 (0.06)	1.8 (0.3)	52.9
	32	9	0.13 (0.05)	0.11 (0.04)	1.5 (0.2)	47.1
	33	23	0.22 (0.06)	0.19 (0.05)	1.9 (0.3)	47.1
	34	16	0.24 (0.07)	0.24 (0.06)	1.9 (0.3)	47.1
	35	13	0.18 (0.06)	0.15 (0.05)	1.5 (0.2)	41.2
	36	13	0.09 (0.04)	0.07 (0.03)	1.4 (0.1)	29.4
	37	10	0.14 (0.04)	0.15 (0.05)	1.6 (0.2)	52.9
	38	15	0.08 (0.03)	0.07 (0.03)	1.4 (0.1)	23.5
<i>Serre nord</i>	39	13	0.13 (0.05)	0.13 (0.05)	1.5 (0.2)	29.4
	40	15	0.09 (0.04)	0.08 (0.04)	1.4 (0.1)	23.5
<i>C. Vaticano</i>	41	7	0.12 (0.05)	0.13 (0.05)	1.4 (0.1)	35.3
<i>Serre sud</i>	42	14	0.15 (0.05)	0.16 (0.06)	1.5 (0.2)	35.3
<i>Aspromonte</i>	43	11	0.12 (0.05)	0.12 (0.05)	1.4 (0.1)	23.5
	44	14	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	1.1 (0.1)	5.9

N: numero di individui; A: numero medio di alleli per locus; P: proporzione di loci polimorfici (criterio del 95%); Ho: eterozigosità osservata; He: eterozigosità attesa (Nei, 1978). In parentesi sono indicati gli errori

Tabella 3-3: Valori delle distanze genetiche tra coppie di popolazioni calcolate in base all’indice di distanza (D_N) di Nei (1978; matrice superiore destra) e l’indice di distanza (D_a) di Nei (1983; matrice inferiore sinistra).

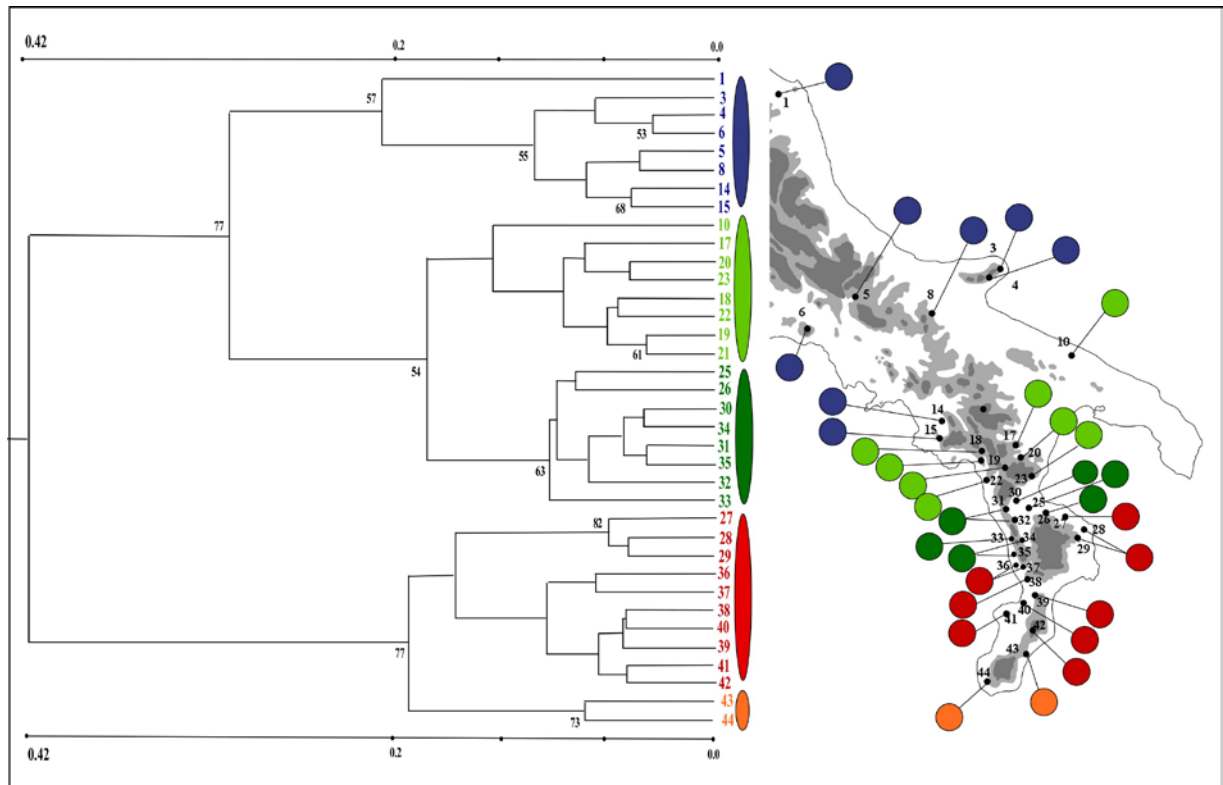
Popolazione		1	2	3	5	6	8	10	14	15	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
App. nord	1	*****	0.14	0.12	0.09	0.09	0.08	0.16	0.09	0.11	0.20	0.20	0.22	0.21	0.22	0.19	0.19	0.27	0.29	0.37	0.37	0.35	0.23	0.22	0.28	0.26	0.25	0.25	0.35	0.36	0.39	0.37	0.41	0.34	0.36	0.38	0.35
Gargano	2	0.13	*****	0.02	0.05	0.05	0.03	0.17	0.08	0.07	0.14	0.12	0.15	0.16	0.16	0.12	0.16	0.22	0.18	0.29	0.29	0.26	0.18	0.15	0.17	0.21	0.18	0.17	0.21	0.24	0.28	0.27	0.31	0.24	0.29	0.29	0.29
	3	0.13	0.00	*****	0.04	0.02	0.04	0.13	0.08	0.07	0.12	0.10	0.13	0.15	0.14	0.11	0.14	0.21	0.18	0.30	0.30	0.27	0.17	0.13	0.17	0.19	0.18	0.16	0.23	0.25	0.30	0.28	0.33	0.25	0.30	0.30	0.27
App. centrale	5	0.08	0.05	0.03	*****	0.03	0.02	0.10	0.05	0.04	0.10	0.10	0.13	0.12	0.13	0.10	0.09	0.17	0.18	0.33	0.32	0.30	0.16	0.13	0.18	0.20	0.18	0.17	0.24	0.26	0.31	0.29	0.34	0.27	0.31	0.32	0.33
	6	0.08	0.05	0.02	0.01	*****	0.04	0.08	0.07	0.06	0.10	0.10	0.13	0.13	0.13	0.11	0.11	0.19	0.18	0.32	0.32	0.29	0.17	0.14	0.19	0.18	0.19	0.17	0.24	0.26	0.31	0.29	0.34	0.27	0.32	0.31	0.29
	8	0.08	0.02	0.03	0.01	0.03	*****	0.13	0.04	0.03	0.12	0.10	0.13	0.12	0.13	0.11	0.11	0.18	0.17	0.28	0.28	0.26	0.15	0.13	0.16	0.19	0.15	0.15	0.20	0.23	0.26	0.27	0.29	0.23	0.27	0.29	0.30
Puglia	10	0.18	0.17	0.13	0.09	0.08	0.13	*****	0.11	0.12	0.06	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07	0.04	0.12	0.14	0.31	0.32	0.29	0.11	0.10	0.19	0.13	0.14	0.14	0.23	0.25	0.30	0.27	0.32	0.27	0.31	0.30	0.27
Cilento	14	0.07	0.08	0.07	0.03	0.06	0.03	0.13	*****	0.03	0.10	0.09	0.11	0.10	0.11	0.09	0.09	0.16	0.15	0.28	0.28	0.25	0.12	0.11	0.16	0.17	0.13	0.13	0.21	0.23	0.27	0.26	0.29	0.24	0.26	0.29	0.28
	15	0.10	0.05	0.05	0.01	0.04	0.01	0.11	0.00	*****	0.11	0.11	0.12	0.10	0.12	0.11	0.09	0.14	0.14	0.28	0.29	0.26	0.11	0.11	0.14	0.16	0.12	0.13	0.19	0.22	0.25	0.25	0.28	0.23	0.27	0.28	0.28
Pollino	17	0.18	0.11	0.08	0.07	0.07	0.09	0.04	0.09	0.07	*****	0.05	0.05	0.04	0.06	0.05	0.04	0.10	0.09	0.24	0.25	0.22	0.07	0.07	0.11	0.11	0.10	0.09	0.15	0.17	0.21	0.20	0.25	0.19	0.23	0.22	0.22
	18	0.21	0.11	0.09	0.08	0.09	0.09	0.04	0.09	0.08	0.03	*****	0.03	0.04	0.04	0.03	0.05	0.13	0.11	0.23	0.23	0.20	0.08	0.05	0.12	0.12	0.10	0.08	0.17	0.18	0.23	0.23	0.27	0.22	0.24	0.26	0.26
	19	0.23	0.11	0.09	0.11	0.11	0.11	0.06	0.11	0.09	0.02	0.02	*****	0.03	0.02	0.04	0.06	0.09	0.07	0.18	0.20	0.17	0.04	0.04	0.09	0.07	0.06	0.05	0.12	0.14	0.17	0.17	0.21	0.18	0.20	0.19	0.19
	20	0.21	0.14	0.12	0.09	0.10	0.10	0.04	0.08	0.06	0.01	0.02	0.01	*****	0.03	0.04	0.03	0.08	0.09	0.21	0.20	0.18	0.04	0.04	0.09	0.09	0.07	0.06	0.13	0.15	0.19	0.19	0.22	0.18	0.21	0.22	0.22
	21	0.23	0.14	0.12	0.11	0.11	0.12	0.04	0.13	0.10	0.03	0.01	0.01	0.01	*****	0.03	0.06	0.08	0.09	0.20	0.20	0.18	0.04	0.04	0.11	0.09	0.07	0.07	0.14	0.16	0.19	0.19	0.23	0.20	0.22	0.22	0.22
	22	0.20	0.10	0.08	0.10	0.10	0.10	0.04	0.10	0.09	0.03	0.01	0.02	0.02	0.01	*****	0.05	0.11	0.11	0.22	0.22	0.20	0.06	0.05	0.13	0.11	0.09	0.09	0.16	0.18	0.22	0.21	0.26	0.20	0.23	0.22	0.23
	23	0.19	0.16	0.13	0.07	0.09	0.09	0.02	0.08	0.06	0.03	0.03	0.05	0.01	0.04	0.04	*****	0.08	0.10	0.26	0.26	0.24	0.07	0.06	0.12	0.12	0.09	0.10	0.17	0.19	0.23	0.23	0.26	0.21	0.25	0.26	0.26
Piana Crati	25	0.32	0.23	0.21	0.17	0.20	0.19	0.11	0.18	0.13	0.09	0.12	0.08	0.06	0.07	0.11	0.08	*****	0.04	0.18	0.20	0.18	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.11	0.12	0.14	0.15	0.16	0.14	0.18	0.18	0.19

Popolazione		1	2	3	5	6	8	10	14	15	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Piana Crati	26	0.37	0.19	0.18	0.20	0.21	0.18	0.17	0.19	0.15	0.09	0.12	0.07	0.08	0.10	0.12	0.13	0.03	*****	0.13	0.14	0.12	0.05	0.06	0.05	0.05	0.04	0.04	0.07	0.08	0.09	0.10	0.12	0.09	0.13	0.12	0.13
Sila greca	27	0.42	0.33	0.34	0.38	0.39	0.33	0.37	0.34	0.32	0.25	0.28	0.21	0.23	0.24	0.25	0.33	0.18	0.11	*****	0.03	0.04	0.15	0.16	0.16	0.13	0.12	0.12	0.09	0.08	0.06	0.07	0.08	0.08	0.09	0.08	0.10
	28	0.45	0.35	0.34	0.39	0.40	0.35	0.40	0.36	0.34	0.27	0.26	0.24	0.24	0.25	0.25	0.34	0.21	0.14	0.02	*****	0.03	0.16	0.16	0.16	0.15	0.14	0.11	0.10	0.09	0.08	0.09	0.10	0.09	0.09	0.10	0.11
	29	0.40	0.30	0.29	0.35	0.35	0.30	0.34	0.31	0.30	0.22	0.23	0.19	0.20	0.21	0.21	0.30	0.17	0.10	0.02	0.02	*****	0.14	0.13	0.14	0.12	0.11	0.09	0.09	0.06	0.06	0.06	0.08	0.06	0.08	0.09	0.09
Piana Crati	30	0.24	0.14	0.13	0.14	0.15	0.13	0.09	0.11	0.09	0.04	0.06	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06	0.03	0.04	0.12	0.16	0.12	*****	0.02	0.05	0.04	0.02	0.03	0.10	0.11	0.13	0.13	0.16	0.13	0.15	0.15	0.15
Cat. Costiere	31	0.23	0.11	0.09	0.10	0.11	0.11	0.07	0.12	0.09	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.05	0.05	0.05	0.17	0.16	0.13	0.02	*****	0.04	0.05	0.03	0.02	0.12	0.13	0.16	0.16	0.20	0.14	0.18	0.18	0.18
	32	0.35	0.16	0.16	0.18	0.21	0.17	0.22	0.19	0.13	0.10	0.14	0.10	0.10	0.13	0.14	0.15	0.06	0.05	0.16	0.17	0.13	0.05	0.05	*****	0.07	0.04	0.02	0.09	0.11	0.12	0.15	0.16	0.12	0.16	0.17	0.18
	33	0.28	0.21	0.19	0.20	0.20	0.19	0.14	0.18	0.16	0.10	0.13	0.08	0.09	0.09	0.10	0.13	0.03	0.03	0.08	0.12	0.08	0.02	0.05	0.07	*****	0.04	0.05	0.10	0.10	0.10	0.09	0.11	0.09	0.12	0.12	0.12
	34	0.27	0.16	0.16	0.16	0.19	0.14	0.14	0.13	0.11	0.08	0.09	0.06	0.06	0.07	0.07	0.10	0.03	0.02	0.09	0.11	0.08	0.00	0.03	0.03	0.01	*****	0.03	0.09	0.09	0.10	0.10	0.13	0.10	0.12	0.14	0.15
	35	0.30	0.16	0.15	0.17	0.18	0.16	0.16	0.16	0.13	0.07	0.09	0.06	0.06	0.08	0.09	0.12	0.05	0.03	0.10	0.10	0.07	0.02	0.02	0.01	0.04	0.01	*****	0.08	0.09	0.11	0.12	0.14	0.11	0.13	0.14	0.13
	36	0.43	0.23	0.24	0.27	0.29	0.22	0.26	0.25	0.20	0.13	0.18	0.12	0.12	0.15	0.17	0.19	0.11	0.05	0.07	0.11	0.09	0.06	0.12	0.09	0.08	0.05	0.06	*****	0.04	0.04	0.06	0.05	0.06	0.09	0.09	0.13
	37	0.49	0.29	0.29	0.32	0.33	0.27	0.30	0.30	0.26	0.18	0.23	0.16	0.17	0.19	0.22	0.24	0.11	0.04	0.06	0.09	0.06	0.10	0.14	0.11	0.08	0.07	0.08	0.03	*****	0.03	0.04	0.05	0.04	0.06	0.09	0.12
	38	0.48	0.33	0.34	0.37	0.39	0.31	0.36	0.34	0.30	0.23	0.29	0.20	0.21	0.23	0.25	0.30	0.14	0.07	0.03	0.07	0.05	0.11	0.17	0.14	0.08	0.07	0.10	0.03	0.02	*****	0.03	0.03	0.03	0.05	0.06	0.11
Serre nord	39	0.44	0.32	0.31	0.36	0.37	0.32	0.33	0.32	0.29	0.22	0.28	0.19	0.21	0.22	0.23	0.29	0.13	0.08	0.03	0.07	0.05	0.10	0.16	0.15	0.06	0.07	0.10	0.05	0.03	0.01	*****	0.03	0.03	0.04	0.06	0.09
	40	0.50	0.38	0.39	0.42	0.45	0.35	0.40	0.35	0.32	0.27	0.33	0.25	0.24	0.28	0.29	0.33	0.16	0.10	0.04	0.08	0.07	0.13	0.21	0.17	0.09	0.09	0.13	0.04	0.04	0.01	0.02	*****	0.03	0.03	0.07	0.12
C. Vaticano	41	0.42	0.29	0.29	0.33	0.35	0.27	0.34	0.29	0.27	0.21	0.27	0.21	0.21	0.24	0.23	0.28	0.14	0.08	0.04	0.06	0.04	0.11	0.15	0.12	0.07	0.07	0.09	0.05	0.02	0.01	0.02	0.02	*****	0.03	0.08	0.11
Serre sud	42	0.47	0.37	0.37	0.41	0.43	0.36	0.41	0.35	0.34	0.28	0.33	0.26	0.26	0.30	0.29	0.35	0.20	0.13	0.06	0.07	0.06	0.15	0.21	0.18	0.11	0.11	0.14	0.09	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	*****	0.08	0.12
Aspromonte	43	0.48	0.33	0.33	0.38	0.38	0.35	0.35	0.35	0.32	0.22	0.30	0.20	0.22	0.24	0.24	0.31	0.16	0.09	0.06	0.09	0.07	0.12	0.18	0.16	0.08	0.09	0.11	0.07	0.06	0.04	0.03	0.05	0.05	0.07	*****	0.04
	44	0.44	0.34	0.32	0.40	0.37	0.39	0.34	0.35	0.32	0.23	0.31	0.21	0.25	0.26	0.25	0.34	0.20	0.13	0.09	0.13	0.09	0.14	0.20	0.20	0.10	0.13	0.13	0.14	0.13	0.10	0.07	0.12	0.11	0.12	0.03	*****

3.1.2 Struttura delle popolazioni

La complessità della variazione delle frequenze ai singoli loci trova una sintesi nell'analisi del genotipo multilocus. In Figura 3-2 è rappresentato il fenogramma UPGMA costruito in base alle distanze genetiche D_a (Cavalli Sforza, 1969; Nei et al., 1983) e la distribuzione geografica dei principali gruppi da esso individuati. Nel fenogramma le popolazioni di *L. italicus* vengono suddivise in due cladi principali ben supportati (bootstrap= 77%), un clade (N) comprende le popolazioni del nord del range di distribuzione della specie fino alla porzione centrale della Catena Costiera (1-26, 30-35), mentre l'altro clade comprende la Sila-greca (27-29) e tutte le popolazioni a sud di Fiumefreddo Bruzio, (36-44). La distanza genetica media (D_a) tra i due cladi N ed S è risultata pari a 0.24 ($D_{NEI}=0,24$). Il clade N è suddiviso a sua volta in due cladi supportati da valori di bootstrap maggiori del 50%: un clade comprende le popolazioni dell'Appennino centro-settentrionale (12-14), mentre l'altro che comprende le restanti popolazioni del clade nord, è ulteriormente suddiviso tra le popolazioni del tavoliere della Puglia e del Pollino, da quelle della Piana del Crati e del Nord della Catena Costiera (solo quest'ultimo gruppo è supportato da valori di bootstrap superiori il 50%) . All'interno del clade S, solo i subcladi che racchiudono le popolazioni della Sila-greca e dell'Aspromonte sono supportati da un alto valore alto di bootstrap (>70%).

Figura 3-2: Fenogramma UPGMA basato sulle distanze D_A di Nei et al. (1983) e distribuzione geografica dei principali cladi terminali individuati. I valori di bootstrap >50% sono riportati ai nodi.



L'analisi non gerarchica dei gruppi, condotta con il software Structure, ha prodotto i raggruppamenti possibili per ogni valore di k . Il software ha fornito per $k=5$ due differenti suddivisioni in cluster che sono state trattate separatamente ($k5_{\text{nord}}$ e $k5_{\text{sud}}$). In

Figura 3-3 sono riportate su un grafico Cartesiano le medie dei valori logaritmici ($\Pr$) per ogni valore di K sulla base del quale si è scelto come raggruppamento più verosimile una suddivisione in 5 cluster ($k5_{\text{sud}}$). Infatti la probabilità logaritmica $\Pr$ aumenta rapidamente da $K=1$ fino a $K=5_{\text{sud}}$, per poi livellarsi intorno al valore di $K=5_{\text{sud}}$, assumendo incrementi molto bassi per i successivi valori di K . La percentuale media degli individui di ogni popolazione campionata di appartenere ad ognuno dei cinque gruppi prescelti (Q), mediata per le 15 corse, è riportata in Figura 3-4 (a); mentre in Figura 3-4 (b- f) sono rappresentate le interpolazioni geografiche eseguite con il metodo Spline per ognuno dei cinque gruppi trovati. Sostanzialmente il programma Structure individua un primo gruppo (GI) con popolazioni distribuite lungo gli Appennini centro-settentrionali fino al massiccio del Cilento compreso; un secondo gruppo (GII) in Puglia, Lucania e Pollino; un terzo (GIII) con le popolazioni appartenenti alla Piana del Crati e lungo la porzione centro-nord della Catena Costiera; un quarto gruppo (GIV) che comprende la parte meridionale della Catena Costiera e le Serre

Calabresi; ed infine, il quinto (GV) che raggruppa le popolazioni del massiccio dell'Aspromonte e della Sila-greca.

L'analisi dei Cluster con il software Structure per K=2 individua in maniera chiara e con livelli limitati di *intermixing* due gruppi di popolazioni, il primo include le popolazioni dei cluster GI, GII, GIII emersi dall'analisi precedente, il secondo comprende GIV e GV. Questa suddivisione è in accordo con i due cladi N ed S individuati in base alle distanze genetiche nel fenogramma UPGMA.

Figura 3-3: Media delle stime dei valori logaritmici (Pr) ottenute con 5 corse indipendenti di Structure per ogni predefinito numero di cluster (K, 1-11).

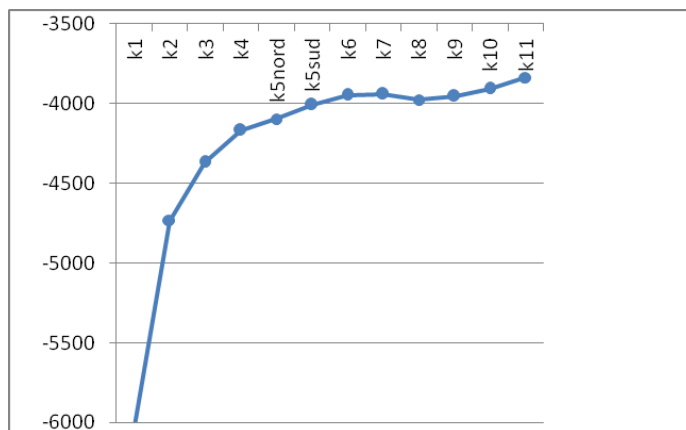
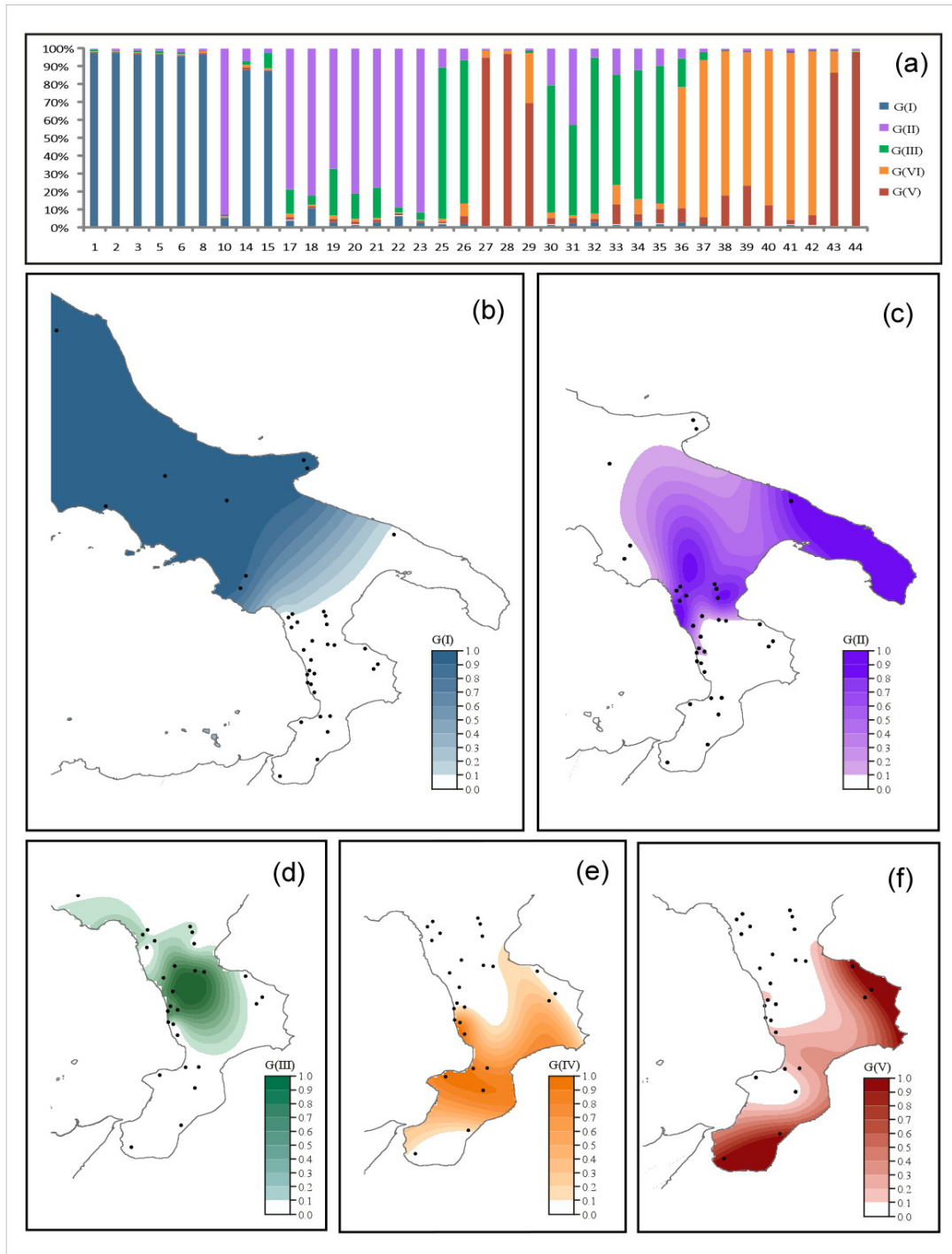


Figura 3-4: Risultati dell'analisi Bayesiana dei *cluster*. Ognuno dei cinque cluster è riportato con colori diversi come in legenda. **(a)** Percentuale media (Q) degli individui di ogni popolazione campionata di appartenere ad ognuno dei cinque gruppi prescelti, calcolata con il *software* Structure (15 corse). **(b-e)** Superfici d'interpolazione ottenute con il metodo Spline che mostrano la variazione geografica di Q di ogni popolamento campionato in ogni gruppo, come inferito da Structure. In legenda sono riportati i valori di Q e le corrispettive gradazioni di colore.



3.1.1 Analisi gerarchica della varianza

La suddivisione delle popolazioni in cluster ottenuta con Structure è stata utilizzata per l'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992), e il risultato di tale analisi viene riportato nella Tabella 3-6. L'AMOVA ha indicato come il 45.3% della varianza totale risulti ascrivibile alle differenze tra i gruppi, mentre il 43.8% sia imputabile alle differenze all'interno delle popolazioni e solo il 10.9% a differenze tra popolazioni all'interno dei gruppi. Tutte le componenti della variazione sono risultate altamente significative ($P < 0,01$).

Tabella 3-4: Risultati dell'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) effettuata tenendo conto del miglior raggruppamento per il dataset allozimico, come indicato dall'analisi non gerarchica dei cluster effettuata con il software Structure (Pritchard *et al.*, 2006).

componenti della varianza	gradi di libertà	percentuale di variazione	statistica F
Tra gruppi	4	45.27	$F_{CT}=0.45^*$
Tra popolazioni all'interno dei gruppi	31	10.91	$F_{SC}=0.20^*$
all'interno delle popolazioni	792	43.81	$F_{ST}=0.56^*$

* $P < 0.001$

3.1.2 Analisi di flusso genico nella zona di contatto

Per l'analisi del flusso genetico attuale tra i principali cladi (N e S) sono stati scelti due transetti: uno lungo la Catena Costiera fino le Serre (tra la popolazione 31 e la 42) per un totale di 178 individui, e l'altro dalla Piana del Crati alla Sila-greca (tra la popolazione 25 e la 31) per un totale di 61 campioni (vedi Figura 2-1).

3.1.2.1 Transetto Catena Costiera-Serre

L'analisi implementata con il software NewHybrids ha individuato principalmente genotipi appartenenti a le due classi parentali: 147 genotipi sono stati stimati essere parentali con alte

probabilità (maggiori dello 0,9) di cui 69 di tipo N (dalla popolazione 31 alla 35) e 77 di tipo S (popolazioni 36-42); ulteriori 22 (15 N e 7 S) sono stati assegnati alle classi parentali con probabilità dallo 0,7-0,9 e altri 6 con probabilità comprese tra 0,5 e 0,7. Di questi 173 genotipi parentali (il 98,3% del campionamento in quest'area di contatto) solo 1 è stato assegnato (con probabilità >0.9) al genotipo parentale differente (tipo S) da tutti gli altri individui campionati nel medesimo sito (popolazione 33, San Lucido, tipo N). Per i restanti 4 genotipi (2 individui della popolazione 36, uno della 33 e uno della 34) il programma ha assegnato delle probabilità distribuite a tutte e sei le categorie genotipiche. Il genotipo di nessun individuo è stato assegnato alle categorie ibride (F1, F2 o Bk) con una probabilità superiore lo 0.15, solo in un caso la probabilità posteriore di essere F2 è stata pari allo 0.35. Se vengono cumulate le probabilità di tutte e quattro le classi ibride si ottengono comunque valori bassi: solo 6 genotipi hanno probabilità stimate comprese tra 0.2 e 0.5, e un unico individuo, campionato nella località Cerisano (sito 34), presenta una probabilità cumulata ibrida pari allo 0.8. La sommatoria delle probabilità di appartenere a classi ibride F1 e F2 non supera mai lo 0.5.

3.1.2.2 Transetto piana del Crati-Sila greca

Anche in questo transetto sono stati individuati unicamente genotipi appartenenti alle due categorie parentali e con probabilità elevate (maggiori di 0,9): 50 individui (campionati nei siti 25, 26, 30 e 31) sono stati assegnati alla categoria N mentre 20 a quella S (siti 27-29). Il genotipo di un solo individuo, appartenente alla popolazione 29 (Verzino), ha avuto delle probabilità di assegnazione di 0.4 e 0.5 per entrambi le classi parentali, N e S rispettivamente. Il genotipo di nessun individuo è stato assegnato alle categorie ibride (F1, F2 o Bk) con una probabilità superiore lo 0.1. Se vengono cumulate le probabilità di tutte e quattro le classi ibride si ottengono comunque valori al di sotto dello 0.15.

Le elaborazioni effettate inserendo nel programma informazioni a priori sullo stato parentale di 20 individui per ciascuna classe, hanno fornito dei risultati non apprezzabilmente dissimili a quelli precedentemente esposti, per cui non verranno ulteriormente trattati.

3.1.2.3 Simulazioni

Per generare genotipi con il software Hybridlab, sono stati utilizzati 20 individui scelti tra le località Ficara, Lago due Uomini e SB Ullano (siti 30,31,32) per la forma N; mentre sono stati scelti 20 individui appartenenti alle località di Serra San Bruno, Polia, Zungri e Angitola per la forma S.

Il 90% dei genotipi simulati come parentali sono stati correttamente identificati dal programma NewHybrids con probabilità superiori allo 0.7, il 100% con probabilità non inferiori lo 0.5. Per quanto riguarda gli ibridi simulati le *performance* migliori si sono ottenute per gli F1, correttamente identificati (probabilità > 0,7) nel 60% dei casi, mentre nessun genotipo è stato identificato erroneamente come parentale. Gli F2 e i Bk non sono mai stati identificati come tali con probabilità superiori lo 0,5. Tuttavia se vengono cumulate le probabilità di appartenere alle classi ibride, il programma identifica correttamente come ibridi il 90% degli F1 e F2 ($p > 0.7$) di cui un 70% con elevate probabilità posteriori (superiori lo 0.9). Per quanto riguarda i reincroci (Bk) le probabilità cumulate superano lo 0.7 solo nel 54% dei casi. Un 9% e un 17% rispettivamente degli F2 e Bk simulati è stato erroneamente individuato come parentale (con $p > 0.7$); mentre tutti gli altri individui (10% per F1, 1% per F2 e 29% per Bk) non sono stati identificati, avendo probabilità ripartite in tutte le classi genotipiche.

Le simulazioni effettuate per il dataset della Piana del Crati-Sila ha fornito dei risultati piuttosto simili, le probabilità posteriori cumulate di F1 e F2 hanno correttamente identificato le forme ibride (F1 e F2) nell' 88% dei casi (con $p > 0.7$).

3.2 DATI MITOCONDRIALI

3.2.1 Analisi delle sequenze

Per tutti gli individui di *L. italicus* analizzati (n=358) sono stati ottenuti due frammenti di DNA, ND2 e ND4. Le analisi sono state condotte cumulando per ciascun individuo i due frammenti, pertanto ogni sequenza risulta complessivamente di 1897 bp. Quando nell'allineamento vengono incluse anche le sequenze relative ai due outgroups (*M. alpestris* e *L. vulgaris*) la matrice dei dati comprende 1904 caratteri per ciascun individuo, con 611 siti variabili e 292 siti informativi ai fini della parsimonia, con 6 gaps (con lunghezza da 1bp a 4bp, pari ad un totale di 14bp). Complessivamente sono stati individuati 65 aplotipi e la loro distribuzione tra le popolazioni è riportata nella Tabella 3-5.

Tabella 3-5: Distribuzione degli aplotipi di mtDNA individuati in 44 popolazioni di tritone italico (in parentesi è riportato il numero di osservazioni).

popolazione	aplotipi	popolazione	aplotipi
<i>App. nord</i>	1 DII1(2)	<i>Pollino</i>	23 EI9(9)
	2 DII1(1)		24 CI1(1), EII2(1)
<i>Gargano</i>	3 DII1(3)	<i>Piana Crati</i>	25 CI9(9)
	4 DII1(1)		26 EII1(2), EII3(7)
<i>App. centrale</i>	5 DII1(13), DII2(3)	<i>Sila greca</i>	27 B1(8)
	6 DII1(1), DII3(13)		29 B2(2), B3(5), B4(1)
	7 DII1(3), DII4(2)	<i>Piana Crati</i>	30 CI1(6), EII3(1)
	8 DII1(8), DII4(3), DII5(1)	<i>Catena Costiera</i>	31 CI1(2), CI2(2), CI3(1), C4(1), CI5(2)
	9 DII6(3), DII7(1),		32 CI1(8)
<i>Puglia</i>	10 CII1(12)		33 CI6(1), CI7(3), CI8(2)
	11 CII3(5), CII4(1)		34 CI11(9)
	12 CII1(7)		35 CI1(5), CI10(1)
<i>Lucania</i>	13 CII6(1), EI3(5)		36 AII1(8)
<i>Cilento</i>	14 DI1(4), DI2(4), DI3(1), DI14(1), DII9(3)		37 AII1(1), AII3(3), AIII1(2)
	15 DII8(1), DI1(2), DI5(4)		38 AIII1(4), AIII2(10)
<i>Costa ionica</i>	16 CII1(3), CII2(8), CII5(5), EI3(2)	<i>Serre nord</i>	39 AII3(12)
<i>Pollino</i>	17 EI9(2), EI5(1), EI1(1), EI7(2), EI6(1)		40 AII7(5), AII8(2), AII9(3)
	18 EI9(3), EI3(1)	<i>Capo Vaticano</i>	41 AII2(2), AII4(3), AII5(1)
	19 EI3(5), EI9(1)	<i>Serre sud</i>	42 AII3(3), AII6(6)
	20 EI8(1), EI9(12), EI4(1), EI5(2)	<i>Aspromonte</i>	43 AI1(8), AI2(5), AI3(1), AI4(4)
	21 CI12(2), EI2(1), EI9(6)		44 AI5(12)
	22 EI9(4), EI3(2)		

3.2.2 Analisi filogenetiche

L'albero filogenetico ML raffigurante le relazioni tra gli aplotipi individuati, basato sul modello di evoluzione TrN+ Γ (con gamma = 0,142), è mostrato in Figura 3-5 A. Il valore di probabilità logaritmica (*log-likelihood*) per il miglior albero di ML è risultato essere pari a -5786,41.

Nell'albero sono evidenti due cladi principali, N ed S, ciascuno dei quali è suddiviso in altri cladi e sottocladi. Complessivamente si osservano 10 sottocladi, tutti altamente supportati (con l'unica eccezione per il clade CI); due in più rispetto a quelli già descritti da Canestrelli et al, 2011. Per ciascun clade e sottoclade è evidente una forte corrispondenza con la geografia (vedi Figura 3-5 B). Il primo dei 2 cladi principali (N) è ampiamente distribuito in gran parte dell'areale del tritone italico, dal limite settentrionale fino alla Calabria centro-occidentale (la porzione centro-settentrionale della Catena Costiera; popolazioni 1-16, 24-26, 30-35), con l'esclusione dei monti Lucani e del massiccio del Pollino che, sebbene si trovano circondati da popolazioni afferenti al clade N, vengono raggruppati nel secondo clade (S) comprendente anche le popolazioni distribuite nel resto della Calabria centro-meridionale (popolazioni 13-24, 26-29, 36-44). Gli aplotipi di questi due cladi sono stati osservati in simpatria (unicamente coinvolgendo i sottocladi C ed E) in 5 popolazioni campionate nelle aree marginali del massiccio del Pollino (13, 16, 21, 24, 30). Da notare che non si è osservata simpatria tra le popolazioni dei cladi C ed A, nell'area di contatto lungo la Catena Costiera dove la minor distanza geografica tra popolazioni di cladi differenti è di soli 9,5 Km. La divergenza genetica netta tra questi due cladi principali è risultata essere pari al 4,1% (0,4% SE).

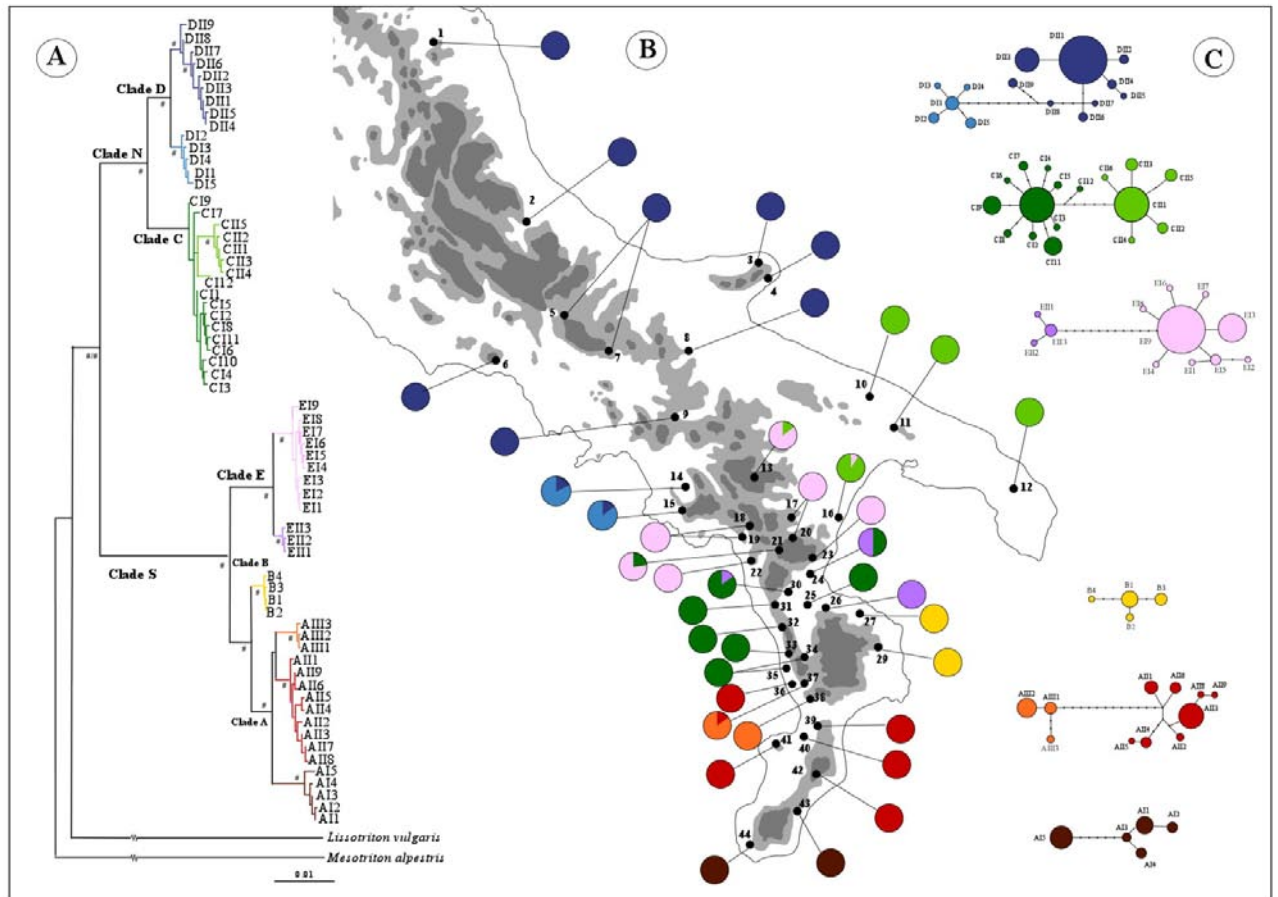
Il clade N è suddiviso in due cladi (D e C) tra i quali la divergenza netta è risultata essere pari al 1,5% (0,3% SE), il clade D comprende tutti gli aplotipi osservati nelle popolazioni più settentrionali compreso l'area del Gargano e del Cilento (pop. 1-9, 14 e 15), mentre il clade C è costituito dagli aplotipi osservati nelle popolazioni della Puglia e della Catena Costiera (pop. 10-13, 16, 24-26, 30-35). Non sono state osservate aree di simpatria tra questi due sottocladi. Inoltre, sia il clade D che C sono suddivisibili ciascuno in 2 aplogruppi, ognuno dei quali è caratteristico di un'area geografica ben definita (vedi Figura 3-5 AB).

Il clade S prima si suddivide in due cladi E e (A+B), per poi dividersi ulteriormente in A e B. La divergenza tra E ed (A+B) è risultata essere del 2,1% (0,3% SE) mentre tra A e B del 1,1%

(0,2% SE). Il Clade E è suddiviso in due aplogruppi uno (EI) presente nelle popolazioni dei monti Lucani e del massiccio dell'Aspromonte, l'altro (EII) esclusivamente in alcune popolazioni della Piana del Crati. Interessante notare che anche il clade E non è mai stato trovato insieme (in simpatria) al clade A o B e che le distanze geografiche minori tra popolamenti di cladi differenti (EII-B, pop. 26-27) è inferiore a 30 Km. Il subclade B è composto da tutti gli aplotipi osservati esclusivamente nell'area corrispondente alla Sila-greca (pop. 27-29). Il subclade A invece è suddiviso in tre aplogruppi, uno dei quali è costituito da aplotipi osservati esclusivamente in Aspromonte (clade AI, popolazioni 22 e 23), mentre gli altri due presentano aplotipi osservati nella porzione meridionale della Catena Costiera, nelle Serre e a Capo Vaticano.

I network di massima parsimonia statistica sono riportati nella Figura 3-5 C. L'analisi di massima parsimonia statistica, condotta con il limite del 95% per una connessione parsimoniosa, non ha connesso tutti gli aplotipi in un unico network, ma li ha suddivisi in 6 networks distinti. Tra i network e i cladi individuati dall'analisi filogenetica si osserva un ottima corrispondenza; in particolare ai cladi B, C, D ed E corrispondono altrettanti networks, mentre al clade A ne corrispondono 2 differenti.

Figura 3-5: (A) Albero filogenetico ML basato sulla distanza genetica TrN93+Γ. Ai nodi vengono riportati i valori di bootstrap (bs) # = bs >90%. **(B)** Distribuzione delle maggiori linee evolutive individuate dall'analisi filogenetica. **(C)** Networks di parsimonia statistica tra gli aplotipi individuati. La dimensione degli aplotipi nel network è proporzionale al numero di osservazioni dell'aplotipo a livello dell'intero dataset. I cerchi piccoli rappresentano gli aplotipi intermedi, inferiti ma non trovati (le popolazioni sono numerate come in Tabella 1).



3.2.3 Struttura e differenziamento genetico delle popolazioni

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA) è stata condotta utilizzando come raggruppamenti di popolazioni i 10 aplogruppi terminali individuati dall'analisi filogenetica (AI-EII vedi Figura 3-5 A). I risultati dell'AMOVA sono riportati in Tabella 3-6. Le differenze tra gruppi sono risultate tali da spiegare il 91,98% della variazione osservata a livello dell'intero dataset, mentre una porzione minima della variazione viene attribuita alle differenze all'interno dei gruppi (1,91%) e alle differenze all'interno delle popolazioni (6,11%, vedi tabella 15). Tutte le componenti della variazione sono risultate altamente significative ($P < 0,01$).

I valori delle stime della diversità genetica mitocondriale (Nei, 1987) per i soli aplogruppi terminali evidenziati dall'analisi filogenetica sono presentate in Tabella 3-7. Se non si considera il clade EII che è formato da una sola popolazione (sito 26) e presenta i valori più bassi, la diversità nucleotidica varia tra $0,80 \times 10^3$, osservata nel clade AIII, e $6,12 \times 10^3$, osservata nel clade CII. Anche la diversità aplotipica è risultata bassa nel clade B (0,80) mentre il valore più alto è stato osservato nel clade DII (0,84).

Tabella 3-6: Risultati dell'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) effettuata sul dataset mitocondriale. I gruppi di popolazioni sono stati definiti come suggerito dall'analisi filogenetica secondo i 10 cladi terminali.

componenti della varianza	gradi di libertà	percentuale di variazione	statistica F
Tra gruppi	9	91.98	$F_{CT}=0.92^*$
Tra popolazioni all'interno dei gruppi	31	1.91	$F_{SC}=0.24^*$
all'interno delle popolazioni	317	6.11	$F_{ST}=0.94^*$

* $P < 0.001$

3.2.4 Il tempo di coalescenza (TMRCA)

La stima del tempo di coalescenza (TMRCA) per i cladi individuati dall'analisi filogenetica vengono mostrati nella tabella 14. Per tutti i cladi terminali (AI-AIII, B, CI, CII, DI, DII, EI,

EII), la stima del tempo di coalescenza ricade all'interno del tardo Pleistocene (11.700 - 126.000 anni fa), mentre la stima del TMRCA per i cladi compresi nei due cladi maggiori (clades A, C, D, E, A+B, AII+AIII, N e S) suggerisce una divergenza risalente al Pleistocene Medio (126.000 -781.000 anni fa). In fine la divergenza tra i due cladi principali è stimata circa 1,7 milioni di anni fa, quindi all'incirca all'inizio del Pleistocene.

Tabella 3-7: Stime del tempo dall'antenato comune più recente (TMRCA; in migliaia di anni) e intervallo di densità della più alta probabilità ad esso associato (95% hpd). Stime di diversità nucleotidica (π) e aplo tipica (h) (Nei, 1987) per ciascuno dei dieci cladi terminali individuati dall'analisi filogenetica di *L. italicus* (in parentesi viene riportata la deviazione standard).

Clade	TMRCA		Diversità Genetica	
	mean	95% hpd	$\pi (*10^3)$	h
AI	81	31-140	2.14 (1.20)	0.74 (0.05)
AII	83	34-139	1.75 (1.01)	0.82 (0.04)
AIII	38	17-70	1.45 (0.89)	0.67 (0.07)
CI	86	30-150	3.00 (1.62)	0.80 (0.04)
CII	38	19-60	6.12 (3.14)	0.69 (0.06)
DI	42	18-73	0.57 (0.42)	0.65 (0.06)
DII	104	46-172	2.51 (1.45)	0.84 (0.05)
EI	44	20-71	5.80 (2.96)	0.56 (0.06)
EII	35	15-61	0.20 (0.23)	0.39 (0.16)
B	48	19-92	0.80 (0.57)	0.67 (0.08)
AII+AIII	269	149-402		
A	309	183-450		
E	199	98-312		
C	116	52-187		
D	209	103-326		
A+B	488	294-692		
S	758	478-1065		
N	555	329-813		
Ingroup	1678	808-2660		

3.3 SEQUENZE NUCLEARI

3.3.1 Beta fibrinogeno (Fib)

Per 213 campioni analizzati si sono ottenute sequenze di 523 Bp, con un totale di 41 siti polimorfici (di cui 35 utili ai fini della parsimonia). Sono presenti due inserzioni-delezioni per

una base azotata che sono state trattate ognuna come singolo polimorfismo. Con il metodo di Hudson e Kaplan (1985) si sono riscontrati 7 eventi di ricombinazione come numero minimo. Al contrario i test di ricombinazione di Bruen et al. (2006) sono risultati tutti non significativi. Complessivamente sono stati individuati 43 aplotipi, la loro distribuzione tra le popolazioni è riportata nella Tabella 3-8.

Il network di parsimonia statistica raffigurante le affinità tra gli aplotipi individuati è mostrato in Figura 3-6 A. Malgrado il network sia risultato essere complesso, sono facilmente individuabili tre raggruppamenti principali di aplotipi di seguito indicati come: gruppo F1 (costituito da 23 aplotipi), FII (8 aplotipi) e FIII (2 aplotipi). La distribuzione geografica degli aplogruppi è mostrata in Figura 3-6. Il gruppo F1 che comprende la maggior parte degli aplotipi è distribuito, con frequenze diverse, in tutte le popolazioni campionate, e presenta una strutturazione complessa che non verrà trattata ulteriormente. Gli altri due aplogruppi FII ed FIII sono facilmente evidenziabili avendo rispettivamente un minimo di 7 e 6 sostituzioni nucleotidiche che li separano da F1. L'aplogruppo FII è presente esclusivamente nelle popolazioni che vanno dalla porzione sud della Catena Costiera fino al massiccio dell'Aspromonte, mentre FIII è distribuito nelle sole popolazioni della Sila-greca.

3.3.2 Ormone della crescita (Gh)

Per 169 campioni analizzati si sono ottenute sequenze di 525 Bp, con un totale di 21 siti polimorfici (di cui 19 utili ai fini della parsimonia). Sono presenti due inserzioni-delezioni per una base azotata che sono state trattate ognuna come singolo polimorfismo. Inoltre sono state trovate due ulteriori indels (mai osservate in eterozigosi) che coinvolgevano 6 e 41 Bp, rispettivamente presenti nelle popolazioni di Zungri (sito 41) e Mormanno (sito 21); entrambe sono state trattate come singolo evento di mutazione. Con il metodo di Hudson e Kaplan (1985) si sono riscontrati 2 eventi di ricombinazione come numero minimo. Al contrario i test di ricombinazione di Bruen et al. (2006) sono risultati tutti non significativi. Complessivamente sono stati individuati 21 aplotipi, la loro distribuzione tra le popolazioni è riportata nella Tabella 3-8.

Il network di parsimonia statistica raffigurante le affinità tra gli aplotipi individuati è mostrato in Figura 3-6 B. Sono riscontrabili 5 raggruppamenti di aplotipi, separati l'un l'altro da almeno due sostituzioni nucleotidiche. La frequenza degli aplogruppi principali osservata in ogni sito di campionamento è rappresentata geograficamente in Figura 3-6. L'aplogruppo G,

che è costituito da un aplotipo molto frequente più altri tre marginali, si distribuisce nella parte settentrionale dell'areale del tritone: Appennino centro-settentrionale, Cilento e con minor frequenze Nord della Catena Costiera e Sila-greca. L'aplogruppo R ha una distribuzione geografica molto simile, mantenendo però frequenze complessivamente più basse, ad eccezione delle popolazioni della Sila-greca. L'aplogruppo H, sicuramente il più ricco di aplotipi, nella Figura 3-6 B è rappresentato con due colori per mettere in evidenza da un lato la sua distribuzione esclusiva nella Puglia, Lucania e Pollino con il sottogruppo HII e dall'altro la sua distribuzione tra le popolazioni più Meridionali della Calabria (dalla piana del Crati in giù) con il sottogruppo HI, che è anche, secondo la topologia del Network, il più distante da tutti gli altri. Infine gli aplotipi Q1 e W1 sono propri delle popolazioni della Catena Costiera e di Capo Vaticano. Interessante notare che le popolazioni del Nord della Catena Costiera sono quelle più ricche in termini di aplotipi, è infatti possibile osservare in un'unica popolazione aplotipi afferenti a tutti gli aplogruppi descritti ad eccezione di W, esclusivo di Capo Vaticano.

3.3.3 Fattore di crescita derivato dalle piastrine (Pdgfr).

Per 177 campioni analizzati si sono ottenute 354 sequenze di 619 Bp, con un totale di 36 siti polimorfici (di cui 35 utili ai fini della parsimonia). E' presente un'inserzione-delezione per una base azotata che è stata trattata come singolo polimorfismo. Con il metodo di Hudson e Kaplan (1985) si è riscontrato 1 evento di ricombinazione come numero minimo. Al contrario i test di ricombinazione di Bruen et al. (2006) sono risultati tutti non significativi. Complessivamente sono stati individuati 29 aplotipi, la loro distribuzione tra le popolazioni è riportata nella Tabella 3-8.

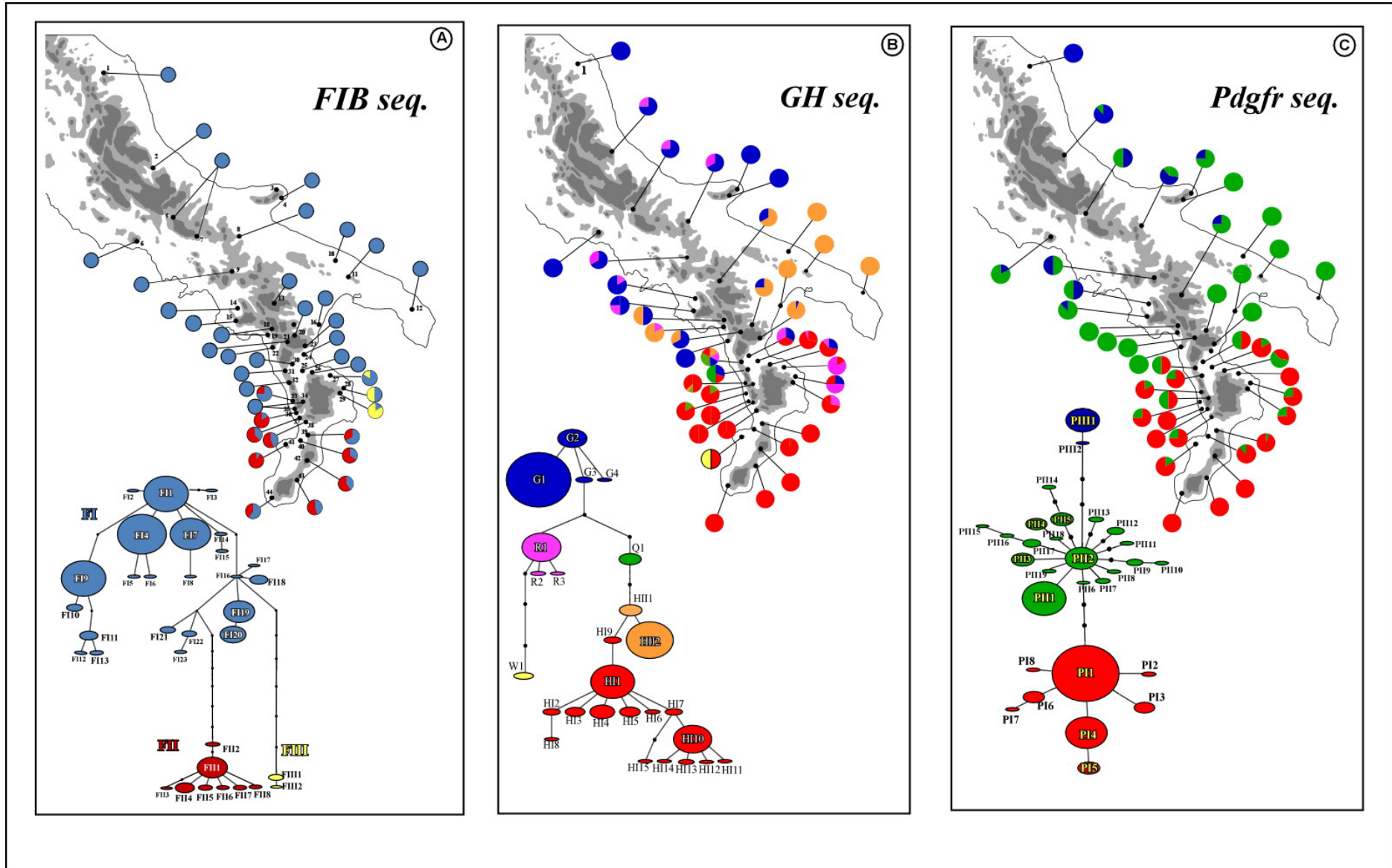
Il network di parsimonia statistica raffigurante le affinità tra gli aplotipi individuati è mostrato in Figura 3-6 C. Si possono riconoscere tre gruppi principali di aplotipi distanziati nel network di parsimonia per almeno tre sostituzioni nucleotidiche, PI, PII, PIII. La frequenza dei tre aplogruppi principali osservata in ogni sito di campionamento è rappresentata geograficamente in Figura 3-6. Il gruppo PIII che comprende due soli aplotipi, è presente nelle popolazioni degli Appennini centro-settentrionali fino ai monti del Cilento e della Lucania. Al contrario l'aplogruppo PII è caratterizzato da un gran numero di aplotipi differenti (n=19), anche relativamente molto distanziati nel network di parsimonia, ma che non hanno una chiara strutturazione geografica. Complessivamente il gruppo è presente, con frequenze diverse, in quasi tutto l'areale di distribuzione della specie: è esclusivo (con

frequenze massime) nelle popolazioni della fascia centrale, dalla Puglia al Pollino, per diminuire man mano ci spostiamo verso nord o verso sud, fino a scomparire nelle popolazioni situate alle estremità della Penisola. L'aplogruppo PI è caratteristico delle popolazioni meridionali, situate al di sotto della piana del Crati, dove è presente con frequenze molto alte.

Tabella 3-8: Distribuzione degli aplotipi di 3 marcatori nucleari di sequenza individuati nelle popolazioni di tritone italico (in parentesi è riportato il numero di osservazioni).

popolazione		aplotipi Fib	aplotipi Gh	aplotipi Pdgfr
App. nord	1	F17(4)	G1(4)	PIII1(2)
	2	F17(4), F19(6)	G1(6), R1(2)	PIII1(5),PII2(1)
Gargano	3		G1(6)	PII3(1), PII2(5)
	4	F17(6)	G1(6)	PIII1(2), PII3(4)
App. centrale	5	F17(4), F19(6)	G1(6), R1(2)	PIII1(2), PII3(1), PII2(1)
	6	F19(3), F118(3)	G1(12)	PII3(1), PII2(1), PII7(1), PIII1(1)
	7	F17(4), F19(3), F118(2), F18(1)		
	8	F17(6), F19(3), F118(1)	G1(4), R1(2)	PIII1(7), PII3(2), PII2(3)
	9	F17(1), F19(1)	G1(8), R1(4)	PIII1(6), PII3(4), PII2(2)
	10	F19(3), F11(9)	III2(12)	PII2(1), PII1(9)
Puglia	11	F19(4), F11(6)	III2(4)	PII17(1),PII1(3)
	12	F11(6)	III2(10)	PII1(6)
Lucania	13	F19(5), F11(3), FI23(1), F118(1)	G3(2), III1(1), III2(3)	PIII1(2), PII1(6)
Cilento	14	F17(8), F19(1), F114(2), FI2(1)	III1(1), III2(3)	PII4(2), PII5(2), PII2(2), PII13(1), PII12(5)
	15	FI4(1), FI7(4), F19(3), FI5(1), F118(2)	G1(8), R1(2)	PII2(1), PIII1(3), PII19(1), PII3(1), PII17(1), PII2(1)
Costa ionica	16	FI4(3), F11(5), FI23(1), FI22(2), FI21(1)	G1(2), G2(4), R1(2)	PIII1(1), PII19(1), PII3(1), PII15(1), PII2(1), PII8(1), PII11(2)
Pollino	17			
	18	FI4(4), FI7(2), F19(2), F118(2), FI10(2), FI22(2)	G2(2), III1(2)	PII5(2), PII2(2), PII17(1), PII16(2)
	19	FI4(4), FI10(4), FI22(2)	R1(1), III1(5)	PII8(1), PII17(2), PII2(1), PII5(1), PII4(1)
	20	FI4(1), FI1(3), FI6(2)	G2(1), G3(1), III1(3), III2(3)	PII13(1), PII14(1), PII5(2), PII4(2)
	21	FI4(2), FI9(4), FI1(5), FI10(2), FI17(1)	G2(3), G4(1), III(2)	PII14(1), PII2(1), PII1(6), PII5(1)
	22	FI4(4), FI7(2), FI21(1), FI16(1)	G2(4)	PII17(3), PII2(3), PII5(2)
	23	FI4(4), FI9(1), FI21(5)	G3(1), III2(7)	PII12(2), PII13(2), PII5(4)
	24	FI4(2), FI7(1), FI9(1)		
Piana Crati	25	FI4(8), FI1(2)	R2(2), III1(1), III3(1), III2(2), HI10(6), HI11(1), HI14(1)	PI1(2), PI4(4), PI5(7), PII4(2), PII1(1)
	26	FI4(5), FI1(2), FI11(3)	G2(2), R1(1), HI10(2), HI11(1)	PII1(5), PII9(1), PI4(1)
Sila greca	27	FI4(1), FIII1(2), FI11(9)	R3(1), R1(7), HI9(2)	PI1(14)
	28	FIII1(2), FI11(1), FI12(1)	R1(2), HI9(1), HI3(1)	PII9(1), PI1(3)
	29	FIII1(4), FI11(1), FIII2(1)	R1(4), HI1(1), HI3(5)	PII9(2), PI4(1), PI1(5)
	30	FI4(6), FI1(1), FI3(1)	G2(2), R1(2), HI19(2)	PI1(3), PI4(1), PI8(1), PII4(2), PII9(1), PII2(2)
Catena Costiera	31	FI4(4), FI13(2), FI5(2)	G2(1), Q1(2), R1(1), HI9(1), HI13(1)	PI1(2), PI4(1), PII4(2), PII9(1)
	32	FI4(3), FI1(1), FI20(4)	G2(3), Q1(5), HI10(1), HI13(1)	PI1(3), PI4(3), PII1(2),
	33	FI4(1), FI19(1), FI1(2), FI20(3), FI11(2), FI13(2), FII3(1)	Q1(1), HI9(1), HI1(4), HI3(1), HI5(1), HI2(1), HI10(1), HI13(1)	PI1(9), PI4(3), PII10(2),
	34	FI4(3), FI1(4), FI20(3)	Q1(1), HI1(2), HI8(1), HI10(1), HI12(1)	PI1(2), PI4(1), PI5(1), PII4(2), PII18(1), PII1(1)
	35	FI4(14), FI1(5), FI20(3)	Q1(2), HI1(3), HI5(5), HI10(2)	PI1(1), PI4(5), PII1(2)
	36	FI20(1), FII1(1), FII2(4)	HI1(1), HI5(1), HI2(1), HI10(3)	PI4(8), PI5(1), PI8(1)
	37	FII3(2) ,FI20(3), FII1(1), FII2(2)	HI5(3), HI2(2), HI10(5)	PI1(1), PI3(2), PI4(5), PI5(4)
	38	FII3(1), FII5(3), FI20(7), FII1(5)	HI1(7), HI10(9)	PI1(5), PI4(4), PI5(1), PII1(3), PII7(1)
Serre nord	39	FII3(2), FI19(12), FII1(1), FII8(3)	HI1(3), HI6(2), HI7(1)	PI1(7), PI4(3), PI7(1), PII2(1)
	40	FII3(6), FI19(5), FII1(2), FII6(1),	HI1(9), HI15(1)	PI6(6), PI7(1), PII7(1)
Capo Vaticano	41	FII3(1), FI19(1), FII5(2), FII1(4), FII6(2)	W1(8), HI1(5), HI7(1)	PI1(3), PI6(4), PI4(1), PI7(2)
Serre sud	42	FII3(2), FI19(4), FII1(3), FII8(1)	HI1(1), HI7(1)	PI1(3), PI6(3)
Aspromonte	43	FI19(9), FII1(7), FII7(4)	HI1(4), HI7(4)	PI1(8), PI2(3), PI3(1)
	44	FI19(6), FII1(4)	HI4(14)	PI1(1), PI3(9)

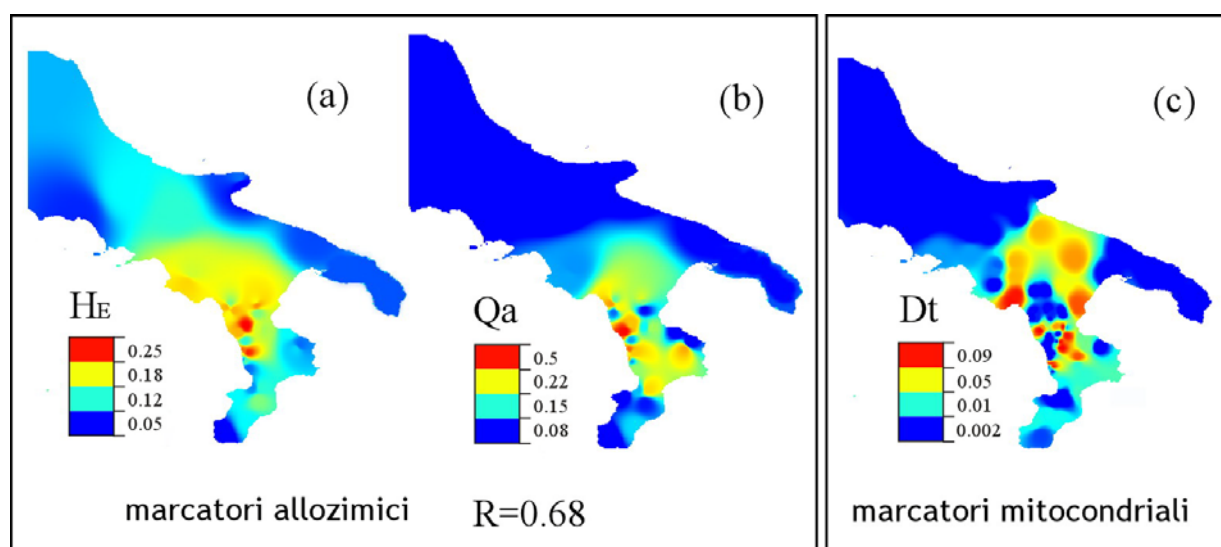
Figura 3-6: Networks di parsimonia statistica tra gli aplotipi dei 3 loci nucleari di sequenza e distribuzione geografica delle frequenze dei principali aplogruppi individuati nelle popolazioni. La dimensione degli aplotipi nel network è proporzionale al numero di osservazioni dell'aplotipo a livello dell'intero dataset. I cerchi piccoli rappresentano gli aplotipi intermedi, inferiti ma non trovati. A: beta-fibrinogeno (Fib); B: ormone della crescita (Gh); C: fattore di crescita derivato dalle piastrine (Pdgfr).



3.4 PAESAGGI GENETICI

Nella Figura 3-7 (a-b) sono riportate le interpolazioni geografiche degli indici di eteroziosi attesa (H_e) e di introgressione (Q_a) calcolate dall'analisi della variazione ai loci allozimici e implementate con il programma QuantumGis. La distribuzione geografica dei valori di diversità e di introgressione sono risultate correlate tra loro con un coefficiente di correlazione di Pearson pari a $R = 0,68$: sia l'*hotspot* di diversità che i valori più alti di introgressione sono localizzati nella Calabria settentrionale (principalmente Pollino e porzione nord della Catena Costiera). In Figura 3-7 (c) è riportata la distribuzione geografica dei valori di divergenza netta tra coppie di popolazioni D_t (Tamura e Nei 1993) ai loci mitocondriali di sequenza, calcolati con il software Mega, georeferenziati ai punti medi delle triangolazioni di Delanuy e interpolati geograficamente con il metodo della distanza inversa ponderata con il programma quantumGis. Le più importanti zone di discontinuità genetica corrispondono in linea generale alle maggiori aree di discontinuità geografica.

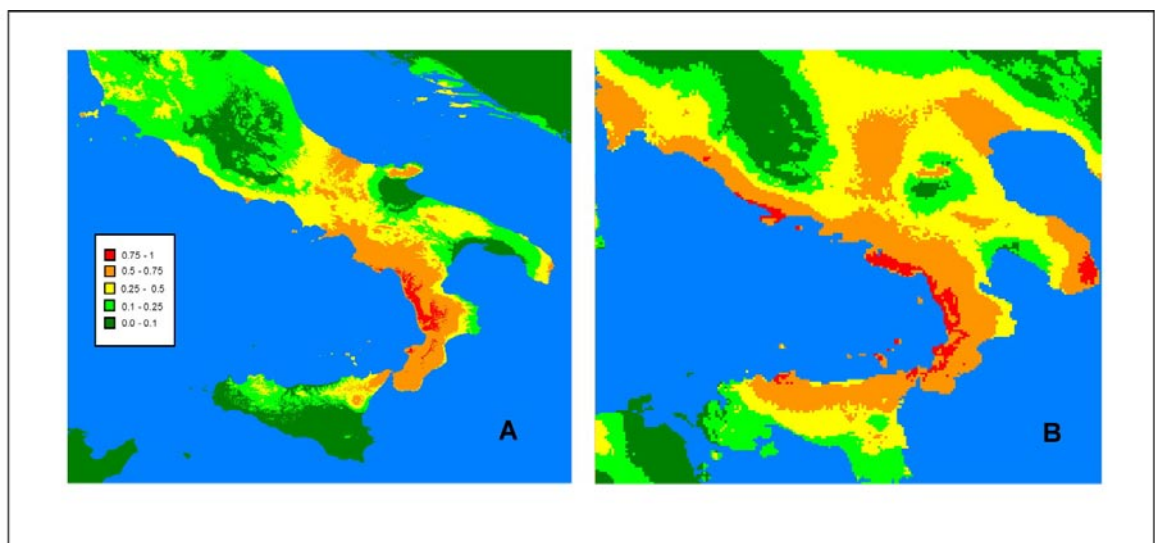
Figura 3-7: Paesaggi genetici. **(a)** Interpolazione geografica dei valori di eterozigosi attesa ai loci allozimici. **(b)** Interpolazione geografica dell'indice di introgressione Q_a ($Q_a = 1 - Q_{max}$) calcolato con Structure. E' riportato il coefficiente di correlazione di Pearson tra le due interpolazioni (a) e (b). **(c)** Divergenza genetica ai loci mitocondriali (Tamura e Nei 1993) interpolata geograficamente con il metodo *Genetic Landscape Shape* modificato.



3.5 MODELLIZZAZIONI DELLA DISTRIBUZIONE DELLA SPECIE

Con il programma Maxtent sono stati costruiti 5 modelli differenti utilizzando sia tutte le variabili fornite dal *database* sia selezionando quattro, cinque, nove o dodici variabili. Tutti i modelli hanno fornito dei risultati molto simili tra loro, tuttavia il modello a 5 variabili ha ottenuto il punteggio di AICc più basso nonché i valori migliori a tutte le altre stime fornite dal programma ENMtools (*model selection*; Warren et al., 2010), pertanto è stato scelto come modello ottimale. Le cinque variabili climatiche utilizzate per la modellizzazione sono state BIO5, BIO7, BIO15, BIO17, BIO19 (vedi Tabella 2-6) e si è ottenuto un modello con AUC di 0,856. La nicchia ecologica ottenuta, che ricalca bene l'areale di distribuzione della specie, è mostrata in Figura 3-8A. In Figura 3-8B sono riportate le proiezioni del modello ottenuto alle condizioni ambientali dell'ultimo massimo glaciale. Confrontando le Figura 3-8 A e B è possibile osservare come l'estensione della nicchia ecologica potenziale del tritone italiano sembra sia stata maggiore durante questa fase climatica estrema (LGM) rispetto alla situazione odierna. Aree climaticamente idonee, oltre a quelle attuali, sono osservabili a nord-ovest lungo la costa tirrenica, a sud, in Sicilia, ad est in Puglia e infine ad nord-est verso l'Albania, nella fascia di terra emersa che presumibilmente in quel periodo connetteva la nostra penisola ai balcani. Pertanto non si sono riscontrate barriere climatiche importanti nell'area di distribuzione di *L. italicus*.

Figura 3-8: **A:** Idoneità bioclimatica attuale secondo il modello basato su 5 variabili costruito con Maxtent (Phillips et al. 2006). **B:** Proiezione del modello alle condizioni climatiche dell'ultimo glaciale (dati MIROC). I differenti colori rappresentano distinti range di probabilità di occorrenza della specie, come mostrato nella legenda.



4 DISCUSSIONE

I livelli di variabilità genetica riscontrati nelle popolazioni del tritone italiano a tutti i loci studiati sono in media tra i più alti osservati negli anfibi urodeli della Penisola Italiana e, a nostra conoscenza, del Paleartico. Ai loci allozimici sono stati osservati livelli di eterozigosi attesa H_e (Nei, 1978) in media pari a 0.14, dato che di gran lunga supera quello medio calcolato da Nevo e Beiles (1991) per i Salamandridae (0.06). I livelli di diversità più alti si sono osservati nei popolamenti situati nella porzione centro-meridionale dell'areale della specie (Cilento- Pollino- Piana del Crati- Serre nord), livelli che diminuiscono fino a valori bassi spostandosi lungo gli estremi nord, sud ed est dell'areale. Dallo studio della variazione dei loci nucleari di sequenza si è riscontrato un marcato polimorfismo in tutte e tre le regioni esaminate con un pattern di distribuzione della diversità nucleotidica simile a quello osservato con i sistemi gene-enzima. Si tratta infatti di marcatori generalmente poco variabili ma specialmente con assetti non chiari anche in specie o gruppi di specie che presentano livelli alti di strutturazione ai loci mitocondriali e allozimici (vedi ad esempio il caso di *Lissotriton helveticus*, Recuero e Garcia-Paris, 2006; oppure il genere *Podarcis* nella penisola Iberica e nel Nord Africa, Pinho et al., 2008; o anche il genere *Salamandrina* in Italia, Hauswaldt et al. 2011; Mattoccia et al. 2001) ma che nel tritone italiano assumono un'inconsueta strutturazione, con un pattern di divergenza tra gruppi chiaro e correlabile con la geografia. Alti livelli di diversità sono osservabili anche analizzando i marcatori mitocondriali dove era già emersa dalle investigazioni di Canestrelli et al (2011) una complessa strutturazione geografica, dato che è stato confermato dai nostri risultati: sono presenti 65 aplotipi differenti cumulabili in 10 distinti aplogruppi terminali con alti valori di divergenza genetica tra gruppi. Tutto ciò appare sorprendente per almeno due ragioni 1) L'idea che le specie con un areale ristretto e una distribuzione continua (come il caso del tritone italiano) generalmente mostrano bassi valori di variazione intraspecifica è generalmente accettata: già nel 1859 Charles Darwin ipotizzava come le specie comuni e diffuse con ampi areali di distribuzione variano molto, e la letteratura successiva ha generalmente confermato questa ipotesi (ad es. Stebbins 1942; Nevo et al. 1984; Hamrick & Godt 1989; Frankham 1996; Gitzendanner & Soltis 2000), sebbene siano state trovate diverse eccezioni nel tempo (ad es. e.g. Lewis & Crawford, 1995; Derieg et al., 2008; Canestrelli et al., 2010). 2) La forte frammentazione e lo scarso rimescolamento evidenziati nelle popolazioni di *L. italicus* negli studi preliminari (Canestrelli et al. 2011) ai marcatori mitocondriali, confermata dai nostri risultati, indica

che gran parte della variazione complessiva è da attribuire alle differenze tra gruppi di popolazioni; questo dato è solo in parte supportato dallo screening dei loci nucleari, infatti a questi loci esiste un'importante componente intrapopolazionale, osservabile dalla presenza di un significativo numero di popolazioni con elevati tassi di eterozigosi attesi. Anche l'analisi della varianza mette in luce questa apparente discrepanza tra loci: mentre ai loci mitocondriali circa il 92% della variazione è spiegata dalle differenze tra gruppi, agli allozimi solo un 45% di variazione è spiegata da differenze tra gruppi mentre una componente pari al 44% della variazione è spiegata dalle differenze all'interno delle popolazioni.

Pertanto nella discussione che segue utilizzeremo i risultati ottenuti dall'analisi delle differenti classi di marcatori per ricostruire la storia evolutiva del tritone italico e per rispondere alle seguenti due domande: perché tanta diversità? Perché ai loci nucleari esiste elevata diversità all'interno delle popolazioni?

4.1 STORIA EVOLUTIVA DI *LISSOTRITON ITALICUS*

L'evento più antico che è possibile inferire sulla base dei dati riguardo la storia evolutiva del tritone italico è la frammentazione tra due linee evolutive principali, una meridionale (forma S) e una settentrionale (forma N). Lo screening della variazione genetica effettuata a tutti i marcatori nucleari e mitocondriali è concorde nell'individuare le due distinte linee evolutive e nel localizzare la sede della discontinuità filo-geografica all'incirca nell'area della piana del Crati-Sibari (figure 3-2; 3-5; 3-6). La stima del tempo di divergenza effettuata sulla variazione del DNA-mitocondriale indica nel Pleistocene inferiore o fine Pliocene l'origine della divergenza tra questi due cladi, datazione che al netto di un incremento significativo del campione e della comparsa di un ulteriore sub-clade, conferma quella già riportata da Canestrelli et al (2011). Tale periodo storico è stato caratterizzato da intensa attività tettonica nella porzione Nord della Calabria e da fasi di trasgressione marina che hanno interessato le principali pianure, in modo particolare quella del Crati-Sibari (Colella et al. 1987; Martini et al. 2001; Cucci 2004). Pertanto quest'area sembra aver agito come barriera alla dispersione per molte specie (vedi sez. 1.2.3 e riferimenti), ipotesi supportata anche da dati fossili (Caloi *et al.*, 1989; Figura 1-3).

Tuttavia esiste un'importante incongruenza tra i dati mitocondriali e quelli nucleari relativamente alle popolazioni distribuite nel massiccio del Pollino e lungo la piana del

fiume Crati. L'analisi mitocondriale ha rilevato per quest'area un clade E (a sua volta differenziato in due sub-cladi) appartenente alla linea evolutiva S circondato geograficamente da tutte popolazioni appartenenti alla linea N ad eccezione della porzione est della piana del Crati (popolamenti 26-27) dove è in parapatria con le popolazioni appartenenti al clade S (sub-clade B; Figura 3-5). Nel caso dei loci allozimici invece l'analisi sulla struttura delle popolazioni ha fornito per quest'area un raggruppamento insieme alle popolazioni Pugliesi (figura 3-3) e l'UPGMA individua le popolazioni di quest'area all'interno del clade N (figura 3-2). E' possibile fornire tre spiegazioni possibili a tale incongruenza. **1)** Assortimento incompleto di polimorfismi ancestrali condivisi (*incomplete lineage sorting*). Tale ipotesi sembra poco plausibile perché nel caso di forme aploipiche multiple di un antenato comune mantenute nelle linee evolutive discendenti, queste ci si aspetta siano distribuite a caso in tutto l'areale e non siano caratteristiche di aree geografiche precise in continuità con presunte zone di contatto secondario (McGuire et al, 2007). **2)** L'area di discontinuità filogeografica era localizzata più a nord e vi è stata un'estesa introgressione di alleli nucleari tipo N nell'area del Pollino e del fiume Crati a seguito di un contatto secondario. Questa ipotesi appare poco parsimoniosa in quanto implicherebbe che il segnale indipendente del genotipo multilocus di 14 loci allozimici e di almeno due dei loci nucleari di sequenza (tutti loci *unlinked*) sia meno rappresentativo di una singola sequenza di mtDNA nella storia evolutiva delle popolazioni di *L. italicus* (Funk e Omland, 2003; Avise, 2004; Ballard & Whitlock, 2004). Inoltre uno scenario di questo tipo difficilmente spiegherebbe la presenza di popolazioni di forma mitocondriale N distribuite più a sud del massiccio del Pollino come quelle della Catena Costiera. **3)** Antico contatto secondario tra le due forme evolutive e introgressione massiva di genoma mitocondriale della forma S nelle popolazioni dell'area del Pollino. Tale ipotesi è quella che a nostro avviso sembra essere la più plausibile anche perché è stato più volte mostrato come il DNA mitocondriale sia più incline all'introgressione rispetto a DNA nucleare anche tra linee evolutive molto differenziate o tra specie diverse (Ferris et al. 1983; Powell 1983; Sota and Vogler 2001; Doiron et al. 2002; Shaw 2002; Avise, 2004; Weisrock et al., 2005; Roca et al. 2005; Bachtrog et al. 2006; Canestrelli e Nascetti 2008).

Il pattern attuale della variazione del genoma mitocondriale indica che l'evento ibridazione sia relativamente antico, infatti il clade delle popolazioni introgredite (E) risulta differenziatosi dal gruppo A+B già a partire dal Pleistocene medio, pertanto l'evento di introgressione deve precedere tale differenziazione. Casi di introgressione profonda

dell'mtDNA piuttosto che al nuDNA sono stati frequentemente osservati (vedi revisione di Ballard & Whitlock, 2004) e diverse spiegazioni sono state date; queste implicano: vantaggi selettivi dovuti ad adattamenti locali nell'mtDNA, processi stocastici dovuti ad una taglia della Popolazione Effettiva (N_e) di almeno quattro volte inferiore al DNA mitocondriale rispetto al nuDNA, introgressione selettivamente favorita a seguito di un accumulo di mutazioni dannose (*mutational meltdown*) in popolazioni piccole. Difficile è discernere quali di queste spiegazioni sia più calzante nel caso del tritone italiano, tuttavia le ultime due sembrano particolarmente plausibili. Infatti i ripetuti cicli di insularizzazione che hanno interessato l'area Calabrese e la forte frammentazione a cui sono andate incontro le sue popolazioni (Canestrelli et al 2011) hanno probabilmente generato il contesto demografico opportuno per una introgressione selettiva che seguiva le fasi di regressione del livello del mare e il ripristino di contatti secondari tra le popolazioni.

Anche lo studio del pattern di variazione ai loci nucleari supporta l'ipotesi di un antico contatto secondario tra le due linee principali e di flusso genico conseguente. Infatti analizzando con attenzione il pattern della variazione ai singoli loci nucleari, sia allozimici che di sequenza, è possibile osservare in diversi casi (*Gh*, *Pdgfr*, *Fib*, *Mdhp-2*, *Pgm-2*, *6Pgdh*, *PepB*, *Mdhp-1*, *Idh-2*) forme alleliche prevalenti o fissate in popolazioni di uno dei due cladi essere presenti a frequenze minori nell'area del clade opposto, ma di questa generalmente solo nei popolamenti più vicini alla presunta area di contatto. Questo fenomeno ripetuto a vari loci è indicazione del fatto che è possibile che le due forme evolutive abbiano largamente introgredito anche a livello nucleare durante le prime fasi di frammentazione e contatti secondari. Sono indicazione di flusso genetico anche alleli rari che sono presenti in popolazioni afferenti alle due linee evolutive (p.e. ai loci *Mdh-1*; *Gpi*). In linea generale il fenomeno di introgressione è possibile osservarlo in entrambe le direzioni N ed S, malgrado è risultato più comune il caso di alleli S introgredire nelle popolazioni della linea N, specialmente in quelle localizzate nella porzione nord della Catena Costiera o nel Pollino. Nei casi dei loci allozimici *Pepb*, *Pgm-2*, *Gpi*, *mdhp-1* le popolazioni appartenenti a queste due aree presentano l'intero polimorfismo allelico osservato con il sistema gene-enzima e possono essere considerate il *melting-pot* di diversità intraspecifica. Lo scenario descritto oltre ad essere compatibile con quello osservato ai loci mitocondriali è anch'esso indicazione di un'ibridazione introgressiva non recente. Infatti supponendo un'ibridazione recente, successiva all'ultimo ciclo glaciale, in un'area di contatto secondario estesa come quella che si osserva attualmente (Piana del

Crati Sibari e porzione sud della Catena Costiera) ci si aspetterebbe un andamento clinale del pattern di introgressione. Al contrario non è stata osservata alcuna variazione di tipo clinale e anche i popolamenti delle due forme che sono in vicinanza e continuità geografica sono risultati molto divergenti. Sono presenti infatti più casi in cui popolazioni vicine all'area di contatto secondario presentano frequenze di alleli "alloctoni" più basse rispetto a popolamenti localizzati anche molto lontano dalla zona di contatto (vedi figura 3-1). Tutto ciò è testimonianza del fatto che gli alleli sono introgrediti anticamente nelle diverse popolazioni e queste sono state abbastanza tempo al vaglio della deriva genica, cancellando le tracce dell'attesa variazione clinale. Inoltre considerate le basse capacità dispersive del genere *Lissotriton* (Warwick, 1949; Bell, 1977; Dolmen, 1981; Griffiths, 1984), tipiche di urodeli di piccole dimensioni, non sarebbe spiegabile l'esteso pattern di introgressione ai loci nucleari che abbiamo osservato se si considera un contatto secondario recente ovvero risalente a non più di qualche decina di migliaia di anni. Le analisi dei loci mitocondriali e nucleari sono concordi nell'individuare una prima fase di frammentazione nelle popolazioni di *L. italicus* risalente all'incirca all'inizio del Pleistocene a cui è seguita una fase di contatto secondario antica con flusso genico esteso; ma se analizziamo la distribuzione geografica attuale delle due linee evolutive, è facilmente osservabile che queste sono di nuovo in contatto secondario. Pertanto, l'unica ipotesi in grado di spiegare nel complesso l'attuale pattern della variabilità genetica a tutti i loci analizzati è l'esistenza di almeno due fasi distinte di contatto tra le due linee evolutive principali, un'antica, tale da precedere il comune antenore del clade sud, e una recente, successiva all'ultimo ciclo glaciale.

L'esito dei due contatti appare tuttavia essere stato opposto. Lo studio della collocazione geografica attuale delle diverse forme mitocondriali ci indica che c'è stata un'ultima fase di frammentazione nella storia evolutiva del tritone italiano risalente all'incirca all'ultimo ciclo glaciale: le popolazioni si sono frammentate in dieci unità evolutive distinte la cui distribuzione geografica è risultata chiaramente correlabile all'orografia dell'Italia peninsulare. A questa è seguita una seconda fase di contatto secondario, che è possibile osservare attualmente: l'analisi dei marcatori mitocondriali e lo studio del genotipo multilocus sono perfettamente concordi nell'individuare nella Piana del Crati Sibari e nella porzione sud della Catena Costiera la zona dove le due linee filitiche principali (S e N) si fronteggiano. Tuttavia, contrariamente a quanto precedentemente detto per il primo evento di contatto secondario ed ibridazione, non esiste nessuna evidenza di introgressione recente

o scambio genico attuale, né ai loci mitocondriali e né a quelli nucleari. Infatti, nel caso dello screening ai loci con eredità uniparentale, se consideriamo il clade E frutto di antica introgressione e quindi i suoi individui appartenenti alla linea evolutiva N, non sono stati osservati popolamenti dove aplotipi delle due forme si trovano in simpatria. L'analisi di flusso genico attuale sul genotipo multilocus, indica da un lato la quasi totale assenza di simpatria tra le due forme principali, ma anche l'assenza di individui che possono essere chiaramente identificati come ibridi. Infatti, tramite le simulazioni, l'analisi di flusso genico implementata con 14 loci allozimici polimorfici al netto delle divergenze esistenti, è stata valutata in grado di riconoscere con poca incertezza tra forme parentali e forme ibride nel loro complesso (confr. Vaha e Primmer, 2006). Solo 4 dei 239 campioni analizzati nei due transetti hanno dato un risultato che non è chiaramente raggruppabile in una forma parentale, ma non è neanche evidenza chiara di una forma ibrida, se si compara le loro probabilità posteriori a quelle degli ibridi che sono stati simulati. Il solo caso dell'individuo della popolazione di San Lucido identificato come appartenente alla linea S è indicatore di possibile simpatria tra le forme evolutive distinte; eventuale simpatria che però, come abbiamo visto, non ha dato luogo a un significativo rimescolamento genetico. Questa assenza di introgressione non è spiegabile con l'esistenza di discontinuità geografica o climatica tra le due forme attualmente presenti nell'area di contatto. Infatti popolazioni delle due forme N e S sono distribuite con continuità sia nella piana del Crati-Sibari e sia nell'area di contatto della Catena Costiera, e in più i nostri campionamenti sono stati effettuati in siti di riproduzione molto ravvicinati (meno di 10 Km di distanza). Anche la ricostruzione della nicchia climatica ci suggerisce che non c'è e non c'è stata, fin dall'ultimo massimo glaciale (momento in cui le due linee filetiche principali si suppone possano essere ritornate in contatto) alcuna discontinuità climatica importante all'interno dell'areale di distribuzione della specie. L'assenza di flusso genico attuale in popolazioni distribuite con continuità e in assenza di barriere estrinseche al flusso genico è evidenza di presenza di barriere intrinseche al flusso genico. Pertanto i nostri dati suggeriscono che le due forme, un tempo ampiamente in grado di scambiare geni, ad oggi non lo sono più.

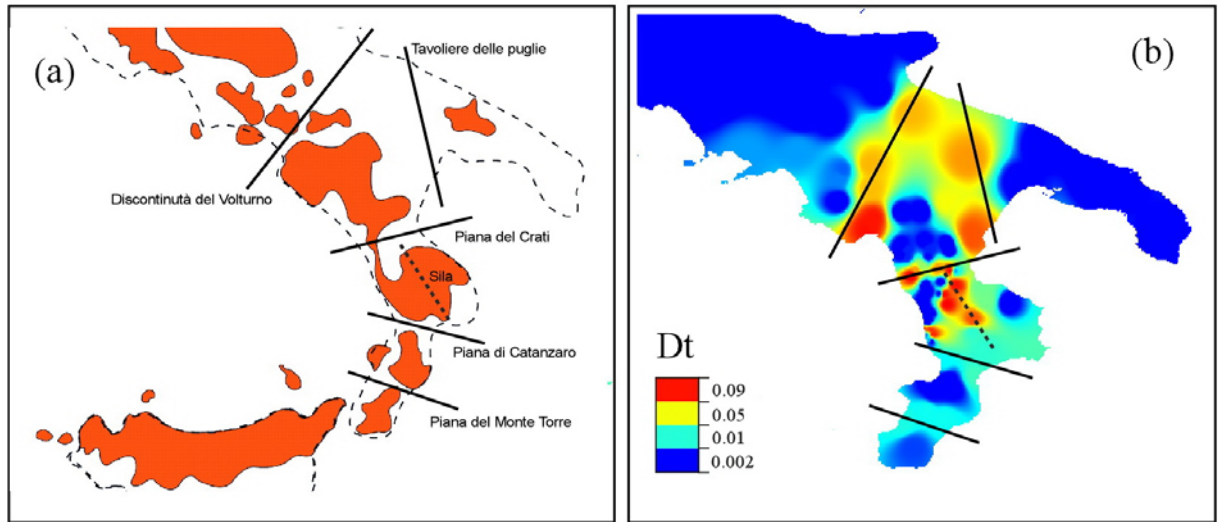
I dati da noi analizzati ci indicano che anche all'interno di entrambe le forme N e S sono presenti divergenze non trascurabili indicative di almeno due eventi di frammentazione, databili uno all'incirca nel medio Pleistocene ed uno nel tardo, come già evidenziato da Canestrelli et al. (2011). Le popolazioni appartenenti alla forma settentrionale sembrano aver passato l'ultimo ciclo glaciale in sei aree di rifugio distinte, in modo da accumulare

divergenze tali da riconoscere 6 cladi terminali al DNA mitocondriale, nella forma meridionale invece se ne riconoscono quattro (per una trattazione più precisa sulle zone di discontinuità e sulla filogeografia delle due forme si rimanda a Canestrelli et al. 2011). Anche in questo caso alla frammentazione è succeduta introgressione. Evidenze di contatti secondari e introgressione ai loci mitocondriali sono osservabili nelle popolazioni dove è possibile incontrare in simpatria individui di due sub-cladi distinti (cladi EI-CI, EII-CII, DI-DII; AI-AII). L'analisi sulla struttura delle popolazioni ai loci allozimici individua meno gruppi rispetto all'mtDNA, tuttavia se tra quest'ultimi consideriamo quei sub-cladi che è possibile trovare in simpatria come un singolo raggruppamento, i risultati sono quasi del tutto sovrapponibili. Infatti i popolamenti del Cilento sono raggruppati insieme a tutti quelli distribuiti più a Nord (cladi DI-DII), i popolamenti del Pollino si raggruppano insieme alla Puglia (cladi EI-CI), quelli della piana del Crati insieme alla Catena Costiera N (EII-CII) mentre quelli della porzione sud della Catena Costiera (AII-AIII) insieme alle Serre. Questa incongruenza/corrispondenza può essere spiegata ammettendo che (i) non è passato abbastanza tempo da permettere ai loci allozimici di divergere apprezzabilmente; (ii) il rimescolamento di geni a seguito del contatto secondario è stato abbastanza esteso da non lasciare evidenze di frammentazioni passate ai loci allozimici. Le due ipotesi non sono del tutto esclusive una dell'altra e con i dati a nostra disposizione risulta difficile discernere il contributo di una o dell'altra. Tuttavia evidenze chiare di rimescolamento ai loci allozimici ci vengono fornite tra i distinti cluster che è possibile inferire sulla base dell'UPGMA all'interno delle due forme N e S e dove l'analisi implementata con il software Structure individua livelli di introgressione in alcune occasioni anche molto alti (confr. le figure 3-1 e 3-2). Per esempio la popolazione di Due Uomini, la più a nord campionata in Catena Costiera, presenta probabilità Q di appartenere al gruppo GIII o GIV intermedie e quasi uguali, a testimonianza di esteso flusso genico tra popolazioni del Pollino e della Catena Costiera. Nel caso dei loci nucleari di sequenza, considerando separatamente le popolazioni appartenenti alle due linee evolutive N ed S, malgrado la variabilità nucleotidica sia risultata piuttosto alta, sono evidenziabili solo alcune divergenze chiare che possono essere riconducibili alle frammentazioni più profonde riscontrate all'mtDNA e datate nel Medio-Pleistocene. Infatti, mentre al *beta-fibrinogeno* è evidenziabile solo una netta strutturazione all'interno del clade S (tra le popolazioni della Sila greca e le restanti Serre-Aspromonte) al *Pdgfr* e *Gh* è osservabile solo quella all'interno del clade N (tra le popolazioni del Pollino- Lucania- Puglia e quelle dell'Appennino centro- settentrionale). Un pattern del genere, che ricalca solo in parte la

strutturazione osservata con gli altri loci non è del tutto inatteso. Infatti è stato bene accertato come i loci nucleari di sequenza hanno generalmente dei tassi di divergenza più lenti rispetto ai loci usati convenzionalmente in filogeografia (mtDNA, r-DNA ma anche allozimi; Hughes et al 2006). Inoltre taglie effettive delle popolazioni (N_e) più consistenti, assortimento non sempre completo di polimorfismi ancestrali (*incomplete lineage sorting*) e tassi di ricombinazione in genere più alti, possono rendere molto meno evidenti le tracce della struttura genetica delle popolazioni studiate con i loci nucleari a differenza di quelle con eredità uniparentale (vedi le revisioni di Zhang e Hewitt 2003; Brito e Edwards 2009).

Questo scenario descritto di cicli ripetuti di frammentazioni e contatti secondari durante tutto il Pleistocene, che ha caratterizzato la storia evolutiva di *L. italicus*, è per altro concorde con i dati esistenti sulla paleogeografia dell'area dove la specie è distribuita. Infatti, come più volte ricordato, l'Italia meridionale e in modo particolare la regione Calabrese, è andata incontro a eventi ripetuti di insularizzazione a causa delle trasgressioni marine delle fasi interglaciali, momento in cui differenti specie si sono frammentate, e al ristabilirsi di zone di contatto nei periodi glaciali quando, con la regressione del livello del mare, le paleo-isole si ricongiungevano al continente formando un'unica penisola e lasciando così possibilità di rimescolamento genetico (Confr. i paragrafi 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3. e 1.3.4 e riferimenti). Le aree principali di discontinuità genetica del tritone italico sono riconducibili alle maggiori piane che secondo le ricostruzioni paleogeografiche sono state inondate dal mare durante gli interglaciali (vedi Figura 4-1) e quindi hanno potuto agire da barriera alla dispersione per molte specie terrestri (confr. Figura 1-3). Solo la discontinuità genetica che può essere localizzata a grandi linee nel massiccio della Sila non supporta questo scenario. Con i dati a disposizione non sappiamo dove, perché e quando quest'area possa aver agito da barriera, in quanto anche le ricostruzioni bioclimatiche dell'ultimo massimo glaciale la individuano come idonea ad ospitare la specie in oggetto (vedi fig 3-8). Tuttavia le nostre numerose campagne di campionamenti non hanno mai osservato questa specie in Sila e ad oggi esiste un'unica segnalazione di un solo individuo qui rinvenuto peraltro di dubbia attribuzione tassonomica e non disponibile ad una verifica (Aloise G. *in verbis*).

Figura 4-1: Corrispondenza tra le zone di discontinuità geografica e le zone di discontinuità genetica in *L. italicus*. A) Ricostruzione dell'Italia meridionale durante le fasi interglaciali. B) Divergenza genetica ai loci mitocondriali (Tamura e Nei 1993) interpolata geograficamente con il metodo *Genetic Landscape Shape* modificato.



4.2 PRINCIPALI IMPLICAZIONI

La diversità genetica di una specie costituisce il suo potenziale evolutivo e adattativo (Reed e Frankham 2003), cioè la risorsa fondamentale per la persistenza a lungo termine delle sue popolazioni (Van Valen, 1973). Pertanto capire il contributo e il ruolo di distinti processi microevolutivi nella genesi di un *hotspot* di diversità genetica ha delle importanti implicazioni ecologiche, evolutive e di biologia della conservazione. Inoltre può aiutarci a far luce sui processi che possono contribuire alla nascita di *hotspot* anche a livello di biodiversità di specie (Martin & McKay 2004), nonché a comprendere i pattern d'interazione tra specie in queste aree (Thompson 2005). In questo modo si contribuisce a migliorare la nostra comprensione di quali processi abbiamo effettivamente necessità di preservare al fine di garantire una conservazione a lungo termine della ricchezza di biodiversità dei biota (Arnold 2006; Thompson 2005).

4.2.1 Genesi dell'hotspot di diversità genetica

La storia evolutiva del tritone italico supporta il ruolo preponderante dell'introggressione tra linee divergenti nella formazione dell'*hotspot* osservato di diversità. Infatti non esistono evidenti segnali in nessuna area geografica abitata dal tritone di ampie popolazioni stabili nel tempo (vedi anche la demografia storica di Canestrelli 2011). Piuttosto è emerso uno scenario di eventi ripetuti di frammentazione in diverse porzioni dell'areale della specie e durante tutto il quaternario. Generalmente quando si parla di frammentazione si mettono in risalto i processi di deriva genetica che determinano una diminuzione della diversità all'interno delle popolazioni oppure in alcuni casi anche l'aumento di divergenza tra le popolazioni che ne può conseguire (confr. Young et al 1996 e Templeton et al 1990). Ma la frammentazione, se osservata in una prospettiva storica, può essere un meccanismo con cui le specie incrementano la loro diversità (vedi per esempio Canestrelli et al. 2010), e la storia evolutiva del tritone italico ne è un esempio.

Le zone dove linee divergenti si sono incontrate e hanno scambiato geni corrispondono alle aree di maggior diversità genetica. È piuttosto noto che le popolazioni delle aree di contatto per effetto della condivisione di alleli derivanti da linee divergenti presentano valori di variabilità intra-popolazione maggiori rispetto alle popolazioni vicine e a quelle distribuite nelle altre parti dell'areale (vedi ad esempio Petit et al. 2003; Alexandrino et al, 2000; Sequeira et al 2005; Butlin e Hewitt, 1985; Hewitt, 1996). Ma l'aspetto sorprendente emerso dallo studio del tritone italico è che questo fenomeno è avvenuto più volte nel tempo e in varie zone geografiche differenti del ristretto areale della specie, determinando così un pattern diffuso di alti valori di variabilità genetica; pertanto non si tratta di un fenomeno marginale ma riguarda la quasi totalità dell'areale di distribuzione di questa specie. Un caso simile è quello del mammifero fossorio *Talpa romana* (Canestrelli et al, 2010), che ha un *range* di distribuzione analogo al tritone italiano: in questo caso solo le popolazioni Calabresi sono risultate quelle storicamente più frammentate e con livelli di diversità genetica nettamente superiori rispetto alle popolazioni distribuite a nord, le aree di discontinuità principali corrispondono a quelle osservate per il tritone; il popolamento dell'estremo sud (Aspromonte) però ha mostrato livelli relativamente alti di variabilità genetica a differenza di quelli osservati nel tritone, dove invece si sono riscontrati i valori più bassi. L'ipotesi degli autori della ricerca è che una popolazione sicula potrebbe aver scambiato geni con quella aspromontina durante le fasi di emersione dello stretto di

Messina nei periodi glaciali, dal momento che la presenza della talpa nell'isola è stata registrata fino al 1800. Nel caso del tritone italico invece non vi sono evidenze attuali né fossili di una sua presenza in Sicilia e pertanto i popolamenti dell'Aspromonte hanno avuto la possibilità di scambiare geni solo con quelli distribuiti più a nord. Anche la correlazione ottenuta tra la distribuzione geografica dell'eterozigosi attesa e il grado di introgressione conferma la nostra ipotesi di relazione diretta fra il flusso genico tra forme differenziate e il pattern di diversità genetica nel tritone italiano.

Solo recentemente il ruolo dei processi di frammentazione e flusso genetico sono stati messi in relazione con la nascita di un *hotspot* di diversità genetica (per esempio Canestrelli et al, 2010), tuttavia esiste ampia documentazione di aree di rifugi multipli dove divergenze storiche e successivi scambi di geni si sono verificati anche in più occasioni tra il Pliocene e il tardo Pleistocene. Uno scenario di questo tipo sta emergendo specialmente in aree che sono state storicamente influenzate dalle trasgressioni marine che hanno portato alla formazione di paleo-isole (per esempio Italia, Egeo, Baja California, Filippine) (Santucci et al. 1996; Riddle *et al.*, 2000; Papadopoulou *et al.*, 2009; Canestrelli *et al.*, 2010; Ravago-Gotanco & Juinio-Meñez, 2010) oppure in aree dove l'interazione tra il paleo-clima e la geomorfologia ha determinato cicliche frammentazioni degli habitat (per esempio Iberia, Australia, Nord America, Cina subtropicale) (Gómez & Lunt, 2007; Byrne *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Shafer *et al.*, 2010). La carenza di evidenze che supportano il ruolo di questi processi nella nascita degli hotspot di diversità possono essere riconducibili all'uso di marcatori genetici e/o a piani di campionamento non adeguati. Infatti inferenze sulla storia evolutiva di molte specie si basano su l'uso esclusivo di marcatori a eredità uniparentale (mtDNA e cpDNA), i più usati negli studi di filogeografia, i quali da soli spesso non sono in grado di far emergere le evidenze di ibridazione intraspecifica (Ballard & Whitlock 2004). Anche un campionamento poco rappresentativo, specialmente nelle aree di rifugio, spesso può mostrare solo una parte della variabilità di una specie. Il caso del tritone italiano è estremamente esemplificativo in questo senso. La variabilità genetica di questa specie è stata studiata già a partire dagli anni '80 e vari lavori sono stati pubblicati (Ragghianti et al., 1980; Bucci-Innocenti et al., 1986; Ragghianti & Wake, 1986; Cataudo et al., 2000) ma un quadro esaustivo del pattern di variabilità genetica ci viene fornito solo da Canestrelli et al nel 2011, con uno screening ai marcatori mitocondriali su un campionamento ben distribuito lungo tutto l'areale della specie. Tuttavia solamente lo studio qui presentato, con un set di marcatori eterogeneo (mtDNA,

nuDNA, e allozimi) su un campionamento a scala geografica fine, concentrato specialmente nel macro rifugio Calabrese, ha potuto risolvere la complessa storia evolutiva della specie e consentito di fare inferenze sui principali processi che hanno determinato la genesi dell'attuale *hotspot* di diversità. Tutto ciò ci lascia supporre che un pattern di questo tipo sia molto più diffuso di quanto precedentemente mostrato per molte specie e in diverse aree del pianeta. Infatti la frammentazione e l'ibridazione introgressiva possono aver giocato un ruolo preponderante in specie poco vagili e in contesti geografici tali da determinare periodi di isolamento e di contatti secondari, come per esempio paleoarcipelaghi, oppure attuali arcipelaghi un tempo continentalizzati, ma anche ambienti montani non a caso chiamati *sky island* dove, a seguito di cambiamenti climatici, l'habitat favorevole per alcune specie si contrae, si espande o si sposta lungo un gradiente altitudinale (Hewitt 1996, 2000, 2004a; Wiens 2004; Wiens & Graham 2005; Shepard e Burbrink 2008).

4.2.2 Presenza di due specie criptiche

Le popolazioni divergono e eventualmente diventano specie. In che momento di questo continuo processo di cambiamento una specie può essere considerata come due è una questione molto dibattuta tra i biologi evoluzionistici e tassonomi, fin dai tempi di Darwin con *l'Origine delle specie*. Non c'è infatti un accordo universale su come una specie deve essere definita, e diversi autori sostengono che si tratta di un "problema generale senza una generale soluzione" (Grant 1993; Coyne e Orr 2004). Tuttavia recentemente la maggior parte dei metodi usati per riconoscere due specie (vedi Sites e Marshall 2004 e riferimenti) si rifanno in linea di massima al concetto filogenetico di specie (de Queiroz 1998), e il dibattito si riduce a quanta divergenza è necessaria per giustificare lo *status* tassonomico di specie. Ma se due popolazioni possono essere considerate come specie in una fase iniziale quando sono diagnosticamente diverse, alternativamente e in maniera meno ambigua possono essere considerate come tali alla fine del processo di speciazione, quando sono completamente incapaci di scambiare geni (Dobzhansky 1935, Barton e Hewitt 1985, 1989). Quest'ultima alternativa ha il merito di essere il punto di non ritorno del processo di speciazione (Grant e Grant 2007). Comprese tra questi due estremi ci sono numerose situazioni di incroci occasionali senza che le popolazioni perdano la loro distintività; la speciazione è un processo e non un evento (Mayr 2004). Pertanto noi adottiamo il concetto biologico di specie (Wright 1940; Dobzhansky 1937; Mayr 1942; Coyne e Orr 2004) che

può essere estremamente sintetizzato con due frasi: due o più popolazioni appartengono alla stessa specie quando gli individui sono potenzialmente in grado di riprodursi senza perdita di fitness mentre sono da considerarsi due specie distinte quando sono riproduttivamente isolate, sia perché non si accoppiano e sia perché l'accoppiamento produce (o no) prole solo con fitness ridotta.

L'analisi sul flusso genico attuale suggerisce che le due linee evolutive di *Lissotriton italicus* attualmente rappresentano due specie distinte. Gli autori che hanno portato avanti lo studio preliminare ai loci mitocondriali (Canestrelli et al 2011) avevano osservato una profonda divergenza e la reciproca monofilia tra le due forme principali, caratteristiche considerate sufficienti e indispensabili per determinare due specie affini secondo il concetto filogenetico di specie (Baum and Shaw 1995; vedi anche Avise and Ball 1990), tuttavia avevano riservato estrema cautela non considerando l'mtDNA il marcatore adatto per studi di speciazione. Infatti è interessante notare che al netto di un incremento significativo del campionamento le due forme profondamente divergenti (dato confermato su tutti i loci studiati) non sono reciprocamente monofiletiche ai loci mitocondriali a causa di un'antica ibridazione introgressiva. Ma l'analisi del genotipo multilocus effettuata in due distinte zone di contatto indica in maniera molto chiara che le due forme non solo sono molto diverse geneticamente ma attualmente non sembrano essere in grado di scambiare geni. L'assenza di barriere geografiche o climatiche alla dispersione suggeriscono la presenza di barriere intrinseche al flusso genico. Pertanto la nostra ipotesi è che ci troviamo in una fase avanzata del processo di speciazione (Barton e Hewitt 1985; Grant e Grant 2007).

A nostro avviso, l'endemismo *Lissotriton italicus* può essere considerato un complesso di specie criptiche. La *forma S* è distribuita unicamente in Calabria centro-meridionale, a sud della piana del Crati-sibari e della porzione meridionale della Catena Costiera, mentre la *forma N* è distribuita nel resto dell'areale. Capire la natura dell'isolamento riproduttivo tra due specie parapatriche è una questione complessa e con i dati a disposizione non siamo in grado di inferire se avviene prima o dopo la copula ovvero se è dovuto ad incompatibilità fenotipica, genetica, ecologica o comportamentale. Soltanto studi mirati (di campo e di laboratorio) potranno consentire di testare la nostra ipotesi, riscontrare differenze morfologiche ed ecologiche tra le due specie e quindi valutare la natura dell'isolamento.

4.2.3 Aspetti conservazionistici

Il presente lavoro ha delle importanti implicazioni nell'ambito della biologia conservazionistica che possono essere inquadrare su tre piani differenti: la specie, i processi evolutivi e l'area di *hotspot*. Infatti innanzi tutto abbiamo potuto valutare cosa effettivamente è necessario conservare, riconoscendo due specie endemiche distinte e il loro *range* di distribuzione: le due specie meritano una gestione separata a fini conservazionistici (confr. Allendorf e Luikart 2007). All'interno di queste due specie criptiche abbiamo identificato anche gruppi di popolamenti (popolazioni) distinti geneticamente (ESU- *evolutionarily significant units*) su cui deve essere focalizzata l'attenzione al fine di massimizzare il potenziale evolutivo di ciascuna di esse e minimizzarne il rischio d'estinzione (Hughes et al 1997; Hilborn et al 2003; Luck et al 2003). Inoltre va curata la possibilità che queste popolazioni continuino a scambiare geni perché, come abbiamo visto, lo scambio è stato ed è lo strumento con cui le popolazioni hanno incrementato la loro diversità intraspecifica. E' noto che l'ibridazione può fornire materiale per adattamento e evoluzione (Arnold 1997) e portare ad una maggiore vitalità delle popolazioni (Hedrick 1995). Tuttavia l'ibridazione introgressiva in molti ambiti biologici è considerato un processo che va ridotto o evitato perché può disturbare l'adattamento locale, oppure incrementare l'omogeneità genetica, e eventualmente portare le specie all'estinzione (Rhymer e Simberloff 1996). Per esempio l'ibridazione tra specie selvatiche e la loro controparte domestica è considerata una delle più importanti minacce per le popolazioni naturali (per es. Oliveira et al 2008; Godinho et al 2011; confr. Simberloff 1996). Ciò nonostante, recenti lavori ci indicano che anche in casi di questo tipo il processo di ibridazione introgressiva può risultare in una inattesa sorgente di diversità genetica per specie selvatiche in via d'estinzione le quali mantengono in linea generale inalterato il loro pool genico (Anderson et al 2009). Un esempio è quello del lupo nord americano in cui l'ibridazione introgressiva con i cani domestici è stato un meccanismo con cui le popolazioni naturali fortemente minacciate hanno potuto adattarsi ad alcuni cambiamenti ambientali (Leonard e Wayne 2008; Anderson et al 2009). In ultima analisi i nostri risultati confermano il ruolo della regione calabrese come uno dei più importanti *hotspot* di diversità genetica dell'Italia peninsulare e di tutto il Paleoarctico. Quest'area ha agito da rifugio durante le fasi glaciali per molte specie animali e vegetali ma appare essere anche un'area di *melting pot* di diversità intraspecifica (Santucci et al. 1996; Podnar et al. 2005; Fritz et al 2005; Canestrelli et al. 2006, 2007b, 2008, 2010;

Canestrelli & Nascetti 2008; Barbanera et al. 2009; Vega et al. 2010), ed una fonte di endemismi (confr. Bilton et al 1998). Preservare quest'area significa quindi non solo conservare le riserve di diversità genetica per molte specie (per es. Canestrelli et al 2008) ma salvaguardare quei processi evolutivi in grado di forgiarne la diversità e quindi il potenziale adattativo. Sfortunatamente, malgrado una larga porzione di questa regione sia sotto tutela ambientale (parchi o aree protette), l'efficacia di questa protezione è in molti casi dubbia.

Ringraziamenti:

Ringrazio :

mia figlia Gaia e la mia compagna Mora, i miei genitori, i mie fratelli e mia nonna Maria perchè mi hanno supportato e sopportato, rendendo possibile il mio lavoro.

Il Dott. Canestrelli e il Prof. Nascetti per avermi offerto la possibilità di portare avanti questo lavoro, per avermi fornito gli strumenti per farlo, intellettuali e materiali, e per avermi dato fiducia.

Tutti coloro che a vario titolo e misura hanno messo a mia disposizione tempo, conoscenze e capacità, dando pazientemente riscontro alle mie richieste: Paola Arduino, Fabrizio Scialanca, Gaetano Aloise, Florinda Sacco, Paolo Cipriani, Valeria Pasqualini, Michela Maura, Daniele Salvi, Roberto Fucci, Daniele Porretta, Michela Paoletti e tutti/e del gruppo di ricerca del Prof. Nascetti e della Prof. Sandra Urbanelli.

L'amico e compagno di lavoro Francesco Spallone.

5 BIBLIOGRAFIA

- Akaike H, (1974), A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automatic Control AC*, **19** pp. 719–723.
- Alexandrino, J., E. Froufe, J. W. Arntzen, et al. (2000). Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* 9(6): 771-781.
- Allendorf F.W. & Utter F.M., (1979). Population genetics. In *Fish physiology*, edited by W.S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett. New York, *Academic Press*, 8:407-54.
- Allendorf F.W. and Luikart G. (2007). Conservation and the Genetics of populations. Blakwell Publishing, Oxford, UK.
- Amorosi A & S Milli (2001). Late Quaternary depositional architecture of Po and Tevere river deltas (Italy) and worldwide comparison with coeval deltaic successions. *Sedimentary Geology*, **144**, 357-375.
- Anderson, E. C. and E. A. Thompson (2002). A Model-Based Method for Identifying Species Hybrids Using Multilocus Genetic Data. *Genetics* **160**(3): 1217-1229.
- Anderson TM, von Holdt BM, Candille SI et al. (2009) Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science*, 323, 1339–1343.
- Arnaud JF, Viard F, Delescluse M, Cuguen J (2003) Evidence for gene flow via seed dispersal from crop to wild relatives in *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae): consequences for the release of genetically modified crop species with weedy lineages. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **270**, 1565–1571.
- Arnold M.L (1997). Natural hybridization and evolution Oxford, UK:Oxford University Press
- Arnold ML (2006). Evolution Through Genetic Exchange. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Avise JC (2004). Molecular Markers, Natural History, and Evolution, 2nd edn. Sinauer, Sunderland, MA.
- Avise, J. C., and R. M. Ball, Jr. (1990). Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 7:45–67.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.

- Babik W., Branicki W., CrnobrnjaIsailović J., Cogălniceanu D., Sas I., Olgun K., Poyarkov N.A., GarcíaParís M. and Arntzen J.W. (2005). Phylogeography of two European newt species discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology*, **14**, 2475-2491.
- Bachtrog, D., Thornton, K., Clark, A. and Andolfatto, P. (2006), Extensive introgression of mitochondrial dna relative to nuclear genes in the *drosophila yakuba* species group. *Evolution*, 60: 292–302.
- Ballard J. and Whitlock M. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**: 729-744.
- Barbanera F, Zuffi MA, Guerrini M et al. (2009) Molecular phylogeography of the asp viper *Vipera aspis* (Linnaeus,1758) in Italy: evidence for introgressive hybridization and mitochondrial DNA capture. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52, 103–114.
- Barra D., Romano P., Santo A., Campajola R., Roca V. and Tuniz C. (1996). The Versilian transgression in the Volturno River plain (Campania, Southern Italy). *Il Quaternario*, **9**,445–458.
- Barton, N. H. and G. M. Hewitt (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* Vol. 16, pp. 113-148
- Barton, N. H. and G. M. Hewitt (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* 341(6242): 497-503.
- Baum, D. A., and K. L. Shaw. (1995). Genealogical perspectives on the species problem. Pages 289–303 in *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* (P. C. Hoch, and A. G. Stephenson, eds.). Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Beaumont M, Barratt EM, Gottelli D *et al.* (2001) Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology*, **10**, 319–336.
- Bell, G. (1977). The life of the smooth newt (*Triturus vulgaris*) after metamorphosis. *Ecol. Monogr.* 47: 279–299.
- Bernasconi M., Corselli C. and Carobene L. (1997). A bank of the scleractinian coral *Cladocora caespitosa* in the Pleistocene of the Crati valley (Calabria, Southern Italy): growth versus environmental conditions. *Bollettino Società Paleontologica Italiana*, **36**, 5362.
- Berry O, Tocher MD, Sarre SD (2004). Can assignment tests measure dispersal? *Molecular Ecology*, **13**, 551–561.
- Bianco PG (1994) L'ittiofauna continentale dell'Appennino umbromarchigiano, barriera semipermeabile allo scambio di componenti primarie fra gli opposti versanti dell'Italia centrale. *Biogeographia*, **17**, 427-485.

- Bilton, D. T., P. M. Mirol, S. Mascheretti, K. Fredka, J. Zima et al. (1998). Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **265**(1402): 1219-1226.
- Böhme M., Fritz U., Kotenko T., Ljubisavljevi K., Tzankov N. and Berendonk T. (2007). Phylogeography and cryptic variation within the *Lacerta viridis* complex (Lacertidae, Reptilia). *Zoologica Scripta*, **36**, 119131.
- Bonfiglio L., Mangano G., Marra A., Masini F., Pavia M. and Petruso D. (2002). Pleistocene Calabrian and Sicilian bioprovinces. *Geobios*, **35**: 2939.
- Brewer G.J. & Sing C.F., (1970). An introduction to isozyme techniques. *Academic Press*.
- Brito, P. and S. Edwards (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* **135**(3): 439-455.
- Brouns G, De Wulf A, and Constales D, (2003). Delaunay triangulation algorithms useful for multibeam echosounding. *J Surv Eng* **129**:79–84.
- Bruen, T. C., H. Philippe, Bryant D. (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* **172**(4): 2665-2681.
- BucciInnocenti S., Ragghianti M. and Mancino G. (1983). Chromosome and Cheterochromatin polymorphisms in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Chromosoma*, **88**, 208215.
- Butlin RK, Hewitt GM. (1985). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae) I. Morphological and electrophoretic characters. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 269–285.
- Byrne M., Yeates D.K., Joseph L., Kearney M., Bowler J., Williams M.A.J., Cooper S., Donnellan S.C., Keogh J.S., Leys R., Melville J. Murphy D.J., Porch N. and Wyrwoll K.H. (2008). Birth of a biome: insights into the assembly and maintenance of the Australian arid zone biota. *Molecular Ecology*, **17**, 4398-4417.
- Caloi L., Malatesta A. and Palombo R. (1989). Biogeografia della Calabria meridionale durante il Quaternario. *Atti Accademia Peloritana dei Pericolanti Classe I, Scienze Matematiche Fisiche e Naturali*, **67**, 261–278.
- Canestrelli D., Cimmaruta R., Costantini V. and Nascetti G. (2006a). Genetic diversity and phylogeography of the Apennine yellow bellied toad *Bombina pachypus*, with implications for conservation. *Molecular Ecology*, **15**, 37413754.
- Canestrelli D., Zangari F. and Nascetti G. (2006b). Genetic evidence for two distinct species within the Italian endemic *Salamandrina terdigitata* (Bonnaterre, 1789)(Amphibia: Urodela: Salamandridae). *The Herpetological Journal*, **16**, 221227.

- Canestrelli, D., A. Verardi, G. Nascetti. (2007a). Genetic differentiation and history of populations of the Italian treefrog *Hyla intermedia*: lack of concordance between mitochondrial and nuclear markers. *Genetica* 130(3): 241-255.
- Canestrelli D., Cimmaruta R. and Nascetti G. (2007b). Phylogeography and historical demography of the Italian treefrog, *Hyla intermedia*, reveals multiple refugia, population expansions and secondary contacts within peninsular Italy. *Molecular Ecology*, 16, 48084821.
- Canestrelli D. and Nascetti G. (2008). Phylogeography of the pool frog *Rana* (*Pelophylax*) *lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear– mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography*, 35, 19231936.
- Canestrelli D., Cimmaruta R. and Nascetti G. (2008). Population genetic structure and diversity of the Apennine endemic stream frog, *Rana italica*—insights on the Pleistocene evolutionary history of the Italian peninsular biota. *Molecular Ecology*, 17, 38563872.
- Canestrelli D., Aloise G., Cecchetti S. and Nascetti G. (2010). Birth of a hotspot of intraspecific genetic diversity: notes from the underground. *Molecular Ecology*, 19, 54325451.
- Canestrelli, D., F. Sacco, G. Nascetti (2011). On glacial refugia, genetic diversity, and microevolutionary processes: deep phylogeographical structure in the endemic newt *Lissotriton italicus*. *Biological Journal of the Linnean Society*. 105(1): 42–55,
- Castiglia R, Annesi F, Aloise G, Amori G. (2008). Systematics of the *Microtus savii* complex (Rodentia, Cricetidae) via mitochondrial DNA analysis: paraphyly and pattern of sex chromosome evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1157–1164.
- Carboni MG, Bergamini L, Di Bella L, Landini B, Mandra L & P Vesica (2005) Late Quaternary paleoclimatic and paleoenvironmental changes in the Tyrrhenian Sea. *Quaternary Science Reviews*, 24, 2069–2082.
- Carminati E, Doglioni C (2005) Mediterranean Geodynamics, Encyclopedia of Geology (Selley RC, Cocks LRM, Plimer IR eds), Elsevier, 135-146
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*, 323, 785–789.
- Cataudo A., Scillitani G., Picariello O., (2000) Variazione genica nel tritone italico, *Triturus italicus*, della Calabria. In: Giacomini D. (Ed.); *Atti I Congr. Naz. SHI*, Mus. Reg. Sci. Nat., Torino, 821 pp.
- Cavalli-Sforza L.L. (1969). Human Diversity. Proc. 12th Int. Cong. Genet., Tokyo, Vol 3:405-416
- Cegelski CC, Waits LP, Anderson NJ (2003). Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. *Molecular Ecology*, 12, 2907–2918.

- Chan, K. M. A. and S. A. Levin (2005). Leaky prezygotic isolation and porous genomes: Rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution* **59**(4): 720-729.
- Chiocci F., Ercilla G. and Torre J. (1997). Stratal architecture of Western Mediterranean Margins as the result of the stacking of Quaternary lowstand deposits below 'glacioeustatic fluctuation baselevel'. *Sedimentary Geology*, **112**, 195-217.
- Clement M., Posada D. and Crandall K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1659.
- Coates D. J., Carstairs S., Hamley V. L. (2003). Evolutionary patterns and genetic structure in localized and widespread species in the *Stylidium caricifolium* complex (Stylidiaceae). *American Journal of Botany* **90**: 997-1008.
- Corander J. and Marttinen P. (2006). Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology*, **15**, 2833-2843.
- Coyne, J. A. and H. A. Orr. (2004). *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Crowley TJ (2002) Cycles, cycles everywhere. *Science*, **295**, 1473-1474.
- Cucci L. (2004). Raised marine terraces in the Northern Calabrian Arc (Southern Italy): a ~ 600 kyr long geological record of regional uplift. *Annals of Geophysics*, **47**, 1391-1406.
- Curat M, Ruedi M, Petit RJ, Excoffier L (2008). The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution*, **62**, 1908-1920.
- Currie DJ, Mittelbach GG, Cornell HV, Field R, Guegan JF, Hawkins BA, Kaufman DM, Kerr JT, Oberdorff T, O'Brien E, Turner JRG (2004) Predictions and tests of climate-based hypotheses of broad-scale variation in taxonomic richness. *Ecology Letters* **7**:1121-1134
- Darwin C. (1859) *Origin of the Species*, London: John Murray, 502 pp.
- Derieg N.J., Sangaumphai A. and Brueckerle L.P. (2008). Genetic diversity and endemism in North American *Carex* section *Ceratocystis* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, **95**, 1287-1296.
- Dobzhansky, T. (1935) A critique of the species concept in biology. *Phil. Sci.* **2**, 344-345.
- Dobzhansky, T. (1937) *Genetics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Dolmen, D. (1981). Local migration, rheotaxis and philopatry by *Triturus vulgaris* within a locality in central Norway. *Br. J. Herpetol.* **6**: 151-158.
- Doyle J. and Doyle J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, **19**, 1115.
- Drummond A., Ho S., Phillips M. and Rambaut A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, **4**, 699.
- Drummond AJ, Rambaut A (2006) BEAST (version 1.4). University of Oxford, Oxford, UK.

- Drummond, A. and A. Rambaut (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7(1): 214.
- Drummond AJ, Ho SYW, Rawlence N, Rambaut A. (2007). *A rough guide to BEAST*. ••: Department of Computer Science, The University of Auckland. Available at: http://beast-mcmc.googlecode.com/files/BEAST14_Manual_6July2007.pdf
- Excoffier L., Smouse P.E. and Quattro J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Excoffier L., Laval G. and Schneider S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, **1**, 47.
- Farris J.S., Källersjö M., Kluge A.G. and Bult C. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**, 315–319.
- Ferris, S., R. Sage, C. Huang, J. Nielsen, U. Ritte, and A. Wilson. (1983). Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2290–2294
- Fickel J, Hauffe HC, Pecchioli E, Soriguer R, Vapa L, Pitra C (2008) Cladogenesis of the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *European Journal of Wildlife Research* 54:495-510
- Flot, J.-F., A. Tillier, et al. (2006). Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions. *Molecular Ecology Notes* **6**(3): 627-630.
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, **10**, 1500–1508.
- Fritz U, Fattizzo T, Guicking D, Tripepi S, Pennisi MG, Lenk P, Joger U, Wink M (2005) A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Zoologica Scripta* 34:351-371
- Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**, 397–423.
- Gelman, A., Carlin, D. B., Stern, H. S. & Rubin, D. B. (1995). *Bayesian data analysis*, London: Chapman & Hall.
- Ghinassi M, Magi M, Sagri M & BS Singer (2004) Arid climate 2.5 Ma in the Plio-Pleistocene Valdarno Basin (Northern Apennines, Italy). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **207**, 37– 57.
- Ghisetti F. (1979). Evoluzione neotettonica dei principali sistemi di faglie della Calabria centrale. *Bollettino della Società Geologica Italiana*, **98**, 387–430.

- Ghisetti F. (1981). L'evoluzione strutturale del bacino pliopleistocenico di Reggio Calabria nel quadro geodinamico dell'arco calabro. *Bollettino Geologico Italiano*, **100**, 433–466.
- Giacoma C. and Balletto E. (1988). Phylogeny of the salamandrid genus *Triturus*. *Italian Journal of Zoology*, **55**, 337–358.
- Giacoma C, Picariello O, Puntillo D, Rossi F, Tripepi S (1988) The distribution and habitats of the newt (*Triturus*, *Amphibia*) in Calabria (Southern Italy). *Monit Zool Ital* 22(NS):449–464
- Giovannotti M., Nisi Cerioni P., Kalboussi M., Aprea G. and Caputo V. (2007). Phylogeographic inferences from the mtDNA variation of the threetoed skink, *Chalcides chalcides* (Reptilia: Scincidae). *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution*, **308**, 3–297.
- Giraudi C (2004) The Apennine glaciations in Italy. In: *Quaternary Glaciations -Extent and Chronology, Part I: Europe. Developments in Quaternary Science* (Ehlers J & PL Gibbard eds) Vol. 2a. Amsterdam, Elsevier Science.
- Gitzendanner M. A., Soltis P. S. (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783–792.
- Grant, P.R. (1993). Hybridization of Darwin's finches on Isla Daphne Major, Galapagos. *Philos. Trans. Royal Soc. London, Series B* 340: 127–139.
- Grant PR, Grant BR (2007) How and Why Species Multiply: The Radiation of Darwin's Finches. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Griffiths, R. A. (1984). Seasonal behaviour and intrahabitat movements in an urban population of smooth newts, *Triturus vulgaris* (Amphibia: Salamandridae). *J. Zool. Lond.* 203: 241–251.
- Grill, A., G. Amori, Aloise, Lisi, Tosi, Wauters, Randi. (2009). Molecular phylogeography of European *Sciurus vulgaris*: refuge within refugia? *Molecular Ecology* **18**(12): 2687–2699.
- Gonçalves H., MartínezSolano I., Pereira R., Carvalho B., GarcíaParís M. and Ferrand N. (2009). High levels of population subdivision in a morphologically conserved Mediterranean toad (*Alytes cisternasii*) result from recent, multiple refugia: evidence from mtDNA, microsatellites and nuclear genealogies. *Molecular Ecology*, **18**, 5143–5160.
- Gómez A. and Lunt D. (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography in Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity*. pp. 155–188.
- Goossens B, Funk SM, Vidal C *et al.* (2002) Measuring genetic diversity in translocation programmes: principles and application to a chimpanzee release project. *Animal Conservation*, **5**, 225–236.

- Guarino F., Caputo V. and Angelini F. (1992). The reproductive cycle of the newt *Triturus italicus*. *Amphibia-Reptilia*, **12**, 121-133.
- Guindon S., Gascuel O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 52(5):696-704.
- Hamrick JL, Godt MJ (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43–63. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Harris H., & Hopkinson D.A., (1976) *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. North-Holland, Amsterdam.
- Hasumi, H. and S. Emori, (2004): K-1 Coupled Model (MIROC) Description. K-1 technical report, Center for Climate System Research, University of Tokyo, 34 pp.
- Hauswaldt, J. S., C. Angelini, A. Pollok, S. Steinfartz. (2011). Hybridization of two ancient salamander lineages: molecular evidence for endemic spectacled salamanders on the Apennine peninsula. *Journal of Zoology* 284(4): 248-256.
- Hedrick P.W (1995) Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study *Conserv. Biol* 9 996–1007.
- Heuertz M, Carnevale S, Fineschi S, Sebastiani F, Hausman JF, Paule L, Vendramin GG (2006) Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology* 15:2131-2140
- Hewitt G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Postglacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 87–112.
- Hewitt G.M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Hewitt G.M. (2004a). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. Series B: Biological Sciences, **359**, 183.
- Hewitt G.M. (2004b). The structure of biodiversity—insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, **1**, 174-299.
- Hewitt, G. M. (2011). Mediterranean Peninsulas: The Evolution of Hotspots. Biodiversity Hotspots. F. E. Zachos and J. C. Habel, Springer Berlin Heidelberg: 123-147.
- Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, 167, 747–760.

- Heyer W., Donnelly M., McDiarmid R., Hayek L.C. and Foster M.S. (1994). Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Inst. Press, Washington & London.
- Hilborn, R., T. P. Quinn, et al. (2003). Biocomplexity and fisheries sustainability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(11): 6564-6568.
- Hofman, S., C. Spolsky, T. Uzzell, D. Cogalniceanu, W. Babik and J. M. Szymura (2007). Phylogeography of the fire-bellied toads *Bombina*: independent Pleistocene histories inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Ecology* 16(11): 2301-2316.
- Hughes, C. E., R. J. Eastwood, D. Bailey (2006). From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361(1465): 211-225.
- Hughes, J. B., G. C. Daily, et al. (1997). Population Diversity: Its Extent and Extinction. *Science* 278 (5338): 689-692.
- Hourlay F, Libois R, D'Amico F, Sara M, O'Halloran J, Michaux JR (2008) Evidence of a highly complex phylogeographic structure on a specialist river bird species, the dipper (*Cinclus cinclus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:435-444
- Hudson RR, Kaplan NL (1985). Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics* 1985, 111:147-164.
- Huson, D. H. and D. Bryant (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23(2): 254-267..
- Joger U, Fritz U, Guicking D, Kalyabina-Hauf S, Nagy ZT, Wink M (2007) Phylogeography of western Palaearctic reptiles - Spatial and temporal speciation patterns. *Zoologischer Anzeiger* 246:293–313
- Jolivet L, Augier R, Robin C, Suc J-P, Rouchy JM (2006) Lithospheric-scale geodynamic context of the Messinian salinity crisis. *Sedimentary Geology* 188-189:9-33
- IUCN (1996). IUCN red list of threatened animals. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Lanza B. (1983). Anfibi, Rettili (Amphibia, Reptilia). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, 27.
- Leonard, J. A. and R. K. Wayne (2008). Native Great Lakes wolves were not restored. *Biology Letters* 4(1): 95-98.
- Lewis P.O. and Crawford D.J. (1995) . Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*, 82, 1411-49.

- Librado P. and Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451.
- Lowe JJ, Accorsi CA, Bandini Mozzanti M, Bishop A, Van Der Kaars S, Forlani L, Mercuri AM, Rivalenti C, Torri P & C Watson (1996) Pollen stratigraphy of sediment sequences from lakes Albano and Nemi (near Rome) and from the central Adriatic, spanning the interval from oxygen isotope Stage 2 to present day. *Memorie dell' istituto italiano di idrobiologia*, **55**, 71-98.
- Lu H, von Huissteden K, Zhou J, Vandenberghe J, Liu X & Z An (2000) Variability of east asian winter monsoon in Quaternary climatic extremes in north China. *Quaternary Research*, **54**, 321–327.
- Luck, G. W., G. C. Daily, Ehrlich (2003). Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology & Evolution* 18(7): 331-336.
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D et al. (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology*, **89**, S108–S122.
- Magri D (1999) Late Quaternary vegetation history at Lagaccione near Lago di Bolsena (central Italy). *Review of Palaeobotany and Palynology*, **106**, 171– 208.
- Magri D. (2008). Patterns of post glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *Journal of Biogeography*, **35**, 450-463.
- Martin PR, McKay JK (2004) Latitudinal variation in genetic divergence of populations and the potential for future speciation. *Evolution*, **58**, 938–945.
- Martínez-Solano I., Teixeira J., Buckley D. and GarcíaParís M. (2006). Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology*, **15**, 3375-3388.
- Martini IP, Sagri M, Colella A (2001) Neogene-Quaternary basins of the inner Apennines and Calabria arc. In: Anatomy of an Orogen: The Apennines and Adjacent Mediterranean Basins (eds Martini IP, Vai GB), pp. 375–400. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mattoccia, M., S. Marta, A. Romano, V. Sbordoni (2011). Phylogeography of an Italian endemic salamander (genus *Salamandrina*): glacial refugia, postglacial expansions, and secondary contact. *Biological Journal of the Linnean Society* 104(4): 903-992.
- Mayr E. (1942) Systematics and the origin of species. New York: Columbia University Press.
- Mayr E. (2004) What makes biology unique. Cambridge: Cambridge University Press.
- McCarthy C., (1998-2005). *Chromas*; Technelysium Pty. Ltd., www.technelysium.com

- McGuire JA, Linkem CW, Koo MS et al. (2007) Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards. *Evolution*, 61, 2879–2897.
- Miller MP (2005) Alleles In Space: computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, **96**, 722-724.
- Mittermeier RA, Mittermeier CG, Brooks TM, Pilgrim JD, Konstant WR, da Fonseca GAB, Kormos C (2003) Wilderness and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10309-10313
- Moretti M., P. Pieri, G. Ricchetti, L. Spalluto (2011) Note Illustrative della Carta Geologica d'Italia, foglio 396; San Severo. ISPRA. 148 pag
- Myers N., Mittermeier R., Mittermeier C., da Fonseca G. and Kent J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858.
- Nadachowska, K. and W. Babik (2009). Divergence in the Face of Gene Flow: The Case of Two Newts (Amphibia: Salamandridae). *Molecular Biology and Evolution* **26**(4): 829-841.
- Nascetti G., F. Zangari and D. Canestrelli (2005). The spectacled salamanders, *Salamandrina terdigitata* (Lacépède, 1788) and *S. perspicillata* (Savi, 1821): 1) genetic differentiation and evolutionary history. *Rendiconti Lincei: Scienze Fisiche e Naturali*, **16**, 159-169.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Nei M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., F. Tajima, Y. Tateno (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* **19**(2): 153-170.
- Nevo, E. and A. Beiles (1991). Genetic diversity and ecological heterogeneity in amphibian evolution. *Copeia* **1991**(3): 565-592.
- Nevo E, Beiles A, Ben-Shlomo R (1984) The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. In: Lecture Notes in Biomathematics, Vol. 53: Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity (ed. Mani GS), pp. 13–213. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Nieberding C, Libois R, Douady CJ, Morand S, Michaux JR (2005) Phylogeography of a nematode (*Heligmosomoides polygyrus*) in the western Palearctic region: persistence of northern cryptic populations during ice ages? *Molecular Ecology* 14:765-779
- Nielsen, E. E., L. A. Bach, et al. (2006). Hybridlab (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes* **6**(4): 971-973.

- Nielsen EE, Hansen MM, Back L (2001) Looking for a needle in a haystack: discovery of indigenous salmon in heavily stocked populations. *Conservation Genetics*, **2**, 219–232.
- Nielsen R, Wakeley J (2001) Distinguishing migration from isolation. A Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, **158**, 885–896.
- Oliveira, R., R. Godinho, et al. (2008). Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conservation Genetics* **9**(1): 1-11.
- Papadopoulou A., Anastasiou I., Keskin B. and Vogler A.P. (2009). Comparative phylogeography of tenebrionid beetles in the Aegean archipelago: the effect of dispersal ability and habitat preference. *Molecular Ecology*, **18**, 2503-2517.
- Peracca M. (1898). Descrizione di una nuova specie di tritone italiano, *Molge italica* n. sp. *Boll. Mus. Zool. Anat. comp. Univ. Torino*, **13**, 16.
- Petit R., Aguinalalde I., de Beaulieu J., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D. and Lascoux M. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563.
- Pfenninger, M. and D. Posada (2002). Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* **56**(9): 1776-1788.
- Phillips, S. J. Anderson R.P., Schapire R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* **190**: 231–259
- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E. (1999). Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* **8**: 1805–1817.
- Pinho, C., D. J. Harris, N. Ferrand (2008). Non-equilibrium estimates of gene flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. *BMC Evolutionary Biology* **8**(1): 63.
- Podnar M., Mayer W. and Tvrkovi N. (2005). Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, **14**, 575-588.
- Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253.
- Posada D. and Crandall K. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817.
- Posada D. and Crandall K. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 374-5.

- Powell, J. (1983). Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:492–495.
- Pritchard JK, Donnelly P (2001) Case–control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology*, **60**, 227–237.
- Pritchard J.K., Stephens M.S. and Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Pritchard J.K., Wen W.(2003). Documentation for structure software: version 2. University of Chicago. 33 pages.
- de Queiroz, K. (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In *Endless Forms: Species and Speciation* (Howard, D.J. and Berlocher, S.H., eds), pp. 57–75, Oxford University Press
- Ragghianti, M., S. Bucci-Innocenti, G. Mancino. (1980). Chromosome polymorphism in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Chromosoma* **77**(3): 333-345.
- Ragghianti M. and Wake D. (1986). Genic variation and its evolutionary implications in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Herpetologica*, **42**, 206-214.
- Randi E, Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics*, **3**, 31–45.
- Randi, E. (2008). Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology* **17**(1): 285-293.
- Rambaut A. and Drummond A. (2007). Tracer version 1.4. Computer program and documentation distributed by the author, website <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> .
- Ravago-Gotanco R.G. and JuinioMeñez M.A. (2010). Phylogeography of the mottled spinefoot *Siganus fuscescens*: Pleistocene divergence and limited genetic connectivity across the Philippine archipelago. *Molecular Ecology*, 2010, **19**, 4520-4534.
- Recuero, E. and M. García-París (2011). Evolutionary history of *Lissotriton helveticus*: Multilocus assessment of ancestral vs. recent colonization of the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **60**(1): 170-182.
- Reed, D. H. and R. Frankham (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* **17**(1): 230-237.
- Rhymer J. M., D. Simberloff (1996) Extinction by Hybridization and Introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* Vol. 27, (1996), pp. 83-109
- Rice W. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.

- Riddle B.R., Hafner D.J., Alexander L.F. and Jaeger J.R. (2000) Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 14438-14443.
- Ridente D & F Tincardi (2002) Eustatic and tectonic control on deposition and lateral variability of Quaternary regressive sequences in the adriatic basin (Italy). *Marine Geology*, **184**, 273-293.
- Robertson AHF, Grasso M. (1995). Overview of the late Tertiary-Recent tectonic and palaeo-environmental development of the Mediterranean region. *Terra nova* 7:114-127
- Roca, A., N. Georgiadis, and S. O'Brien. (2005). Cytonuclear genomic dissociation in African elephant species. *Nat. Genet.* 37:96–100.
- Romano P., Santo A. & M. Voltaggio (1994) Evoluzione geomorfologica della piana del fiume Volturno (Campania) durante il tardo Quaternario (Pleistocene medio-superiore - Olocene). *Il Quaternario*, **7**, 41-56..
- Rousset F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from Fstatistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219.
- Rozen S, H. J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- Sacco F. (2010). Processi microevolutivi e genesi degli hotspot di biodiversità intraspecifica. Tesi di dottorato di ricerca in “Ecologia e gestione delle risorse biologiche (XXII ciclo)”. Università degli studi della Tuscia. Pag. 108
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. and Erlich H. (1988). Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-489.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5463-5467.
- Santucci F., Nascetti G. and Bullini L. (1996). Hybrid zones between two genetically differentiated forms of the pond frog *Rana lessonae* in southern Italy. *Journal of Evolutionary Biology*, **9**, 429-450.
- Sanz, N., R. Araguas, et al. (2009). Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conservation Genetics* **10**(1): 225-236.
- Satten GA, Flanders WD, Yang QH (2001) Accounting for unmeasured population substructure in case-control studies of genetic association using a novel latent-class model. *American Journal of Human Genetics*, **68**, 466–477.

- Seddon JM, Santucci F, Reeve NJ, Hewitt GM (2001) DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E-concolor*. Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10:2187-2198
- Sequeira, F., J. Alexandrino, et al. (2005). Genetic exchange across a hybrid zone within the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. *Molecular Ecology* 14(1): 245-254.
- Sequeira, F., N. Ferrand, et al. (2006). Assessing the phylogenetic signal of the nuclear beta-Fibrinogen intron 7 in salamandrids (Amphibia: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia* 27: 409 - 418.
- Scillitani G., Scalera R., Carafa M. and Tripepi S. (2004). Conservation and biology of *Triturus italicus* in Italy (Amphibia, Salamandridae). *Italian Journal of Zoology*, 71, 4554.
- Scott DB & ES Collins (1996) Late Mid-Holocene sea-level oscillation: a possible cause. *Quaternary Science Reviews*, 15, 851-856.
- Selander R.K., Smith M.H., Yang S.Y., Johnson W.E., Gentry J.B., (1971). Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics IV, Univ. Texas Publ.*, 7103: 49-90.
- Shafer ABA, Cullingham CI, Côté SD, Coltman DW. (2010). Of glaciers and refugia: a decade of study sheds new light on the phylogeography of northwestern North America. *Molecular Ecology* 19: 4589–4621.
- Shaw, K. (2002). Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16122–16127.
- Shepard DB, Burbrink FT (2008) Lineage diversification and historical demography of a sky island salamander, *Plethodon ouachitae*, from the Interior Highlands. *Molecular Ecology*, 17, 5315–5335.
- Simberloff, D (1996) Hybridization between native and introduced wildlife species: Importance for conservation *Wildlife Biology* [WILDL. BIOL.]. Vol. 2, no. 3, pp. 143-150.
- Sites, J.W., and J. C. Marshall. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35:199–227.
- Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, Darrow D.C., Gastony J.C. (1983). Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal* 73(1): 9-27.

- Sota, T., and A. Vogler. (2001). Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the Carabid beetles *Ohomopterus*. *Syst. Biol.* 50:39–59.
- Sperone E, Tripepi S (2005) Ecological preferences of the Italian newt *Triturus italicus* (Peracca, 1898) in Calabria. *Russ J Herpetol* 12(suppl.):269–27
- Stebbins GL (1942) The genetic approach to problems of rare and endemic species. *Madrono*, 6, 241–258.
- Steinfartz S., Veith M. and Tautz D. (2000). Mitochondrial sequence analysis of Salamandra taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of Salamandra salamandra. *Molecular Ecology*, **9**, 397-410.
- Stephens M, NJ Smith and P Donnelly, (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, **68** , pp. 978–989
- Stewart J. and Lister A. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 608613.
- Swofford D. and Selander R. (1999). BIOSYS2: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics (Release 2.0). University of Illinois, Urbana, Champaign, IL.
- Taberlet P. (1998). Biodiversity at the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology*, **64**, 91100.
- Taberlet P., Fumagalli L., WustSaucy A. and Cosson J. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453464.
- Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 512.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596.
- Templeton A., Crandall K. and Sing C. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**, 619.
- Templeton A. R., K. Shaw, E. Routman and S. K. Davis (1990) The Genetic Consequences of Habitat Fragmentation *Annals of the Missouri Botanical Garden* Vol. 77, No. 1, pp. 13-27
- Thompson JN (2005) The Geographic Mosaic of Coevolution. University of Chicago Press, Chicago, USA.

- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucl. Ac. Res.*, 22: 4673-4680.
- Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, 25,4876.
- Tortorici L. (1981). Analisi delle deformazioni fragili dei sedimenti postorogeni della Calabria settentrionale. *Bollettino della Società Geologica Italiana*, 100, 291308.
- Tripepi S., Scillitani G. (2007) *Lissotriton italicus* in Fauna d'Italia, vol. XLII, Amphibia Benedetto Lanza, Franco Andreone, Marco A. Bologna, Claudia Corti & Edoardo Razzetti 2007, Calderini, Bologna, XI + 537 pp
- Ursenbacher S., Conelli A., Golay P., Monney J., Zuffi M., Thiery G., Durand T. and Fumagalli L. (2006). Phylogeography of the asp viper (*Vipera aspis*) inferred from mitochondrial DNA sequence data: evidence for multiple Mediterranean refugial areas. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38, 546.
- VÄHÄ, J.-P. and C. R. Primmer (2006). Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* 15(1): 63-72.
- Van Andel T. and Tzedakis P. (1996). Palaeolithic landscapes of Europe and environs, 150,000-25,000 years ago: an overview. *Quaternary Science Reviews*, 15, 481500.
- Vandenberghe J (2002) The relation between climate and river processes, landforms and deposits during the Quaternary. *Quaternary International*, 91, 17–23.
- Van Valen L.. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1, 1-30
- Vega R., Amori G., Aloise G., Cellini S., Loy A. and Searle J.B. (2010). Genetic and morphological variation in a Mediterranean glacial refugium: evidence from Italian pygmy shrews, *Sorex minutus* (Mammalia: Soricomorpha). *Biological Journal of the Linnean Society*, 100, 774787.
- Vernesi C, Pecchioli E, Caramelli D, Tiedemann R, Randi E, Bertorelle G (2002) The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology* 11:1285-1297
- Vettori C, Vendramin GG, Anzidei M, Pastorelli R, Paffetti D, Giannini R (2004) Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109:1-9

- Wang J, Gao P, Kang M, Lowe AJ, Huang H. (2009). Refugia within refugia: the case study of a canopy tree (*Eurycorymbus cavaleriei*) in subtropical China. *Journal of Biogeography* **36**: 2156–2164.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15, 1419–1439.
- Warren, D. L., R. E. Glor, et al. (2010). ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography* **33**(3): 607-611.
- Warren DL, Seifert SN, (2011). Ecological niche modeling in Maxent: the importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecol Appl. Mar*;21(2):335-42
- Warwick, T. (1949). The colonization of bomb-crater ponds at Marlow, Buckinghamshire. *J. Anim. Ecol.* 18: 137–141.
- Watson DF and Philips GM, 1985. A refinement of inverse distance weighted interpolation. *Geo-Processing* 2:315–327.
- Weisrock DW, Kozak KH, Larson A (2005) Phylogeographic analysis of mitochondrial gene flow and introgression in the salamander, *Plethodon shermani*. *Molecular Ecology*, 14, 1457–1472.
- Weiss, S. and N. Ferrand (2007). Current perspectives in phylogeography and the significance of South European refugia in the creation and maintenance of European biodiversity
Phylogeography of Southern European Refugia. S. Weiss and N. Ferrand, Springer Netherlands: 341-357.
- Wiens, JJ (2004) Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, **58**, 193–197.
- Wiens JJ, Graham CH (2005) Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 519–539.
- Wiens JJ, Engstrom TN, Chippindale PT (2006) Rapid diversification, incomplete isolation, and the 'speciation clock' in North American salamanders (Genus: *Plethodon*): testing the hybrid swarm hypothesis of rapid radiation. *Evolution*, **60**, 2585–2603.
- Wirtz, P (1999) Mother species-father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behaviour*, **58**, 1–12.
- Wright , S. (1940) The statistical consequence of Mendelian heredity in relation to speciation The new systematics, Oxford, Clarendon Press
- Young, A., T. Boyle, T. Brown (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* **11**(10): 413-418.

- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E & K Billups (2001) Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, **292**, 686-693.
- Zhang, D. X. and G. M. Hewitt (1996). Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* 11(6): 247-251.
- Zhang P., Papenfuss T., Wake M., Qu L. and Wake D. (2008). Phylogeny and biogeography of the family Salamandridae (Amphibia: Caudata) inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **49**, 586-597.