

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO
SOSTENIBILE

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

TESI DI DOTTORATO:

**PROCESSI MICROEVOLUTIVI E GENESI DEGLI HOTSPOT DI
BIODIVERSITÀ INTRASPECIFICA**

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: BIO/07

COORDINATORE:

Prof. Roberta Cimmaruta

TUTOR:

Prof. Giuseppe Nascetti

Dott. Daniele Canestrelli

DOTTORANDA:

Florinda Sacco

A coloro che mi hanno supportato e sopportato di più..
Roberto, la mia famiglia, le mie amiche di sempre
e
a Francesco Spallone.

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 PROCESSI STORICI E NASCITA DEGLI <i>HOTSPOT</i> DI DIVERSITÀ INTRASPECIFICA	7
1.2 LA PENISOLA ITALIANA	10
2. LE SPECIE STUDIATE	14
2.1 <i>SALAMANDRA SALAMANDRA</i>	14
2.2 <i>LISSOTRITON ITALICUS</i>	15
2.3 <i>RANA DALMATINA</i>	17
3. MATERIALE E METODI	19
3.1 MATERIALE	19
3.2 METODI	19
3.2.1 MARCATORI UTILIZZATI	19
3.2.2 ELETTROFORESI DI SISTEMI GENE-ENZIMA	20
3.2.3 ESTRAZIONE, AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL DNA MITOCONDRIALE	21
3.2.4 ANALISI STATISTICHE	22
3.2.4.1 DATI ALLOZIMICI	22
3.2.4.2 DATI MITOCONDRIALI	24
4. RISULTATI E DISCUSSIONI	29
4.1 <i>SALAMANDRA SALAMANDRA</i>	29
4.1.1 RISULTATI	29
4.1.1.1 DATI ALLOZIMICI	29
4.1.1.2 DATI MITOCONDRIALI	31
4.1.2 DISCUSSIONI	33
4.2 <i>LISSOTRITON ITALICUS</i>	36
4.2.1 RISULTATI	36
4.2.2 DISCUSSIONI	39

4.3 <i>RANA DALMATINA</i>	43
4.3.1 RISULTATI	43
4.3.2 DISCUSSIONI	45
5. IMPLICAZIONI E CONCLUSIONI GENERALI	49
BIBLIOGRAFIA	52
FIGURE E TABELLE	65

1. INTRODUZIONE

L'area del bacino del Mediterraneo è uno dei maggiori *hotspot* di biodiversità al mondo a livello di specie (Myers *et al.*, 2003). Le moderne tecniche di biologia molecolare hanno evidenziato come le penisole europee che affacciano sul Mediterraneo (la penisola iberica, la penisola italiana e balcanica) e più in particolare la loro porzione meridionale, siano *hotspot* di biodiversità anche a livello intra-specifico (Hewitt, 1996; Taberlet, 1998). Per questa loro caratteristica, queste penisole costituiscono degli ottimi laboratori naturali per studi volti a far luce sulle dinamiche microevolutive che determinano la distribuzione geografica della diversità, come il ruolo della variazione nel tempo e nello spazio del flusso genico e della deriva genetica, il ruolo dell'ibridazione introgressiva tra linee divergenti intra e interspecifiche, o in altre parole, di quei processi che portano al differenziamento all'interno e tra popolazioni e che eventualmente conducono alla speciazione.

La ricchezza in diversità genetica evidenziata nel sud delle penisole europee è stata messa in relazione con il ruolo di rifugio svolto da queste aree per le specie temperate del Palearctico Occidentale nel corso delle oscillazioni glaciali del Pleistocene. Dati palinologici e ricostruzioni paleoambientali (Bennet *et al.*, 1991) e diversi studi genetici condotti su specie con areale europeo e con pochi campioni (Taberlet *et al.*, 1998; Bilton *et al.*, 1998) hanno contribuito a delineare il paradigma secondo il quale le penisole avrebbero costituito un rifugio omogeneo, con condizioni ambientali favorevoli, che avrebbero reso possibile la persistenza e il differenziamento delle popolazioni nel tempo, attraverso l'alternarsi di fasi glaciali e interglaciali. Da queste popolazioni, dopo l'ultimo interglaciale, sarebbe poi ripartita la colonizzazione delle aree a nord (Taberlet *et al.*, 1998; Bilton *et al.*, 1998). I valori di bassa variabilità genetica delle popolazioni settentrionali sarebbero dunque da imputarsi proprio al processo di rapida espansione postglaciale verso nord, che a causa di colli di bottiglia, avrebbe portato ad una perdita di alleli e ad una generale tendenza all'omozigosità (Hewitt, 1996). Linee evolutive differenziate in rifugi diversi, dopo l'espansione avrebbero dato luogo in alcune aree anche a contatti secondari e ibridazione (Petit *et al.*, 2003). Tuttavia, altri studi condotti con campionamenti dettagliati all'interno delle diverse penisole, hanno evidenziato dei pattern di diversità genetica caratterizzati da una forte strutturazione geografica, indicativi di passati eventi di isolamento tra popolazioni in più aree rifugio all'interno di quello che veniva considerato un unico rifugio. Tali studi rilevano come i principali processi microevolutivi implicati nel determinare l'attuale fisionomia della diversità genetica all'interno dei maggiori rifugi glaciali siano legati a fenomeni di differenziazione allopatrica, in alcuni casi seguita da contatti secondari e da ibridazione introgressiva (Ragghianti & Wake, 1986; Santucci *et al.*, 1996; Paulo *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2005; Martínez-Solano *et al.*, 2006; Ursenbacher *et al.*, 2006;

Bella *et al.*, 2007; Gómez & Lunt, 2007; Canestrelli *et al.*, 2007). Questo secondo scenario, denominato “*Refugia within Refugia*”, è fortemente supportato per la penisola iberica da un numero cospicuo di evidenze (Gómez & Lunt, 2007), tuttavia un numero crescente di studi condotti su taxa di tutte e tre le penisole europee (Schmitt *et al.*, 2006; Krystufek *et al.*, 2007; Canestrelli *et al.*, 2010), suggerisce che tale scenario possa avere validità generale.

Confrontando i diversi casi di studio che supportano lo scenario “*Refugia within Refugia*” per le diverse penisole europee, si possono evidenziare alcuni aspetti importanti su quali fattori storici ed evolutivi avrebbero maggiormente contribuito a determinare il pattern di diversità genetica intraspecifica all'interno dei maggiori rifugi glaciali. Tra i fattori storici, oltre al ruolo delle oscillazioni climatiche del Pleistocene, è risultato determinante il ruolo svolto dalla geografia. Infatti, la complessa orografia che caratterizza le penisole può aver creato al loro interno una varietà di microclimi, che possono aver costituito rifugi multipli, isolati uno dall'altro, all'interno di quello che veniva considerato un unico rifugio (Hewitt, 1996; Gómez & Lunt, 2007). Inoltre, anche le oscillazioni del livello del mare indotte dall'alternarsi delle fasi glaciali e interglaciali, modificando profondamente il profilo delle terre emerse, avrebbero giocato un ruolo importante nell'innescare eventi di vicarianza tra popolazioni, soprattutto nella penisola italiana (Santucci *et al.*, 1996; Canestrelli *et al.*, 2007; Canestrelli *et al.*, 2010). Tra i processi microevolutivi, è emerso che quello che sembra aver svolto un ruolo chiave nel creare biodiversità intraspecifica sia stato il contatto secondario tra linee differenziate per isolamento in diversi subrifugi, al quale sarebbe seguito un processo di ibridazione con rimescolamento dei caratteri (Canestrelli *et al.*, 2010). In molti studi filogeografici, infatti, le popolazioni che presentano i più alti valori di diversità genetica sono proprio quelle frutto di ibridazione introgressiva verificatesi dopo un contatto secondario tra linee vicarianti. Pertanto, si potrebbe affermare che i maggiori rifugi glaciali non sarebbero stati solo dei centri di diversificazione e dei depositari della diversità genetica e dunque “semplici” *hotspot*, ma anche importanti *melting spot* di biodiversità intraspecifica (Petit *et al.*, 2003; Canestrelli *et al.*, 2008).

Secondo quanto appena esposto risulta evidente che, per poter far emergere il ruolo relativo dei diversi processi storico-evolutivi nel plasmare i pattern di distribuzione della diversità genetica nei diversi taxa dei maggiori rifugi glaciali, sia importante curare due aspetti: il campionamento e la scelta dei marcatori genetici. Pochi campioni infatti non possono essere considerati come rappresentativi di regioni con una complessa fisionomia geomorfologica o con una storia caratterizzata da importanti eventi geologici, soprattutto per le regioni che vengono indicate come i maggiori rifugi glaciali (Bilton *et al.*, 1998; Gómez & Lunt, 2007). Infatti, senza un campionamento dettagliato la complessità della distribuzione geografica della diversità genetica e l'effettivo contributo dei diversi processi microevolutivi potrebbe non emergere. Per quanto

riguarda la scelta dei marcatori, è importante analizzare il pattern di diversità attraverso l'uso di marcatori sia mitocondriali che nucleari, i quali avendo caratteristiche diverse (per una rassegna vedi Ballard *et al.*, 2004), possono delineare pattern genetici differenti. Solo confrontando e integrando le informazioni ottenute dalle due classi di marcatori si può ricostruire più compiutamente la storia evolutiva delle popolazioni di una specie e comprendere quali processi microevolutivi più verosimilmente hanno contribuito a formarla. In particolare, l'uso combinato dei due marcatori risulta di estrema importanza sia per l'individuazione di aree di contatto secondario che per lo studio delle dinamiche evolutive che caratterizzano tali aree. Pertanto, è facile sospettare che in diversi lavori condotti con pochi campioni e con un solo marcatore il contributo dei diversi processi microevolutivi possa esser stato sottostimato (Ragghianti & Wake, 1986; Steinfartz *et al.*, 2000; Capula & Ceccarelli, 2003; Giovannotti *et al.*, 2007, 2010).

In questa tesi si vuole contribuire alla conoscenza del ruolo dei diversi processi microevolutivi nel determinare il pattern geografico della diversità genetica all'interno di *hotspot* di biodiversità, con particolare interesse per la penisola italiana, riconosciuta come uno dei maggiori rifugi glaciali e *hotspot* mondiale di biodiversità. A tal fine si è scelto di studiare la struttura genetica di tre specie, *Salamandra salamandra*, *Lissotriton italicus* e *Rana dalmatina*, di inferire la storia evolutiva di questi taxa all'interno della penisola italiana, e di comprendere quali processi hanno maggiormente contribuito a determinarla. I risultati dei singoli studi verranno poi discussi congiuntamente per valutare le eventuali linee di concordanza e di discordanza, al fine di poter rilevare aspetti di validità generale sulla genesi di un *hotspot* di biodiversità intraspecifica.

1.1 PROCESSI STORICI E NASCITA DEGLI HOTSPOT DI DIVERSITÀ INTRASPECIFICA

Il pattern filogeografico di una specie è il prodotto di una complessa interazione di più fattori come i processi recenti e storici di deriva genetica, flusso genico e migrazione, come le richieste ecologiche e la capacità di dispersione della specie, e come pure gli eventi geologici, il clima e i suoi cambiamenti (Hewitt, 1996; Avise *et al.*, 1998; Avise, 2000, 2008, 2009; Cruzan & Templeton, 2000; Canestrelli *et al.*, 2010).

Le oscillazioni climatiche del Quaternario sono state ampiamente riconosciute come il processo storico che maggiormente ha influenzato l'attuale distribuzione delle specie e della variabilità genetica all'interno di esse (Webb and Bartlein, 1992; Hewitt, 2000). Le ricostruzioni paleoambientali hanno mostrato come il clima diventò freddo attraverso il Terziario (65 milioni di anni fa, Myr) con frequenti oscillazioni che incrementarono di ampiezza e portarono alla serie di

maggiori eventi glaciali del Quaternario ai quali seguivano fasi interglaciali. Lo strato di ghiaccio nell'emisfero Nord incominciò a crescere largamente proprio all'inizio del Quaternario (2,5 MYr). Gli eventi glaciali sono stati poco intensi prima dei 700 ky. Successivamente le oscillazioni maggiori si verificarono con un ciclo dominante di 100 ky (Webb III and Bartlein, 1992). L'origine di tali oscillazioni climatiche viene attribuita principalmente alle variazioni dell'orbita terrestre (eccentricità dell'orbita, inclinazione dell'asse, moti di precessione) (Hewitt, 2004a; 2004b). La massima estensione dei ghiacciai risale all'ultima fase glaciale 20-18 ky, durante la quale il ghiaccio e il permafrost si estesero a latitudini più basse. In Europa, durante l'ultima fase glaciale, ci fu notevole decremento delle temperature medie che portarono alla formazione dei ghiacciai fino in Scandinavia, in parte della Gran Bretagna e del Nord Europa, fino al 52° parallelo, mentre il permafrost arrivò fino al 47° parallelo. Inoltre anche le principali catene montuose come i Pirenei, le Alpi e il Caucaso furono ricoperte da ghiacciai. In Italia, il ghiacciaio sul massiccio del Gran Sasso fu molto più esteso (Giraudi & Frenzotti, 1997) e lingue glaciali si formarono anche sul massiccio del Matese, sul Pollino e sulla Sila (Acquafredda & Palmentola, 1986). Gran parte della porzione centrale del continente era occupata da tundra e steppe fredde (Van Andel & Tzedakis, 1996). Intorno al Mediterraneo e soprattutto nelle pianure della Grecia e dell'Italia, nonostante il clima fosse più arido, caratterizzato da estati secche e inverni freddi e piovosi (Elenga *et al.*, 2000), diverse specie di alberi sopravvissero a medie altitudini in piccole aree ecologicamente più stabili, le quali permisero la sopravvivenza a lungo termine e la formazione di nuove specie (Tzedakis *et al.*, 2002). Nell'ultima fase glaciale si registrò un generale abbassamento del livello del mare di molte decine di metri (120 m circa) che determinò un arretramento della linea di costa che in alcuni casi, come in Adriatico, riguardò centinaia di chilometri (Van Andel & Tzedakis, 1996). I periodi interglaciali invece 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. Lo scioglimento dei ghiacciai causò un innalzamento del livello del mare e fenomeni di trasgressione marina, con conseguenti allagamenti delle pianure alluvionali, qcome 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, e la piana di Catanzaro, che separa la Calabria meridionale da quella centrale (Barra *et al.*, 1996; Bernasconi *et al.*, 1997; Chiocci *et al.*, 1997; Bonfiglio *et al.*, 2002; Cucci, 2004). Le temperature medie crebbero superando di 3-4°C quelle dei nostri giorni nell'Europa centrale e meridionale, e anche le temperature marine crebbero e nel Mediterraneo si registrarono valori di 3-4°C superiori a quelle attuali (Van Andel & Tzedakis, 1996).

Le severe oscillazioni climatiche del Pleistocene produssero grandi cambiamenti nella distribuzione delle specie (Hewitt, 1996; Hewitt, 2000). Seguendo i cambiamenti ambientali

durante le culminazioni glaciali, le specie si contrassero in aree con condizioni favorevoli alla loro sopravvivenza (aree di rifugio) e durante le fasi interglaciali con il miglioramento complessivo del clima, esse tornarono ad espandersi negli ambienti disponibili secondo le capacità dispersive e le esigenze ecologiche di ciascuna (Hewitt, 1996). Le più importanti aree di rifugio in Europa sono state identificate con il sud delle penisole del Mediterraneo, la penisola iberica, la penisola italiana e i Balcani (Hewitt, 1996; Hewitt, 2004a; Hewitt, 2004b; Taberlet *et al.*, 1998; Taberlet & Cheddadi, 2002; Tzedakis *et al.*, 2002). Recentemente alcuni studi stanno mettendo in evidenza come probabilmente anche nel Nord Europa vi furono delle aree di limitata estensione in cui alcuni taxa della flora e fauna dei climi temperato trovarono probabilmente rifugio (Stewart & Lister, 2001; Pinho, 2007).

Le ripetute contrazioni ed espansioni delle popolazioni nel susseguirsi dei cicli glaciali e interglaciali hanno lasciato delle tracce nella struttura genetica delle popolazioni. Questi sono infatti dei processi che implicano fluttuazioni demografiche e cambiamenti adattativi, con effetti stocastici e selettivi sulla variabilità e sulla struttura genetica delle popolazioni, che noi attraverso l'uso di marcatori molecolari possiamo rilevare. I primi studi di filogeografia misero in evidenza una variabilità genetica più alta in corrispondenza delle presunte aree di rifugio (sud delle penisole) e minore al nord (Hewitt, 1996; Taberlet *et al.*, 1998), tale pattern è stato denominato “*southern richness, northern purity*” (Hewitt, 1996).

Per spiegare la “*southern richness*”, sono state ipotizzati due possibili scenari (Hewitt, 1996). Nel primo scenario, l'alta diversità genetica delle popolazioni nelle aree di rifugio viene interpretata come l'effetto della stabilità e dell'ampiezza demografica che avrebbero caratterizzato queste popolazioni durante le oscillazioni climatiche del Pleistocene (Hewitt, 1996). Tali condizioni avrebbero infatti offerto loro la possibilità di evitare il pericolo di perdita di diversità genetica che caratterizza invece popolazioni piccole e demograficamente fluttuanti (Allendorf and Luikart, 2007). Quindi, secondo questo primo scenario, i rifugi avrebbero rappresentato dei “serbatoi” della diversità intraspecifica, da dove poi sarebbe partita la ricolonizzazione post-glaciale delle aree settentrionali, processo che a causa di colli di bottiglia comportò una perdita di alleli e una tendenza verso l'omozigosità (Hewitt, 1996). Inoltre, la condizione di allopatria in cui si sono trovate le popolazioni di una specie separate nei diversi rifugi, avrebbe poi portato ad un lento accumulo di divergenza, cosicché nelle successive fasi di ricolonizzazione delle aree a nord, si sarebbero formate delle zone di contatto secondario e di ibridazione tra linee evolutive che si erano differenziate nelle diverse aree rifugio (Hewitt, 1996; Hewitt, 2000; Taberlet *et al.*, 1998). Dunque, secondo questo primo scenario, il pattern di variabilità genetica a livello dell'intero areale delle specie sarebbe stato determinato principalmente da processi di “*diversity-reducing*” associati alla fase di ricolonizzazione (Canestrelli *et al.*, 2010). Nel secondo scenario, noto con il nome di

“Refugia within Refugia” (Gómez & Lunt, 2007), la maggiore variabilità genetica all'interno dei maggiori rifugi sarebbe invece da attribuire a ripetuti cicli di frammentazione, divergenza allopatrica, ed espansione, in seguito alla quale in alcuni casi si sarebbero verificati contatti secondari e conseguenti fenomeni di ibridazione introgressiva. In tale scenario, solo un sub-set delle popolazioni del sud avrebbe contribuito nel processo di ricolonizzazione post-glaciale delle aree a nord, e pertanto, la minor variabilità genetica delle popolazioni settentrionali sarebbe stata determinata non solo dalla perdita di variabilità causata dal processo di espansione in sé, ma anche dal fatto che solo una porzione del pool genico originario avrebbe contribuito alla ricolonizzazione (Gómez & Lunt, 2007). In particolare il pattern di distribuzione geografica della variabilità genetica atteso secondo l'ipotesi dello scenario *“Refugia within Refugia”* sarebbe un pattern altamente strutturato, dove gran parte della variabilità viene attribuita principalmente a differenze tra popolazioni e non all'interno delle popolazioni (Alexandrino *et al.*, 2000; Paulo *et al.*, 2002). Inoltre in questo scenario, un ruolo chiave nel determinare aree di *hotspot* di biodiversità intraspecifica all'interno del sud delle penisole viene attribuito all'ibridazione introgressiva, in quanto le popolazioni caratterizzate da alti valori di diversità genetica sono risultate spesso come il prodotto di eventi di contatto secondario, cui ha fatto seguito un rimescolamento dei caratteri (Canestrelli *et al.*, 2006a; Canestrelli and Nascetti, 2008; Canestrelli *et al.*, 2010). Nello scenario *“Refugia within Refugia”*, nella formazione del pattern di diversità genetica delle popolazioni a livello dell'intero areale non sarebbero dunque implicati solo i processi *“diversity-reducing”*, ma anche processi microevolutivi che incrementano la diversità (*“diversity-enhancing”*) all'interno delle maggiori aree di rifugio (Canestrelli *et al.*, 2010).

In generale, dati palinologici e ricostruzioni paleoambientali e diversi studi filogeografici condotti con campionamenti non molto dettagliati soprattutto all'interno delle aree di rifugio, spesso finalizzati all'indagine del pattern di diversità a livello dell'intero areale delle specie, hanno supportato a lungo il paradigma di un singolo rifugio nel sud delle penisole del Mediterraneo (Taberlet, 1998; Olade *et al.*, 2002; Gómez & Lunt, 2007). Tuttavia, un numero crescente di ricerche condotte su taxa provenienti dalle tre penisole europee, con schemi di campionamento più dettagliati, stanno invece rivelando l'esistenza di pattern di diversità genetica strutturati riferibili a rifugi multipli all'interno dei maggiori rifugi (Gómez & Lunt, 2007; Sotiropoulos *et al.*, 2007; Krystufek *et al.*, 2007; Previšić *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2009; Canestrelli and Nascetti, 2008, Canestrelli *et al.*, 2010). Pertanto complessivamente questi studi sembrerebbero suggerire una valenza più generale per lo scenario *“Refugia within Refugia”*.

1.2 LA PENISOLA ITALIANA

Come già esposto nei precedenti paragrafi, il sud della penisola italiana è stato identificato come uno dei maggiori rifugi glaciali del Pleistocene per i taxa temperati del Paleartico Occidentale e come hotspot di biodiversità sia a livello di specie e che a livello intraspecifico. Diversi studi condotti su alcuni taxa all'interno della penisola italiana, non solo hanno evidenziato un trend generale di diminuzione della diversità genetica con il crescere della latitudine (pattern “*southern richness-northern purity*”), ma hanno anche descritto pattern di distribuzione della diversità genetica fortemente strutturati geograficamente. Le caratteristiche di questi pattern sono indicative di passati eventi di isolamento tra popolazioni, e suggeriscono come la maggior variabilità del sud sia da attribuire ad uno scenario di rifugi multipli (“*Refugia within Refugia*”) e non a stabilità demografica delle popolazioni in quest'area (Canestrelli and Nascetti, 2008; Raghianti e Wake, 1996; Santucci *et al.* 1996; Podnar *et al.*, 2005; Böhme *et al.*, 2007; Magri, 2008; Canestrelli *et al.*, 2010).

Confrontando i pattern filogeografici emersi dai lavori che supportano lo scenario dei rifugi multipli per la penisola italiana, si osserva come questi pattern non siano perfettamente sovrapponibili, ma presentino comunque importanti quanto evidenti aspetti di concordanza. Gli aspetti di concordanza filogeografica indicano che la struttura geografica della diversità genetica di queste specie è stata influenzata dagli stessi fattori storici (concordanza di tipo III, Avise, 2000), mentre le differenze che si osservano sarebbero da riferire al fatto che la risposta di ciascuna specie agli stessi eventi storici è stata condizionata anche da caratteristiche biologiche specie-specifiche (per esempio capacità dispersive e caratteristiche ecologiche) e/o da fattori stocastici (Michaux *et al.*, 2005; Canestrelli *et al.*, 2007).

Le oscillazioni climatiche del Pleistocene con le conseguenti variazioni glacio-eustatiche del livello del mare, e l'intensa attività tettonica che ha caratterizzato la storia geologica dell'Italia, sono stati i principali fattori storici che, determinando profondi cambiamenti nella fisionomia della penisola italiana durante il Plio-Pleistocene (Figura 1), avrebbero condizionato profondamente la storia evolutiva delle popolazioni delle specie che la occupano. Infatti, si può osservare come le principali discontinuità nella distribuzione della variabilità genetica (discontinuità filogeografiche), individuate in diversi di studi, coincidano proprio con aree geografiche che per le loro caratteristiche e la loro storia potrebbero aver costituito una barriera alla dispersione delle popolazioni. Tale coincidenza indica un ruolo importante svolto dalla geografia nel plasmare il pattern di variabilità genetica delle popolazioni delle specie della penisola italiana. Se consideriamo, ad esempio, la porzione meridionale dell'Italia, in particolare la Calabria, già a partire dal Pliocene inferiore quest'area è stata sede di intensi fenomeni tettonici, ed era costituita da un complesso sistema di faglie e di fosse (Ghisetti, 1979; Tortorici, 1981). Le aree di

fossa calabresi (le attuali pianure di Crati-Sibari, di Catanzaro e di Monte Torre) in seguito alle variazioni glacio-eustatiche del livello del mare, sarebbero andate incontro a ripetuti cicli di trasgressioni marine, fino al Pleistocene superiore. Quindi, durante le fasi interglaciali, la Calabria doveva apparire come un arcipelago in cui le isole avrebbero coinciso con gli attuali massicci della Sila, delle Serre, di Capo Vaticano e dell'Aspromonte (Bonfiglio *et al.*, 2002 e riferimenti all'interno) (Figura 2). Durante le fasi di sommersione, le pianure di Crati-Sibari e di Catanzaro avrebbero pertanto limitato la dispersione delle popolazioni lungo l'asse nord-sud. Tale azione di barriera è testimoniata da dati paleontologici e paleogeografici (Caloi *et al.*, 1989; Bonfiglio *et al.*, 2002) e più recentemente da dati genetici, che le individuano come sedi di discontinuità filogeografica, come ad esempio è emerso nell'analisi filogeografiche di diverse specie come la *Rana (Pelophylax) lessonae* (Santucci *et al.*, 1996; Canestrelli & Nascetti, 2008), la *Bombina pachypus* (Canestrelli *et al.*, 2006a), la *Talpa romana* (Canestrelli *et al.*, 2010) e la *Rana italica* (Canestrelli *et al.*, 2008). Anche la piana del Volturo è stata caratterizzata da lunghi periodi di sommersione a causa dell'interazione tra l'attività tettonica e l'oscillazione glacio-eustatica del livello del mare (Barra *et al.*, 1996), e pertanto può aver agito da efficace barriera alla dispersione delle popolazioni, così come è emerso dalla ricostruzione della storia evolutiva delle specie *Salamandrina perspicillata* e *S. terdigitata* (Nascetti *et al.*, 2005; Canestrelli *et al.*, 2006b). Inoltre, un'altra importante sede di discontinuità filogeografica è stata individuata presso l'Appennino settentrionale. Questo tratto della catena Appenninica, grazie alle sue caratteristiche orografiche e al fatto che durante le culminazioni glaciali risultava coperta da coltri glaciali, avrebbe agito da barriera alla dispersione. Infatti, l'Appennino settentrionale è risultato essere non solo una delle sedi di discontinuità filogeografica tra le popolazioni di alcune specie come per esempio nella *Hyla intermedia* (Canestrelli *et al.*, 2007), nella *Rana lessonae* (Canestrelli & Nascetti, 2008) e nella *Vipera aspis* (Barbanera *et al.*, 2009) ma anche il limite settentrionale dell'areale di diverse specie come ad esempio della *Salamandrina perspicillata*, e della *Rana italica*.

Spesso, proprio in corrispondenza delle aree geografiche citate come importanti barriere alla dispersione e sedi di discontinuità filogeografiche vengono identificate popolazioni con i valori più alti di diversità genetica. Tale caratteristica sarebbe il risultato di fenomeni di ibridazione introgressiva tra linee vicarianti, innescati da eventi di contatto secondario. Pertanto, queste aree geografiche sono sedi di *hotspot* di biodiversità intraspecifica in quanto sedi di *melting spot*. Tuttavia, il contributo dell'ibridazione introgressiva nella genesi degli hotspot di biodiversità intraspecifica risulta ancora scarsamente esplorato e al centro di accesi dibattiti (per es. Canestrelli *et al.*, 2007; vedi Canestrelli *et al.*, 2010 per una estesa discussione in proposito).

Per poter dunque valutare il contributo dello scenario dei rifugi multipli e di quello di prolungata stabilità demografica e quindi far luce su quali processi microevolutivi abbiano

maggiormente contribuito a determinare il pattern “*southern richness-northern purity*” in una penisola come quella italiana, caratterizzata da una complessa storia paleogeografica e paleoclimatica, sono state scelte tre specie della batracofauna. Gli anfibi infatti sono considerati specie modello per studi di filogeografia, in quanto le loro caratteristiche biologiche, come scarsa capacità dispersiva spesso accompagnata da alta filopatria ai siti natali, fanno sì che essi tendano a trattenere nel proprio pattern di diversità genetica i segni dei fattori sia storici che microevolutivi che hanno contribuito a plasmarlo (Zeisset & Beebee, 2008). Inoltre, un’attenzione particolare è stata rivolta al campionamento, soprattutto nella penisola calabrese, l’area che è emersa come la sede di rifugi multipli per diversi taxa della penisola italiana (Canestrelli et al., 2008; Canestrelli *et al.*, 2010). Per la prima specie in esame in questo lavoro, la *S. salamandra*, lo studio della struttura genetica delle sue popolazioni italiane è stata condotta attraverso l’utilizzo sia di marcatori nucleari (allozimi) che mitocondriali. Per la seconda specie, *L. italicus*, lo studio della struttura genetica delle sue popolazioni è stata analizzata attraverso l’analisi di due frammenti di mtDNA. Il pattern di diversità genetica osservato è stato poi confrontato con il pattern di diversità genetica a livello nucleare presente in letteratura (Ragghianti & Wake, 1986). Per la terza e ultima specie presa in esame in questo lavoro, la *R. dalmatina*, la struttura genetica delle sue popolazioni italiane, croate e slovene è stata analizzata attraverso l’utilizzo di tre frammenti del mtDNA. Poiché le tre specie prese in esame, presentano caratteristiche ecologiche diverse, le eventuali linee di concordanza e discordanza tra i rispettivi pattern filogeografici potranno indicare aspetti di valenza generale su i processi che conducono alla genesi di un *hotspot* di biodiversità.

2. LE SPECIE STUDiate

Le specie di questo studio, lo ricordiamo, sono tre: la salamandra pezzata, il tritone italiano e la rana agile. In questo capitolo, per ciascuna di queste specie, vengono presentate brevemente le principali caratteristiche ecologiche, i principali aspetti conservazionistici e i dati sulla variazione genetica già presenti in letteratura.

2.1 *SALAMANDRA SALAMANDRA*

La salamandra pezzata, *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758), è un anfibio urodelo ed il suo areale si estende dalla Penisola Iberica fino alla Penisola Balcanica Carpazi inclusi (Figura 3). In Italia troviamo due sottospecie (Figura 4): la sottospecie nominale *S. s. salamandra*, diffusa con continuità lungo tutto l'arco alpino e la *S. s. gigliolii*, endemica della penisola italiana, diffusa con continuità solo dalle Alpi Marittime fino all'Appennino Toscano e in modo più frammentato lungo il resto della dorsale appenninica (Lanza, 1983).

Le due sottospecie sono morfologicamente distinguibili per dimensioni e per colorazione (Figura 5): la *S.s. salamandra* è più grande e robusta (10-20 cm), con arti abbastanza lunghi e con macchie gialle di forma irregolare su sfondo nero, con il nero sempre predominante sul giallo (Lanza, 1983; Veith, 1994), mentre la *S.s. gigliolii* è più piccola (10-16 cm), con coda più slanciata e arti più esili (Gasser, 1978) e le macchie gialle sono prevalenti e perlopiù unite a formare vermicolature, soprattutto in quelle calabresi (Tripepi *et al.*, 1999). Popolazioni con caratteristiche intermedie si trovano lungo le Alpi Marittime (Lanza, 1983).

La distribuzione altitudinale della salamandra pezzata è compresa tra poche decine di metri a 2.050 metri s.l.m. con massima frequenza riscontrata tra i 600 m e i 1.300 m s.l.m. (Lanza, 1983). La salamandra predilige i boschi freschi e umidi di caducifoglie (Lanza, 1983) soprattutto faggete (Thorn, 1968) caratterizzate dalla presenza di ruscelli e torrenti con acque ossigenate debolmente correnti (Tripepi *et al.*, 1999). E' una specie prevalentemente crepuscolare e notturna, attiva soprattutto con il tempo piovoso o nebbioso, fresco e senza vento (Lanza, 1983; Tripepi *et al.*, 1999). La riproduzione avviene soprattutto in primavera o in autunno e le femmine depongono da 30-70 larve prevalentemente in ruscelli, pozze fontanili e cisterne (Steinfartz *et al.*, 2007). Le larve nell'arco di qualche mese completano lo sviluppo e metamorfosano.

Le salamandre rimangono per la maggior parte della loro vita in piccole aree (Rebelo & Leclair, 2003; Joly, 1968) anche se recenti studi evidenziano un raggio di spostamento maggiore di quanto si pensasse (Schmidt *et al.*, 2007; Schulte *et al.*, 2007).

Salamandra salamandra è citata in Appendice III della “Convention of the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats” (Convenzione di Berna) ed è presente nella lista rossa IUCN delle specie minacciate nella Categoria LC (least concern) (Kuzmin *et al.*, 2004). In diverse regioni d'Italia la salamandra è protetta da leggi regionali, ad esempio in Calabria è tutelata dalla legge regionale N.9 del 15-05-96 e nel Lazio dalla legge regionale N.18 del 1988. L'alterazione degli habitat, la deforestazione, così come l'inquinamento dei corsi d'acqua sono tra le principali cause della progressiva frammentazione e della riduzione delle popolazioni di *S. salamandra* (Houlahan *et al.*, 2000). Un'altra minaccia per la sopravvivenza di questa specie viene anche dall'introduzione di specie alloctone nei corsi d'acqua, come i salmanidi o il gambero killer *Procambarius clarkii* (Cruz *et al.*, 2006; Orizaola & Brana, 2006).

Dallo studio filogeografico di Steinfartz *et al.* (2000), condotto su popolazioni di *S. salamandra* a livello del suo intero areale, emerge che il pattern di differenziamento genetico delle popolazioni sia da attribuire a fenomeni ciclici di separazione e ricolonizzazione indotte dai cicli glaciali e interglaciali che si sono verificati durante il Quaternario. In particolare, Steinfartz *et al.* (2000) ipotizzò che durante uno dei primi interglaciali esistesse una grande e omogenea popolazione ancestrale diffusa in Europa centrale (dal nord della Spagna fino ai Balcani e Grecia), la quale, nella fase glaciale successiva, si sarebbe suddivisa in più rifugi nell'Europa meridionale e nei Balcani. Alcune di queste popolazioni dall'est e dall'ovest circa 400.000 anni fa avrebbero poi ricolonizzato l'Europa centrale, mentre altre popolazioni, quelle a nord della Spagna (*S. s. bernardezi*) e nel sud della penisola italiana (*S. s. giglioli*), non sarebbero riuscite a espandere il loro areale durante gli ultimi interglaciali e sarebbero rimaste confinate nei pressi della loro area di rifugio. E' bene osservare che le inferenze sulla storia evolutiva delle popolazioni di *S. salamandra* si basano su un campionamento di sole quattro località per la penisola italiana, di cui una sola per la regione Calabria. Alla luce dei complessi pattern di diversità genetica osservati in altri taxa italiani, il pattern di diversità della *S. salamandra* in Italia e il ruolo dei diversi processi microevolutivi che lo hanno determinato possono considerarsi sostanzialmente inesplorati. Inoltre, sempre nel lavoro di Steinfartz *et al.* (2000) troviamo un dato particolarmente interessante: un individuo campionato nella provincia di Napoli come *S. s. giglioli* mostra una forma mitocondriale affine a quella della *S. s. salamandra*, ma i rapporti tra le due sottospecie non sono stati ulteriormente indagati dall'autore e ad oggi risultano ancora irrisolti.

2.1 *LISSOTRITON ITALICUS*

Il tritone italiano, *Lissotritons italicus* (Peracca, 1898) è una specie endemica dell'Italia

peninsulare (Figura 6 e 7), il suo areale è delimitato a Nord da una ipotetica linea che va dalle Marche al golfo di Gaeta (Bucci-Innocenti *et al.*, 1983). In particolare il suo areale di distribuzione comprende solamente pochi siti nelle regioni dell'Italia centrale, mentre risulta maggiormente diffuso nelle regioni meridionali. 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).

Il tritone italiano è una specie euriecia, presenta infatti un notevole grado di adattabilità a condizioni climatiche e idrobiologiche differenti. Pertanto la si può rinvenire praticamente tutto l'anno (ma principalmente in primavera e in autunno) e in tutti i corpi d'acqua, sia naturali che artificiali, anche se sembra preferire acque ferme o a lento corso (Scillitani *et al.*, 2004). L'attività riproduttiva avviene esclusivamente in acqua e generalmente il corteggiamento si verifica dall'autunno alla primavera (Giacoma & Sparreboom, 1987; Giacoma & Balletto, 1988). La deposizione delle uova si verifica dalla fine di gennaio all'inizio di giugno in popolazioni di alta quota (Guarino *et al.*, 1992), ma può avvenire anche in autunno in popolazioni di bassa quota (Scillitani, 1996). La femmina depone generalmente dalle 200 alle 300 uova, le larve nell'arco di due mesi completano lo sviluppo e metamorfosano, anche se la neotenia è piuttosto frequente (Scillitani *et al.*, 2004).

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 che in alcuni studi venga descritto come una specie in pericolo di estinzione (Scillitani *et al.*, 2004 e 2006), *L. italicus* viene considerato dalla IUCN come specie “Least Concern” (IUCN, 1996). I casi di declino delle popolazioni di tritone italico sono da imputarsi principalmente all'inquinamento dei corsi d'acqua, all'interramento dei sistemi idrici, alla distruzione degli habitat e all'introduzione di specie alloctone come pesci e tartarughe esotiche, come ad esempio la testuggine dalle orecchie rosse *Trachemis scripta* (Giacoma, 1988; Scillitani, 2004).

I primi studi condotti sul pattern di distribuzione geografica della diversità genetica del *L. italicus* sono stati tra i primi lavori dove per una specie della penisola italiana sia stato ipotizzato uno scenario di più rifugi (Bucci-Innocenti *et al.*, 1986 e Ragghianti & Wake, 1986). L'analisi della variazione genetica condotta sia a livello del cromosoma 12 (Bucci-Innocenti *et al.*, 1986) sia ai loci allozimici (Ragghianti & Wake, 1986), infatti, mise in evidenza come nel complesso le popolazioni campionate potevano essere raggruppate in due gruppi principali, uno settentrionale ed uno meridionale, probabilmente di origine Pleistocenica, e come tra i due gruppi

ci fosse un'ampia zona di transizione, frutto di un probabile contatto secondario. Tuttavia, in nessuno dei due lavori sono presenti campioni delle popolazioni della Calabria meridionale, proprio l'area della penisola italiana dove per diverse specie è stato evidenziato un complesso e altamente strutturato pattern di distribuzione geografica della diversità genetica, riferibile al modello dei rifugi multipli (Canestrelli *et al.*, 2008). Pertanto una parte importante della storia evolutiva del *L. italicus* e dei processi microevolutivi che l'hanno determinata potrebbe non essere emersa.

2.3 *RANA DALMATINA*

La rana agile, *Rana dalmatina* (Fitzinger in Bonaparte, 1839), è distribuita essenzialmente in Europa centrale e meridionale fino alla Turchia (Figura 8 e 9). I limiti della sua distribuzione sono rappresentati a occidente dalla Francia e dalla Spagna nord orientale. Nel Nord Europa è presente con popolazioni frammentate in Danimarca, in Svezia meridionale, in Germania settentrionale, in Polonia, e nella Repubblica Ceca; in Europa meridionale è presente dall'Italia peninsulare fino al Peloponneso. Il limite orientale di distribuzione della specie è rappresentato dalla Tracia turca e dall'Ucraina occidentale (Picariello *et al.*, 2006). Tra le rane rosse è la più diffusa in Italia, anche se lungo il medio e basso versante adriatico la *R. dalmatina* risulta poco diffusa.

La rana agile è la specie tra le rane europee con costumi più spiccatamente terrestri (Lanza, 1983), entra in acqua solo per il periodo strettamente necessario per la riproduzione (Pavignano *et al.*, 1990). E' presente dal livello del mare sino 2000 m di quota (Picariello *et al.*, 2006). E' una specie tipicamente forestale e l'habitat preferenziale è dato dalle radure dei boschi di latifoglie o boschi misti, frequenta anche campi, praterie e coltivi. La si rinviene prevalentemente durante le attività riproduttive. I siti riproduttivi sono molto eterogenei: prati allagati, stagni, laghetti, canali, pozze temporanee, e addirittura vasche e abbeveratoi, ma tutti sono caratterizzati da acqua ferma o lenta e da un'abbondante vegetazione acquatica. La stagione riproduttiva è piuttosto breve e spesso anticipata rispetto ad altre specie di anuri. La riproduzione infatti può aver luogo a partire da Gennaio, di norma da Febbraio a Marzo, raramente si protrae fino in Aprile (Guarino e Bellini, 1993). I maschi raggiungono i siti prima delle femmine e vi rimangono più a lungo, competendo per conquistare i siti di riproduzione e difendendo il proprio territorio con specifiche vocalizzazioni in attesa dell'arrivo delle femmine (Lesbarrères & Lode, 2002; Hettyey *et al.*, 2005). Le femmine raramente si trattengono nell'habitat acquatico per più di 10 giorni e ogni femmina depone un'unica ovatura, di forma sferica, fissata a steli della

vegetazione acquatica o a rami sommersi. Ogni ovatura è costituita da circa 800 uova agglutinate tra loro. Il numero delle ovature è strettamente correlato alle caratteristiche delle pozze come la profondità dell'acqua, la copertura delle piante acquatiche distanza e connettività dalle pozze al bosco (Pavignano *et al.*, 1990; Hartel, 2008; Hartel *et al.*, 2009). La schiusa varia in relazione alle condizioni ambientali, ed avviene dopo 15-20 giorni; i girini completano la metamorfosi entro 2-3 mesi dalla deposizione. E' stato osservato che nella maggioranza dei casi, la deposizione delle uova avviene in siti distanti circa 50 - 100 metri dal margine delle foreste, mentre gli esemplari di taglia maggiore arrivavano a deporre fino a 300 metri (Ponsero e Joly, 1998).

La rana agile è inserita 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) ed è citata in Appendice II della “Convention of the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats” (Convenzione di Berna). Nella lista rossa IUCN le popolazioni di *R. dalmatina* sono catalogate come Least concern (LC), ovvero vengono considerate con basso rischio di estinzione, mentre in alcuni paesi come ad esempio la Spagna è inserita nella lista rossa nazionale come specie ad alto rischio di estinzione. In Italia è protetta da diverse leggi regionali, ad esempio è tutelata dalla legge regionale n.33 del 27.VII.1977 in Lombardia e dalla Legge regionale n.4 del 22.01.1992 in Liguria. La frammentazione degli habitat, l'inquinamento e la distruzione degli ambienti umidi boscati, l'introduzione di pesci e crostacei predatori nelle pozze sono tra i principali fattori che compromettono la sopravvivenza delle popolazioni della *Rana dalmatina*. Inoltre è stato registrato un declino nelle popolazioni dell'Italia settentrionale causato da un'epidemia da un ceppo di Herpesvirus di tipo sconosciuto (Grossenbacher in Krone *et al.*, 1997; Bennati *et al.*, 1996).

La struttura genetica delle popolazioni di questa specie sia a scala dell'areale che sulle popolazioni italiane non è stata ancora studiata.

3. MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno presentati in forma cumulativa i materiali e i metodi utilizzati per l'analisi dei campioni delle tre specie studiate.

3.1 MATERIALI

Complessivamente sono stati analizzati 190 individui per la *Salamandra salamandra*, raccolti in 21 località rappresentative della attuale distribuzione della salamandra in Italia e in una località della Croazia (Tabella 1 e Figura 10); 201 individui per il *Lissotriton italicus* raccolti in 23 località rappresentative di tutto il suo areale (Tabella 2 e Figura 11) e per *Rana dalmatina* sono stati analizzati 244 individui campionati in 40 località, delle quali 33 sono rappresentative della attuale distribuzione della rana agile in Italia, e 7 corrispondono ad alcune località della Slovenia e della Croazia (Tabella 3 e Figura 12).

I campioni sono stati raccolti durante la stagione riproduttiva. Ad ogni individuo dopo anestesia per immersione in una soluzione allo 0.02% di acido 3-aminobenzoico ethyl-estere (MS 222) è stata praticata l'asportazione sul posto della porzione terminale di una falange (toe-clipping) o della coda (tail-clipping), secondo il protocollo suggerito da Heyer *et al.* (1994). I tessuti così prelevati sono stati momentaneamente conservati in azoto liquido, quindi trasferiti in laboratorio, in congelatori regolati a -80°C.

3.2 METODI

3.2.1 MARCATORI UTILIZZATI

I campioni di *S. salamandra* sono stati analizzati mediante marcatori nucleari, ovvero 15 enzimi codificati da 23 loci presuntivi e sia attraverso l'analisi di marcatore mitocondriale costituito da una regione del DNA mitocondriale interna al gene codificante per l'enzima Citocromo-b (Cyt-b), vedi Tabella 1.

I campioni di *Lissotriton italicus* sono stati analizzati attraverso l'analisi di due frammenti del DNA mitocondriale, il primo frammento (da qui in avanti denominato ND2) comprende porzione 3' del gene codificante per tRNA-Met, l'intero gene per la seconda subunità della

NADH deidrogenasi e la porzione 5' del gene codificante per tRNA-Trp. Il secondo frammento (da qui in avanti denominato ND4) comprende 3' del gene codificante per la quarta subunità della NADH deidrogenasi, la regione codificante per il gene tRNA-His e parte del gene tRNA-Ser.

Infine, i campioni di *Rana dalmatina* sono stati analizzati attraverso il sequenziamento di tre frammenti del DNA mitocondriale, il primo frammento è costituito da una regione del DNA mitocondriale interna al gene codificante per l'enzima Citocromo-b (Cyt-b), il secondo è costituito da una regione interna interna al gene codificante per l'enzima Citocromo ossidasi I (COI), mentre il terzo frammento è costituito da una regione interna al gene codificante per l'rRNA 16S (16S).

3.2.2 ELETTROFORESI DI SISTEMI GENE-ENZIMA

I 15 enzimi codificati da 23 loci presuntivi analizzati per i campioni di *S. salamandra* sono stati studiati mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido (Tabella 4). Il gel è stato preparato usando amido della Connaught Laboratories (Starch-hydrolyzed), sciolto in proporzione del 10% nella soluzione tampone specifica per ogni enzima (Tabella 5). La soluzione è stata portata all'ebollizione e poi degassata con una pompa a vuoto. Il gel è stato infine versato in piastre di plexiglas di 16 cm x 21,5 cm x 0,7 cm e lasciato raffreddare.

I campioni per l'analisi elettroforetica sono stati preparati omogenizzando meccanicamente su vetrini da orologio i frammenti di tessuto muscolare scheletrico raccolti, l'omogenato così ottenuto è stato diluito con qualche goccia di acqua distillata e poi è stato assorbito su cartellini di carta Whatman n°3 di 5mm x 5mm. I cartellini sono stati poi inseriti in pozzetti praticati nel gel per mezzo di un pettine sul lato lungo della piastra. Le piastre sono state portate in una camera termostata a circa +4°C e posti in delle vaschette provviste di elettrodi e contenenti il tampone specifici per la corsa dei vari enzimi. Il contatto tra gel ed elettrodi è assicurato da apposite spugnette. Il voltaggio e la durata della migrazione nel campo elettrico dipendono dall'enzima in esame e dal sistema tampone usato (range: 7-8V; 31/2-7 h). Alla fine dell'elettroforesi ogni gel è stato tagliato orizzontalmente con un filo di nylon (Ø 0.2 mm) e ciascuna parte è stata colorata per visualizzare uno specifico enzima (Tabella 6). 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 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 in una popolazione di riferimento, al quale viene assegnato il numero 100.

3.2.3 ESTRAZIONE, AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL DNA MITOCONDRIALE

Estrazione del DNA.

Per l'analisi del DNA mitocondriale, è stata effettuata l'estrazione del DNA totale con un 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-mercaptoetanol 0,2%)] e 15 µl di Proteinasi-K alla concentrazione di 20 mg/ml. Quindi il campione viene incubato per 1 ora a 37° C con 5 µl RNAasi alla concentrazione di 20 mg/ml, per evitare che l'RNA interferisca con la reazione di PCR (vedi in seguito). 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, si ottiene così una fase superiore acquosa contenente il DNA (il supernatante) sovrapposta ad una fase più pesante contenente i prodotti di scarto della lisi, e il supernatante verrà quindi recuperato e trasferirlo in un tubo pulito. 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 si possono separare più accuratamente le due fasi. L'ultimo supernatante recuperato viene quindi sottoposto al passaggio della precipitazione del DNA, questo passaggio avviene a -20°C grazie all'aggiunta di etanolo al 99% (1 ml) e NaCl (20 µl). Dopo 1 ora il campione viene prima centrifugato e poi l'etanolo al 99% viene sostituito con etanolo al 70% e centrifugato di nuovo per eliminare i sali residui. Il pellet di DNA ottenuto dopo la centrifugazione viene separato dall'etanolo e fatto asciugare a temperatura ambiente e risospeso in 100 µl di H₂O.

Amplificazione mediante PCR.

I frammenti di DNA mitocondriali selezionati per l'analisi dei campioni delle tre specie in esame sono stati ottenuti mediante una reazione a catena della polimerasi, PCR (Saiki *et al.*, 1988), che serve ad amplificare numerose volte uno specifico frammento di DNA a partire da una soluzione contenente tutto il DNA genomico.

Per ottenere la regione mitocondriale interna alla Citocromo-b (Cyt-b) per gli individui di

S. salamandra in un primo momento sono stati utilizzati dei primers generici per i tetrapodi: 494 (Kocher *et al.*, 1989) e MVZ16 (Moritz *et al.*, 1992); in seguito, sulle sequenze ricavate dalla prima amplificazione sono stati disegnati dei primers specifici: 494-salamod e CYTB-salamod (vedi Tabella 7).

Nella tabella 7 vengono riportate le informazioni sulle regioni analizzate per tutte le specie studiate come il nome e la sequenza dei primers usati, la Temperatura di annealing e grandezza del frammento studiato. Per quanto riguarda l'amplificazione dei diversi frammenti di mtDNA 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 le tre specie è stato usato lo stesso programma. Il programma utilizzato per i diversi frammenti era costituito da una fase iniziale di denaturazione a 94° C per 5' seguita da 36 cicli di amplificazione 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 7) 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.

Sequenziamento.

I prodotti di PCR sono stati inviati alla MacroGen Inc. (www.macrogen.com), per la purificazione e il sequenziamento. Il sequenziamento è stato eseguito usando un sequenziatore automatico modello ABI PRISM 377 DNA sequencer della PE Applied Biosystems seguendo il protocollo ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing. Per ogni individuo sono stati sequenziati entrambi i filamenti di DNA e questi sono stati allineati tra loro in modo da ottenere una lettura finale quanto più accurata possibile.

3.2.4 ANALISI STATISTICHE

3.2.4.1 DATI ALLOZIMICI

I dati ottenuti mediante l'elettroforesi sono stati utilizzati per studiare la distribuzione geografica della variazione genetica a livello nucleare e stimare i livelli di variabilità delle popolazioni. I programmi usati per le elaborazioni sono GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004), BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1999), ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) e BAPS 4

(Corander & Marttinen, 2006).

Variazione delle frequenze alleliche e variabilità genetica delle popolazioni.

Per la stima delle frequenze alleliche e dei livelli di diversità genetica delle popolazioni è stato utilizzato il software BIOSYS-2. Il livello di variabilità genetica di ciascuna delle popolazioni campionate è stato stimato utilizzando i seguenti parametri: il numero medio di alleli per locus (A); percentuale di loci polimorfici calcolato con il criterio del 95% (P_{95}); Eterozigosi media osservata (H_o) e attesa (H_e). L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato verificato per ogni locus polimorfico di ciascun campione sia attraverso il test del χ^2 che con il test esatto di Fisher (Finney, 1948), cui è stata applicata la correzione di Levene (1949) per i piccoli campioni. Il test esatto di Fisher è stato utilizzato anche per verificare il linkage disequilibrium. Infine, per ciascuna analisi è stata applicata 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 tests multipli.

Differenziamento allozimico e struttura delle popolazioni.

L'indice di distanza di Nei (Nei, 1978) è stato utilizzato per valutare il grado di divergenza genetica tra le popolazioni. Quest'indice è stato scelto in quanto risulta particolarmente indicato nell'analisi di dataset che includano anche campioni di ridotte dimensioni. A partire dalla matrice di distanza genetica tra coppie di popolazioni 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 dataset originario.

La struttura delle popolazioni è stata ulteriormente indagata attraverso un'analisi non gerarchica dei cluster utilizzando il metodo di Corander *et al.* (2006), sviluppato nel software BAPS 4. Questo metodo consente di individuare gruppi di popolazioni geneticamente omogenei e tra loro differenziati, definendo la migliore opzione di raggruppamento come quella che minimizza le deviazioni dagli equilibri di HW e di linkage. Rispetto ad altri metodi che applicano i medesimi criteri (v.d. ad es. Pritchard *et al.*, 2000), quello qui utilizzato consente di tener conto durante l'analisi delle coordinate di campionamento degli individui, considerate come informazione biologicamente significativa per l'organismo studiato.

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 permutazioni non parametriche (Excoffier *et al.*, 1992) attraverso il software ARLEQUIN 3.0.

3.2.4.2 DATI MITOCONDRIALI

Analisi delle sequenze.

Il programma CHROMAS PRO 1.34 (Technelysium, Pty, Ltd, Australia) è stato utilizzato per l'analisi e per la correzione delle sequenze ottenute dall'amplificazione dei diversi frammenti del DNA mitocondriale. Le sequenze sono poi state allineate con il programma CLUSTALX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997). Nell'allineamento delle sequenze di *Lissotriton italicus* sono emersi alcuni gap, che in tutte le successive analisi sono stati trattati come "missing data".

I software usati per le analisi statistiche sono stati: DnaSP 5.10.00 (Librado & Rozas, 2009), MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007), PAUP* 4.0B10 (Swofford, 2002), MODELTEST 3.6 (Posada & Crandall, 1998), jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008), TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005), SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), BAPS 4 (Corander & Marttinen, 2006).

Analisi delle sequenze, analisi filogenetiche e stima del network di Parsimonia

Il numero di siti polimorfici, la loro posizione, la natura ed il numero delle mutazioni, il numero complessivo di aplotipi sono stati accertati con il programma DnaSP. Con lo stesso programma è stata stimata la diversità genetica delle popolazioni campionate e dei maggiori gruppi di aplotipi individuati nei dataset delle tre specie 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).

L'analisi filogenetica per i campioni di *S. salamandra* e di *L. italicus* è stata condotta attraverso la costruzione di uno o più alberi filogenetici. Poiché per ciascuna specie sono stati utilizzati metodi di costruzione degli alberi e modelli di evoluzione diversi, le metodiche applicate verranno descritte separatamente per ogni dataset.

Salamandra salamandra : Le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi individuati sono state indagate attraverso la costruzione di un albero filogenetico utilizzando il metodo di Neighbour

Joining (NJ) mediante il software PAUP* 4.0b10. Il modello di evoluzione delle sequenze utilizzato per quest'analisi è stato scelto attraverso lo Hierarchical Likelihood Ratio Test implementato dal software MODELTEST, il quale, tra 56 modelli alternativi, ha indicato il modello GTR+I (Hasegawa *et al.*, 1985) con una proporzione di siti invariante pari a 0.77 come il più adatto al dataset della salamandra. Come outgroup è stata utilizzata una sequenza ottenuta da un individuo di *Salamandra lanzai*. Il supporto statistico associabile a ciascun nodo dell'albero è stato ottenuto mediante la procedura del bootstrap non-parametrico, su 1000 pseudorepliche.

***Lissotriton italicus*:** 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 con il dataset con i due frammenti combinati. Le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi individuati sono state indagate attraverso la costruzione di due alberi filogenetici utilizzando il metodo di Massima Parsimonia (MP) e quello di Maximum Likelihood (ML). L'analisi della MP è stata effettuata tramite il software PAUP*4.0B10 considerando tutti i caratteri non ordinati ed ugualmente pesati, e la ricerca è stata condotta con il metodo euristico. L'albero filogenetico ML è stato invece costruito attraverso il software PHYML-ONLINE. Il modello di evoluzione delle sequenze è stato scelto con il test basato sul Bayesian Information Criterion 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 dataset del tritone. Inoltre, nella costruzione dell'albero di ML, è stato utilizzato come albero di partenza quello determinato dalla BioNJ analysis. 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 degli alberi di MP e ML è stato ottenuto mediante la procedura del bootstrap non-parametrico, su 1000 pseudorepliche.

Le relazioni di affinità tra gli aplotipi all'interno dei dataset delle tre specie sono 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%.

The time to the most recent common ancestor (TMRCA)

Il tempo di coalescenza (TMRCA) tra i cladi principali individuati dall'analisi filogenetica dei campioni di *Lissotriton italicus* è stato stimato con il programma Beast 1.4.8 (Drummond &

Rambaut, 2006). 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 lognormale 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 come 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 “tree prior” poiché tra i tree prior è 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 20 milioni di step (Markov chain Monte Carlo; MCMC), campionati ogni 1000 step, ed è stato scartato il primo 10% di step 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 *et al.*, 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 è stato utilizzato il tempo stimato da Zhang *et al.* (2008) per la divergenza tra *Mesotriton alpestris* e *L. vulgaris*. Questo valore è stato scelto poiché è stato ricavato dagli autori 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). Quindi 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. Pertanto il 95% del range centrale della distribuzione di questo “prior” è risultata pari a 17.1-24.3 milioni di anni.

Differenziamento e struttura genetica delle popolazioni.

Nella *S. salamandra*, il grado di suddivisione presente nell'intero dataset e tra coppie di popolazioni è stato stimato calcolando i valori di F_{ST} generale (Wright, 1965) con lo stimatore *theta* (Weir & Cockerham, 1984), utilizzando il software ARLEQUIN. La significatività è stata testata con 1000 permutazioni. Questa analisi è stata condotta utilizzando il modello di Tamura & Nei (Tamura & Nei, 1993), il più affine a quello GTR selezionato come il migliore per il set di dati in oggetto. Inoltre, nella *S. salamandra*, la struttura genetica è stata integrata attraverso un'analisi spaziale della varianza molecolare implementata dal software SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). Tale analisi porta all'identificazione di gruppi di popolazioni geograficamente omogenei e massimamente differenziati dal punto di vista genetico, e permette quindi di

evidenziare significative discontinuità geografiche nella distribuzione della variazione genetica (Dupanloup *et al.*, 2002). In quest'analisi il numero di gruppi (k) viene stabilito a priori ed il software calcola la ripartizione delle popolazioni nei gruppi in modo da massimizzare la porzione della varianza genetica totale spiegata dalla differenza tra i gruppi (F_{CT}). Il numero di gruppi che massimizza tale proporzione individua il raggruppamento ottimale. Il raggruppamento suggerito da questa procedura è stato poi utilizzato per effettuare l'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) sul dataset mitocondriale, tenendo conto della distanza genetica di Tamura e Nei (1993), al fine di individuare la proporzione di varianza attribuibile al differenziamento tra gruppi, tra popolazioni all'interno dei gruppi e all'interno delle popolazioni. L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA) è stata effettuata anche sul dataset mitocondriale del *L. italicus*, tenendo conto del modello TrN+ Γ (con gamma 0,142), utilizzando come raggruppamento delle popolazioni la distribuzione geografica dei 8 cladi terminali individuati dall'analisi filogenetica. Inoltre, per poter verificare una possibile correlazione significativa tra le distanze genetiche e le distanze geografiche che separano le popolazioni è stato effettuato il Mantel test. Una eventuale correlazione tra le due distanze indica che la struttura genetica delle popolazioni studiate è conforme ad uno scenario di isolamento per distanza. Le distanze genetiche sono state calcolate come $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ dove il valore di F_{ST} è stato stimato con ARLEQUIN, usando il modello TrN+ Γ come modello di divergenza delle sequenze. Le distanze geografiche tra le coppie di popolazioni è stata trasformata in logaritmo (Rousset, 1997). La consistenza della correlazione tra le due matrici è stata valutata attraverso un'analisi di regressione con il metodo “reduced major axis” (RMA), utilizzando il software IBD (Jensen *et al.*, 2005) disponibile on-line.

Nella *R. dalmatina* la struttura genetica è stata analizzata attraverso un'analisi non gerarchica dei cluster utilizzando il metodo di Corander *et al.* (2006), sviluppato dal software BAPS 4.

Test di demografia storica

I trend della demografia storica dei principali cladi emersi dall'analisi filogenetica a livello del mtDNA sono stati indagati attraverso l'analisi della distribuzione delle differenze tra coppie di sequenze (“*mismatch distribution*”) (Rogers & Harpending, 1992; Rogers, 1995) effettuata con il programma ARLEQUIN. La distribuzione delle differenze tra coppie di sequenze è stata confrontata con quella attesa sia in caso di rapida espansione demografica (Rogers & Harpending, 1992) che con quella attesa in caso di espansione spaziale (Excoffier, 2004). La consistenza delle distribuzioni osservate con quelle attese è stata valutata attraverso una procedura di bootstrap parametrico condotta su i valori di “*raggedness*”, r (Harpending, 1994), e sulla somma del quadrato

della deviazione (SSD) tra i valori della distribuzione delle differenze tra coppie di sequenze osservate e quelle attese. Tale analisi è stata effettuata con il software ARLEQUIN. Valori significativi per questi indici ($P \leq 0,05$) indicano una deviazione dall'ipotesi nulla di espansione della popolazione.

Inoltre, per poter verificare un possibile contributo di passati eventi di espansione demografica nel determinare la struttura genetica osservata, è stata utilizzata anche la statistica F_S di Fu (Fu, 1997) calcolata con il software DnaSP. Tale parametro valuta l'eccesso di mutazioni recenti e rare rispetto all'attesa in caso di neutralità selettiva o stasi demografica. Valori negativi e significativi di F_S indicano un eccesso di queste mutazioni imputabile ad un evento di espansione demografica della popolazione, in assenza di selezione. Per valutare la significatività del valore ottenuto per F_S con il programma DnaSP è stata generata una distribuzione empirica del parametro tramite simulazioni basate sul processo di coalescenza, inserendo il valore di $\theta (=2N\mu)$ stimato dai dati (Tajima, 1993), dove N rappresenta la dimensione effettiva della popolazione e μ il tasso di mutazione per generazione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 *SALAMANDRA SALAMANDRA*

4.1.1 RISULTATI

4.1.1.1 DATI ALLOZIMICI

Variazione delle frequenze alleliche e variabilità genetica delle popolazioni

Dei 23 loci analizzati, 5 sono risultati monomorfi per lo stesso allele in tutte le popolazioni studiate (*Mdhp-2*, *Mpi*, *Sod-1*, *Aat-2* ed *Ldh*). Le frequenze alleliche per i loci polimorfici vengono riportati nella Tabella 8. Tra questi, 5 loci risultano polimorfici per la presenza in alcune popolazioni di un allele a bassa frequenza (*Ada-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Icdh-1*, *Icdh-2* e *Mdhp-1*). Dei restanti loci polimorfici, in 8 (*Ldh-1*, *a-Gpdh*, *Aat-1*, *Est-3*, *Pep-3*, *Sod-2*, *Ada-2* e *Np*) si evidenzia una forte correlazione tra la distribuzione delle frequenze alleliche e la geografia (Figura 13). Tra questi, sette loci (*Ldh-1*, *a-Gpdh*, *Est-3*, *Pep-3*, *Sod-2*, *Ada-2*, *Aat-1*) presentano degli alleli esclusivi con valore diagnostico tra le popolazioni della fascia alpina e di Makarska rispetto alle popolazioni campionate lungo la fascia appenninica. Frequenze alleliche intermedie tra i due gruppi sono state osservate nelle popolazioni geograficamente intermedie, ovvero nelle popolazioni campionate nell'area compresa tra l'Appennino ligure e quello settentrionale, con prevalenze dell'allele "Appenninico" o "Alpino" diverse ai vari loci per le varie popolazioni. Inoltre, al locus *Ada-2* si osservano alleli che caratterizzano non solo le popolazioni alpine ma anche alleli che distinguono le popolazioni dell'Appennino settentrionale (12-14) da quelle dell'Italia centro-meridionale. Mentre al locus *Np*, differenze di valore diagnostico sono state evidenziate fra le popolazioni dell'Italia centro-meridionale fino al limite nord del bacino del Volturno (1-10) da una parte e tutte le popolazioni campionate nel resto dell'Italia settentrionale dall'altra. Un pattern molto complesso è emerso al locus *Aat-1*, in questo locus infatti sono stati individuati 8 alleli, ciascuno dei quali risulta diffuso all'interno di un'area geografica ben delimitata, dalla tabella 8 e dalla figura 13 possiamo infatti osservare come 4 alleli sono presenti solo nelle popolazioni della fascia alpina, e gli altri 4 risultano delimitati in diverse aree dell'Italia meridionale, come ad esempio l'allele *Aat-1*¹⁰² che lo si osserva solo nelle popolazioni tra l'area del Pollino e del bacino del fiume Volturno con frequenze comprese tra 0,63 e 1. Infine, ai loci *Pgm-1* e *Pgm-2* sono state osservate nella popolazione di Colle S. Bartolomeo (18) frequenze assai elevate

(0,70) per un allele precedente descritto come caratteristico della sottospecie *S. s. terrestris* (Olivieri, 1991).

Non sono stati evidenziati significativi disequilibri di HW né disequilibri di linkage in nessuno dei test effettuati.

Le stime della variabilità genetica delle popolazioni sono presentate in Tabella 9. Il numero medio di alleli per locus varia da 1,0 ad 1,3, mentre la proporzione di loci polimorfici varia da 4,3% a 34,8%. L'eterozigosi osservata ed attesa hanno invece mostrato variazione nei range 0,014-0,128 e 0,012-0,119 rispettivamente. Le stime dei parametri di diversità genetica con valori più bassi sono state registrate in due popolazioni della Calabria centrale (4 e 5), mentre valori particolarmente elevati a tutti gli indici calcolati sono stati osservati per la popolazione di Colle S. Bartolomeo (18).

Struttura genetica delle popolazioni

In Tabella 10 è mostrata la matrice delle distanze genetiche tra coppie di popolazioni calcolata in base all'indice di Nei (1978), mentre il fenogramma UPGMA costruito a partire da essa è mostrato in Figura 14A. Nel fenogramma le popolazioni della *S. salamandra* vengono suddivise in due cladi principali, un clade altamente supportato (97% di bootstrap) comprende le popolazioni della Liguria, dell'arco alpino e di Makarska (16,18-22), mentre l'altro clade comprende tutte le altre popolazioni campionate nel resto dell'Italia peninsulare (1-14). La distanza genetica media tra i due cladi è risultata pari a 0.40 (D_{NEI} , Nei, 1978). Il clade delle popolazioni dell'Italia peninsulare è suddiviso a sua volta in due cladi supportati da valori di bootstrap maggiori del 50%, un clade comprende le popolazioni dell'Appennino settentrionale (12-14), mentre l'altro è costituito dalle popolazioni dell'Italia centro-meridionale (1-10). All'interno di quest'ultimo, solo il subclade che racchiude le popolazioni calabresi è ben supportato da un alto valore di bootstrap (63%).

L'analisi non gerarchica dei cluster condotta con il software BAPS ha indicato come la miglior opzione di raggruppamento dei campioni sia quella costituita da 7 cluster (Figura 14B). Dal software BAPS le popolazioni di *S. salamandra* vengono così ripartite: le popolazioni calabresi (1-5) vengono incluse insieme nello stesso cluster (cluster I), come pure le popolazioni del Pollino e del versante meridionale del bacino del Volturno (cluster II, popolazioni 6-9), mentre la popolazione 10 sul versante settentrionale del bacino del Volturno da sola costituisce il cluster III, invece, le popolazioni dell'Appennino settentrionale (12-14) sono ascritte insieme nel cluster IV, mentre le due popolazioni liguri (16 e 18) vengono divise in due cluster distinti, il V e il VI, infine, il cluster VII comprende le popolazioni campionate lungo l'arco alpino e a Makarska (19-22).

La suddivisione delle popolazioni in cluster ottenuta con BAPS è stata poi utilizzata per l'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992), e il risultato di tale analisi viene riportato nella Tabella 11. L'AMOVA ha indicato come il 74% della varianza totale risulti ascrivibile alle differenze tra i gruppi, mentre il 20% sia imputabile alle differenze all'interno delle popolazioni e solo il 6% a differenze tra popolazioni all'interno dei gruppi.

4.1.1.2 DATI MITOCONDRIALI

Analisi delle sequenze e variabilità delle popolazioni

Un frammento di DNA mitocondriale della lunghezza di 582 paia di basi, interno al gene codificante per l'enzima Citocromo-b, è stato ottenuto per tutti i 153 individui analizzati.

Complessivamente sono stati individuati 13 aplotipi definiti da 25 siti variabili, di questi 21 sono localizzati in terza posizione, 2 in seconda e 2 in prima. Non sono state osservate inserzioni né delezioni. Complessivamente sono state osservate 3 sostituzioni aminoacidiche.

Le stime di diversità genetica mitocondriale per le singole popolazioni sono riportate in Tabella 9. La maggior parte delle popolazioni studiate sono risultate del tutto prive di diversità genetica al frammento mitocondriale studiato. Tra quelle aventi diversità non nulla, la diversità aplotipica varia tra 0,20 e 0,66, mentre la diversità nucleotidica varia tra $0,345 \cdot 10^3$ e $9,431 \cdot 10^3$. A quest'ultimo parametro, un valore di diversità particolarmente elevato ($9,431 \cdot 10^3$) è stato osservato per la popolazione di Giffoni (8), l'unica dove sono risultati compresenti aplotipi appartenenti ai due principali cladi mitocondriali osservati (v.d. di seguito).

Analisi filogenetiche, network di parsimonia e distribuzione geografica degli aplotipi

L'albero di NJ raffigurante le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi individuati e basato sulla distanza GTR+I è mostrato in figura 15A. Dall'analisi filogenetica gli aplotipi vengono suddivisi in due cladi principali entrambi ben supportati. Il primo clade (“settentrionale”) comprende 6 aplotipi tra loro strettamente affini, osservati tra gli individui campionati a Markaska e nelle popolazioni dell'Italia settentrionale fino a sud del bacino del fiume Volturno (8-22). Il secondo clade (“meridionale”) comprende invece 7 aplotipi osservati negli individui campionati nell'Italia meridionale, dalla Calabria fino al margine sud del bacino del fiume Volturno (1-8). Proprio in quest'ultima area, e più precisamente nella popolazione di Giffoni (8), alcuni aplotipi presenti nei due cladi sono risultati essere co-presenti, tuttavia in questa popolazione gli aplotipi del clade settentrionale sembrano essere quelli prevalenti (86% delle osservazioni). La divergenza media percentuale tra i due cladi è risultata essere pari al 2,7%

($\pm 0,7\%$ SE). All'interno dei cladi principali troviamo dei subcladi ben supportati con valori di bootstrap superiori al 60%, in particolare, nell'ambito del primo clade, un sub-clade è costituito da due aplotipi (n2 e n3) trovati esclusivamente nelle popolazioni del bacino del Volturo (8-10, vedi Tabella 9), mentre, nell'ambito del secondo clade osserviamo 2 sub-cladi, uno costituito dagli aplotipi c1 e c2, trovati nelle popolazioni da 6 a 8, e l'altro comprende gli aplotipi s4 e s5, osservati solo nella popolazione di Fagnano Castello (5).

La costruzione dei Network di massima parsimonia statistica, condotta con il criterio del limite di parsimonia fissato a 95%, non ha connesso tutti gli aplotipi in un unico network ma bensì in due (Figura 15B). Gli aplotipi compresi in ciascun network corrispondono a quelli dei due cladi principali dell'albero di NJ.

Struttura e differenziamento genetico delle popolazioni

Complessivamente, il grado di differenziamento genetico osservato a livello dell'intero dataset è risultato particolarmente elevato ed altamente significativo, con un valore di F_{ST} pari a 0,95 ($P < 0,001$). I valori di differenziamento tra coppie di popolazioni (F_{ST}), calcolati tenendo conto del modello di evoluzione delle sequenze di Tamura-Nei (1994), sono riportati in Tabella 12. Valori nulli di F_{ST} sono stati osservati in quasi tutti i confronti a coppie tra popolazioni campionate a nord del bacino del fiume Volturno (popolazioni 12-22), con la sola eccezione delle popolazioni 16 e 17, nonché tra quelle provenienti dal bacino stesso (8-11), tra quelle campionate in Calabria centrale e meridionale (1-4), e tra le popolazioni 6 e 7. Inoltre, con la sola eccezione di alcuni dei confronti riguardanti la popolazione 8, in tutti gli altri casi sono stati osservati di F_{ST} maggiori di 0,70.

Nella figura 16 viene riportata la rappresentazione grafica della variazione della percentuale di varianza complessiva spiegata dalle differenze tra i gruppi al variare del numero di gruppi (k), ottenuta attraverso l'analisi SAMOVA. Il valore di F_{CT} è risultato alto e significativo già con $K=2$, e per tale k il valore della percentuale di variazione dovuta a differenze tra i gruppi è risultato pari al 92%. Tuttavia il numero ottimale per il raggruppamento che massimizza questo valore è $K=6$. Con questa opzione, il valore della percentuale della variazione totale osservata nel dataset mitocondriale, imputabile alle differenze tra gruppi, sale a 96,49%. Nell'analisi con $k=6$, le popolazioni vengono ripartite nei sei gruppi come segue: un primo gruppo è costituito dalle popolazioni settentrionali (12-21) e Makarska (22), esclusa la popolazione di Valle Calda (16), che da sola costituisce un gruppo a parte, un altro gruppo è costituito dalle popolazioni del bacino del fiume Volturno (8-11), le popolazioni 6-7 costituiscono un altro gruppo ancora, mentre le popolazioni calabre vengono suddivise in 2 gruppi con le popolazioni dell'Aspromonte da una parte e quella della Catena Costiera (5) dall'altra.

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA) effettuata sul dataset mitocondriale, tenendo conto della distanza genetica di Tamura e Nei (1993) e considerando le popolazioni suddivise nei gruppi individuati dall'analisi SAMOVA, viene riportata in tabella 13.

Test di demografia storica

L'analisi di demografia storica è stata condotta a livello dei due principali aplogruppi individuati dall'analisi filogenetica, quello settentrionale e quello meridionale. Il risultato dell'analisi della frequenza delle differenze tra coppie di aplotipi, “*mismatch distribution*”, viene riportato nella figura 17. Per quanto riguarda l'aplogruppo settentrionale, la distribuzione delle differenze tra coppie di aplotipi osservate è regolare e unimodale, conforme a quella attesa in casi di rapida espansione demografica, mentre quella dell'aplogruppo meridionale è risultata chiaramente bimodale. Tuttavia in entrambi i casi il test di coalescenza condotto sia su r (0,14 e 0,026 rispettivamente) sia su F_S (-2,19 e -0,88 rispettivamente) ha mostrato valori statisticamente non difforni da quelli attesi secondo l'ipotesi nulla di stasi demografica.

4.1.2 DISCUSSIONI

L'analisi della variazione genetica in *S. salamandra*, condotta su un campionamento più rappresentativo delle popolazioni italiane (22 siti) e attraverso l'utilizzo di marcatori sia mitocondriali (Cyt-b) che nucleari (23 loci allozimici), ha restituito un pattern di diversità genetica assai più complesso ed articolato rispetto a quello emerso nel lavoro di Steinfarz *et al.* (2000). Infatti, è emerso un pattern della variabilità genetica caratterizzato da un forte grado di strutturazione geografica. L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA) condotta sia sul dataset mitocondriale che nucleare ha indicato come gran parte della variazione sia da attribuire proprio alla differenza tra gruppi di popolazioni (74% per i dati nucleari e 96% per i dati mitocondriali). Tuttavia, ciascun marcatore colloca la principale discontinuità filogeografica in aree geografiche diverse. I marcatori nucleari individuano nell'area ligure (popolazioni 14-18) la zona di contatto tra le due forme principali, concordando in questo con quanto precedentemente ipotizzato da Lanza (1983) sulla base morfologica. Tale discontinuità è supportata da sette loci diagnostici (*Ldh*, *a-Gpdh*, *Aat-1*, *Est-3*, *Pep-3*, *Sod-2*, *Ada-2*). Il marcatore mitocondriale invece individua la zona di transizione tra le due aploforme principali nel versante meridionale del bacino del fiume Volturno. Due ipotesi opposte si possono formulare per spiegare tale discordanza: 1) l'evento di contatto tra le due sottospecie di *S. salamandra* in Italia è avvenuto nell'area ligure, e in seguito ad esso si sarebbe verificata una massiccia introgressione della forma

mitocondriale settentrionale in quella meridionale; 2) l'evento di contatto è avvenuto nei pressi del bacino del fiume Volturno, e in seguito ad esso si sarebbe verificata in questo caso una massiccia introgressione dalla forma meridionale verso la settentrionale ai soli loci allozimici. Tuttavia, la sostanziale concordanza ai sette loci allozimici diagnostici, rende del tutto improbabile questa seconda ipotesi.

L'esistenza di difformità nei pattern di introgressione genica nucleare e mitocondriale, ed in particolare un eccesso di quest'ultima, a seguito di contatti secondari tra linee vicarianti è stata messa in evidenza in un gran numero di casi di studio, ed in particolare è emerso come proprio l'mtDNA sia il più incline all'introggressione rispetto ai loci nucleari, sia tra linee ben differenziate che perfino tra specie distinte (Ballard & Whitlock, 2004) e per spiegare tali pattern sono state avanzate diverse ipotesi (per una rassegna completa vedi Ballard & Whitlock, 2004). In questo caso le ipotesi più probabili che possano spiegare il pattern osservato con l'introggressione mitocondriale predominante sono quelle relative ad un flusso genico disomogeneo tra i sessi, con maggiore flusso genico a carico delle femmine, oppure ipotesi che vedono a vario titolo coinvolti eventi di selezione. I dati mitocondriali portano ad escludere l'ipotesi di un massiccio flusso genico a carico delle femmine, infatti il forte isolamento osservato per la popolazione di Vallecaldà (16) e per quelle nei pressi del bacino del fiume Volturno (8-11), insieme al basso grado di divergenza degli aplotipi fissati in queste popolazioni, suggeriscono piuttosto un pattern di ridotto flusso genico tra popolazioni e che l'introggressione osservata sia di recente origine. Proprio il ridotto flusso genico, e il pattern di frammentazione della specie lungo la penisola, evidente anche a livello allozimico, ci fa propendere per un possibile ruolo di fenomeni di introgressione selettivamente favorita a carico del condrioma per spiegare il pattern complessivo di variazione osservato. Infatti, in casi di forte frammentazione delle popolazioni, per azione della deriva vi è una non trascurabile probabilità di fissazione nelle popolazioni di alleli debolmente deleteri soprattutto a carico del genoma mitocondriale, costitutivamente sottoposto ad un grado quattro volte maggiore di deriva genetica, non in grado di fruire dei vantaggi derivati dalla ricombinazione, e maggiormente soggetto a fenomeni di "*mutational meltdown*" e "*Muller's ratchet*" (Felsenstein, 1974; Birky-Jr *et al.*, 1989; Gabriel *et al.*, 1993).

Inoltre, è interessante notare che proprio in prossimità del bacino idrografico del fiume Volturno, sede della principale discontinuità filogeografica a livello mitocondriale, viene rinvenuta anche la seconda importante discontinuità geografica a livello nucleare, tre loci con variazione genica diagnostica supportano tale discontinuità (*Np*, *Ada-2* e *Aat-1*). Tuttavia la coincidenza tra questa discontinuità non è perfetta, infatti le popolazioni 9 e 10 nel dataset nucleare vengono ascritte al gruppo meridionale, e non a quello settentrionale come nel dataset mitocondriale. Ciò indica l'esistenza di due gruppi di popolazioni moderatamente differenziati all'interno della forma

appenninica (*S. salamandra giglioli*). Inoltre sempre all'interno della forma appenninica della *S. s. giglioli* si osserva un moderato grado di differenziazione tra le popolazioni della Calabria settentrionale e meridionale sia nel dataset mitocondriale che in quello nucleare, proprio in corrispondenza di una delle maggiori aree di discontinuità filogeografica osservata in altre specie (Podnar *et al.*, 2005; Canestrelli *et al.*, 2008b).

Complessivamente, lo scenario che sembrerebbe spiegare meglio i dati fin qui discussi prevederebbe dunque un contatto secondario tra *S. s. salamandra* e *S. salamandra giglioli* nell'area ligure, cui avrebbe fatto seguito una introgressione selettivamente favorita del condrioma della forma nominale in quella peninsulare, tale da soppiantare completamente quest'ultima fino alla piana del Volturno, area di transizione tra il gruppo meridionale e settentrionale di *S. salamandra giglioli*. La prevalenza dell'aploforma tipica di *S. s. salamandra* nelle popolazioni 8-9, suggerisce inoltre che essa abbia recentemente superato anche quest'ultima discontinuità geografica. In futuro sarà interessante studiare con maggior dettaglio l'area di attuale sintopia tra le due aploforme, anche al fine di valutarne la possibile evoluzione nel tempo e nello spazio (Buggs, 2007).

Infine, un ulteriore aspetto di particolare interesse relativamente al contatto secondario avvenuto nell'area ligure, emerge dall'osservazione della variazione genetica nucleare nella popolazione di Colle S. Bartolomeo. In questa popolazione infatti si è osservata ai loci *Pgm-1* e *Pgm-2* un'elevata frequenza di alleli precedentemente descritti come caratteristici della forma *S. salamandra terrestris* (Olivieri, 1991), presente sul versante francese dell'arco alpino. Ciò suggerisce che il contatto secondario, possa essere avvenuto non tra due ma, caso unico, tra tre distinte entità (*S. s. salamandra*, *S. s. giglioli* e *S. s. terrestris*). Ciò appare anche supportato dal grado particolarmente elevato di eterozigosi osservato in questa popolazione, sia se confrontata con le altre popolazioni conspecifiche (v.d. Tabella 9), che con il valore medio osservato negli Urodela Salamandridi ($He=0,058$; Nevo & Beiles, 1991). Quest'ultima osservazione appare infine particolarmente meritevole di ulteriori indagini, dal momento che, proprio in virtù della sua unicità, essa presenta un grande potenziale di incidere efficacemente sul dibattito, recentemente riaccesi, sul ruolo dei fenomeni di ibridazione introgressiva nella formazione dei così detti *hotspot* di diversità genetica intraspecifica (per es. Canestrelli *et al.*, 2006a; Canestrelli *et al.*, 2007).

Concludendo, appare dunque che uno scenario di stasi demografica durante le fasi glaciali seguita da espansione postglaciale, non spieghi affatto il pattern complessivamente osservato in *S. salamandra* in Italia. Questo è risultato invece caratterizzato da una forte strutturazione geografica delle popolazioni e da un complesso pattern di introgressione differenziale ai vari loci, elementi tali da indicare come l'attuale variazione geografica della specie in Italia sia il frutto di una pletora di processi microevolutivi, sia di natura stocastica che dipendenti da selezione. Inoltre, si

evidenza come l'area di *melting spot* delle popolazioni italiane di *S. salamandra*, localizzato presso l'Appennino ligure e quello settentrionale, sia anche la sede dell'*hotspot* di diversità intraspecifica. Pertanto, l'origine di tale *hotspot* viene attribuita principalmente proprio ai processi di frammentazione, contatto secondario seguito da ibridazione introgressiva.

4.2 LISSOTRITON ITALICUS

4.2.1 RISULTATI

Analisi delle sequenze

Per tutti gli individui di *L. italicus* analizzati (n=201) sono stati ottenuti due frammenti di DNA mitocondriale, il primo è l'ND2 della lunghezza di 1137 paia di basi (bp), costituito da 60bp del gene tRNA-Met, 1039 bp del gene della seconda sub-unità della NDH deidrogenasi e 38 bp del gene tRNA-Trp, mentre il secondo frammento è l'ND4 lungo 760 bp, ed è costituito da 648 bp del gene per la quarta subunità della NDH deidrogenasi, da 70 bp del gene tRNA-His e da 42 bp del gene tRNA-Ser. Le analisi sono state condotte cumulando per ciascun individuo i due frammenti, pertanto ogni sequenza risulta complessivamente di 1897 bp, con 183 siti variabili, di questi 153 sono informativi ai fini della parsimonia, e nel complesso sono stati osservati 3 gaps, ciascuno costituito da una sola posizione. Quando nell'allineamento vengono incluse anche le sequenze relative ai due outgroups (*M. alpestris* e *L. vulgaris*) la matrice dei dati comprende 1903 caratteri per ciascun individuo, con 593 siti variabili e 252 siti informativi ai fini della parsimonia, con 6 gaps (con lunghezza da 1bp a 4bp).

Complessivamente sono stati individuati 43 aplotipi, la loro distribuzione tra le popolazioni è riportata nella tabella 2.

Analisi filogenetiche, network di parsimonia e distribuzione geografica degli aplotipi

L'albero ML raffigurante le relazioni tra gli aplotipi individuati e basato sul modello di evoluzione TrN+Γ con gamma = 0,142 è mostrato in figura 18A. Il valore di log-likelihood score per il miglior albero di ML è risultato essere pari a -5951,96. Mentre, con l'analisi di MP sono stati ottenuti 8 alberi molto parsimoniosi, 768 steps in length (consistency index = 0,870; retention index = 0,945). La topologia degli alberi costruiti con le due metodologie (ML e MP) è risultata pressoché identica. Nel dendrogramma sono evidenti due cladi principali, N ed S, ciascuno dei quali è suddiviso in altri cladi e sottocladi, complessivamente si osservano ben 8 sottocladi, tutti altamente supportati con l'unica eccezione per il clade CI. Per ciascun clade e sottoclade è

evidente una forte corrispondenza con la geografia. Il primo dei 2 cladi principali (N) è ampiamente distribuito in gran parte dell'areale del *L. italicus*, dal limite settentrionale fino alla Calabria centro-occidente (popolazioni 1-16), mentre il secondo clade (S) è diffuso nel resto della Calabria centro-meridionale (popolazioni 17-23). Gli aplotipi dei 2 cladi principali non sono mai stati osservati in sympatria. La divergenza genetica netta tra questi due cladi principali è risultata essere pari al 6,8% (1,0% SE).

Il clade N è suddiviso in due cladi (D e C) tra i quali la divergenza netta è risultata essere pari al 1,9% (0,4% SE), il clade D comprende tutti gli aplotipi osservati nelle popolazioni più settentrionali e centrali compreso l'area del Gargano e del Cilento (1-9), mentre il clade C è costituito dagli aplotipi osservati nelle popolazioni meridionali fino alla Calabria centro-occidentale (10-16). Inoltre, sia il clade D che C sono suddivisibili ciascuno in 2 aplogruppi, ognuno dei quali presenta una distribuzione geografica ben definita (vedi Figura 18).

Per quanto riguarda il clade S, anche questo clade risulta essere suddiviso in due cladi (A e B), tra questi cladi la divergenza è risultata essere pari al 1,3% (0,3% SE). Il clade B è composto da tutti gli aplotipi osservati esclusivamente nell'area corrispondente alla catena montuosa della Sila (popolazioni 17-18). Il clade A invece è suddiviso in tre aplogruppi, uno dei quali è costituito da aplotipi osservati in Aspromonte (clade AI, popolazioni 22 e 23), mentre gli altri due cladi presentano gli aplotipi osservati rispettivamente a nord e a sud della piana di Catanzaro, (clade AII, popolazioni 20 e 21 e clade AIII, popolazione 19). Gli unici casi di co-presenza di aplotipi appartenenti a cladi diversi sono stati osservati nella popolazione 9, con aplotipi del clade DI e DII, e nella popolazione 19 con aplotipi del clade AII e AIII.

I network di massima parsimonia statistica sono riportati nella figura 18C. 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 5 networks distinti. Tra i network e i cladi individuati dall'analisi filogenetica si osserva un'ottima corrispondenza, in particolare ai cladi B, C e D corrispondono altrettanti networks, mentre al clade A ne corrispondono 2.

The time to the most recent common ancestor (TMRCA)

La stima del tempo di coalescenza (time to the most recent common ancestor, TMRCA) per i cladi individuati dall'analisi filogenetica vengono mostrati nella tabella 14. Per tutti i cladi terminali (AI-AIII, B, CI, CII, DI e DII), la stima del tempo di coalescenza ricade all'interno del Late Pleistocene superiore (circa 10 000 -125 000 anni fa), mentre la stima del TMRCA per i cladi compresi nei due cladi maggiori (clades A, C, D, N e S) suggerisce una divergenza risalente al Pleistocene Medio. In fine la divergenza tra i due cladi principali è stimata circa 1,7 milioni di anni

fa, quindi tra la fine del Pliocene e l'inizio del Pleistocene.

Struttura e differenziamento genetico delle popolazioni

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA) è stata condotta utilizzando come raggruppamento delle popolazioni la distribuzione geografica dei 8 aplogruppi individuati dall'analisi filogenetica (AI-DII vedi figura 18A). Le differenze tra gruppi sono risultate tali da spiegare il 97,26% della variazione osservata a livello dell'intero dataset, mentre una porzione minima della variazione viene attribuita alle differenze all'interno dei gruppi (1,73%) e alle differenze all'interno delle popolazioni (1,01%, vedi tabella 15). Tutte le componenti della variazione sono risultate statisticamente altamente significative ($P < 0,01$).

I valori delle stime della diversità genetica mitocondriale per i singoli aplogruppi evidenziati dall'analisi filogenetica (AI-DII) sono presentate in tabella 14. La diversità nucleotidica varia tra $0,23 \times 10^3$, osservata nel clade AIII, e $2,16 \times 10^3$, osservato nel clade AI. anche la diversità aplotipica è risultata più bassa nel clade AIII (0,59) mentre il valore più alto più alto è stato osservato nel clade CI (0,83).

Il Mantel Test ha indicato una debole ma significativa correlazione tra la matrice delle distanze genetiche ($F_{ST}/(1 - F_{ST})$) e quella delle distanze geografiche ($R^2=0.08$; $P<0.01$) indicativa di un pattern di isolamento per distanza tra le popolazioni studiate.

Test di demografia storica

L'analisi di demografia storica è stata condotta a livello dei cladi terminali individuati dall'analisi filogenetica (AI-DII). I risultati dell'analisi della frequenza delle differenze tra coppie di aplotipi, “*mismatch distribution*”, e dei test effettuati per l'analisi della demografia storica sono riportati in figura 19. Per gli aplogruppi AI, AII, B e CI la distribuzione osservata delle differenze tra coppie di aplotipi è risultata simile solo a quella attesa in caso di espansione spaziale, tuttavia solo per gli aplogruppi AI e CI i valori di SSD e r portano a rifiutare l'ipotesi nulla di rapida espansione demografica ma non quella spaziale. Mentre, per gli aplogruppi AIII, CII, DI e DII la distribuzione osservata delle differenze tra coppie di aplotipi dei cladi è risultata ben confrontabile sia con quella attesa in caso di rapida espansione demografica e sia con quella attesa in caso di espansione spaziale, ma i valori di SSD e di r per questi cladi non portano a rigettare l'ipotesi nulla di rapida espansione demografica e spaziale. Infine, il valore di F_S è risultato non significativo per tutti gli aplogruppi.

4.2.2 DISCUSSIONI

L'analisi della distribuzione geografica della diversità genetica delle popolazioni *L. italicus* condotta a livello del mtDNA, ha rilevato un pattern filogeografico estremamente complesso, al di là di ogni previsione rispetto ai dati presenti in letteratura sul tritone italiano (Raggiamenti & Wake, 1986). Inoltre, ad oggi in nessun'altra specie della penisola italiana era stata osservata un livello simile di complessità (Canestrelli *et al.*, 2010; Vega *et al.*, 2010). Infatti, il pattern filogeografico del *L. italicus* è risultato essere geograficamente strutturato e costituito da due linee evolutive principali, estremamente differenziate l'una dall'altra (6,8%), ciascuna delle quali risulta ulteriormente suddivisa, e nel complesso porta ad ipotizzare una frammentazione delle popolazioni di questa specie durante l'ultima fase glaciale del Pleistocene in ben otto rifugi.

Uno dei due cladi principali (clade S) è risultato geograficamente circoscritto nella Calabria centro-orientale e in quella meridionale, mentre l'altro clade (clade N) risulta essere diffuso attraverso il resto dell'areale. La sede della discontinuità filogeografica individuata tra i due gruppi coincide approssimativamente con la piana di Crati-Sibari (CS figura 19B). Le analisi condotte indicano nel Pleistocene inferiore o fine Pliocene l'origine della divergenza tra questi due cladi. Tale datazione coincide con il periodo di intensa attività tettonica e con le fasi di trasgressione marina che hanno caratterizzato quest'area. Dunque, l'evoluzione paleogeografica della piana di Crati-Sibari ha probabilmente influenzato la storia evolutiva del tritone italiano.

L'individuazione di due cladi fortemente differenziati era del tutto inattesa sulla base di dati precedenti sul pattern di diversità genetica ai loci allozimici emerso nel lavoro di Raggiamenti & Wake (1986). Infatti, in questo studio gli autori avevano individuato due unità caratterizzate solo da un modesto differenziamento. Tuttavia la distribuzione geografica di queste unità sembra coincidere con la distribuzione dei subcladi C e D nei quali si suddivide il clade N. Anche la stima del tempo di divergenza tra i subcladi C e D (Pleistocene medio) coincide con quella inferita da Raggiamenti & Wake (1986) per le due unità da loro individuate. Infine, la popolazione campionata più a sud da questi autori (Grisolia) è solo a circa 25 Km a nord-est dal sito 15 del nostro campionamento, all'interno del quale vengono osservati solo aplotipi appartenenti al clade N. Quindi, il pattern di diversità genetica osservata a livello del mtDNA non è discordante con quello emerso a livello nucleare dal lavoro di Raggiamenti & Wake (1986), piuttosto rivela una parte non trascurabile della diversità genetica del tritone italiano, diversità rappresentata dal clade S e collocata nell'area centro meridionale della Calabria. Dunque, tale diversità genetica non era emersa precedentemente solo a causa di un limitato campionamento proprio della penisola calabrese (Raggiamenti & Wake, 1986).

Sia il clade N che il clade S sono risultati essere ulteriormente suddivisi al loro interno

(vedi Figura 18). Il pattern evidenziato sembra suggerire almeno due serie di eventi di frammentazione, uno nel Pleistocene Medio che potrebbe aver portato alla divergenza tra i subcladi C e D del clade N, e tra i subcladi A e B dell'altro clade principale (clade S), mentre l'ultimo evento di divergenza allopatrica si sarebbe verificato durante il Pleistocene superiore, e la frammentazione allopatrica avrebbe portato alla formazione degli altri cladi terminali (CI, CII, DI e DII per il clade N, e AI, AII e AIII e B per il clade S; vedi tabella 14 e figura 18).

Mentre la struttura filogeografica e i risultati dell'analisi della datazione degli ultimi eventi di divergenza, supportano la frammentazione e i colli di bottiglia delle popolazioni durante l'ultima fase glaciale, l'analisi della demografia storica e i test statistici di neutralità non sembrano supportare una successiva fase di espansione per tutte le popolazioni degli otto aplogruppi (vedi figura 19). Tuttavia, l'ipotesi di un'espansione successiva all'ultima fase di frammentazione sulla base dei dati ottenuti non può essere completamente rifiutata. Infatti, il forte differenziamento osservato tra le popolazioni ($F_{SC}=0,63$) con molti aplotipi esclusivi per una o poche popolazioni (vedi tabella 2), può interferire sull'inferenza dell'analisi demografia, portando a risultati simili a quelli attesi in un pattern di stabilità demografica (come ad esempio l'irregolarità della distribuzione delle differenze a coppie di aplotipi osservati rispetto a quelli attesi nell'analisi di mismatch distribution e valori bassi e non significativi per i test statistici di neutralità; Hein *et al.*, 2005). Inoltre, la mancanza di copresenza tra diversi aplogruppi, suggerisce che se l'espansione c'è stata, questa potrebbe non aver condotto ad estensivo rimescolamento dei caratteri. Per poter verificare il ruolo di questi processi microevolutivi occorre intensificare il campionamento nelle aree di transizione tra cladi e soprattutto occorre un'analisi della diversità genetica condotta sia a livello nucleare che mitocondriale.

Nonostante la complessità del pattern filogeografico non sia mai stata osservata prima in nessun altro taxon italiano, emergono comunque almeno tre importanti linee di concordanza filogeografica con altri casi di studio presenti in letteratura. La prima coincide con la già citata piana di Crati-Sibari. La seconda invece riguarda la piana di Catanzaro (CA, figura 18B), la quale come la piana di CS è stata ripetutamente sommersa dal mare fino all'ultimo interglaciale a causa delle oscillazioni glacio-eustatiche del mare (Caloi *et al.*, 1989; Bonfiglio *et al.*, 2002) e per questo è divenuta la sede di importanti discontinuità biogeografiche e filogeografiche (Bonfiglio *et al.*, 2002; Santucci *et al.*, 1996; Canestrelli *et al.*, 2010; Podnar *et al.*, 2005). La distribuzione geografica del clade A e B da una parte, e del clade AI e AII-AIII dall'altra, suggeriscono che la piana di CA potrebbe aver agito come barriera alla dispersione almeno due volte nella storia evolutiva del tritone italiano: la prima nel Pleistocene medio portando alla divergenza tra il clade A e B, e la seconda invece durante l'ultimo interglaciale, quando, dopo un'espansione a nord del clade A, si sarebbe innescato il processo di differenziamento allopatrico tra il clade AIII e i cladi AI e AII.

Sebbene per supportare questo scenario siano necessari ulteriori dati (più campioni e contributo dell'analisi a livello del ncDNA), tuttavia, questo scenario appare plausibile sia sulla base della storia paleogeografica dell'area che sulla base delle analogie emerse con il recente studio filogeografico condotto su un'altra specie, anch'essa caratterizzata da scarse capacità dispersive, la *Talpa romana* (Canestrelli *et al.*, 2010), per la quale è stato inferito lo stesso scenario. La terza linea di concordanza filogeografica riguarda la discontinuità filogeografica osservata tra il clade C e D, collocata nel centro-sud d'Italia. Quest'area è emersa come sede di discontinuità anche in altre specie (Lenk & Wuster, 1999; Nascetti *et al.*, 2005; Barbanera *et al.*, 2009). Il pattern osservato potrebbe essere facilmente spiegato considerando alcuni aspetti come la struttura topografica dell'area, con un orientamento sud-est a nord-ovest della catena appenninica, la presenza di ghiacciai sparsi sulle cime più alte di questa catena montuosa durante le fasi glaciali del Pleistocene (Acquafredda & Palmentola, 1986), e la preferenza di habitat termofili da parte del tritone italiano (Scillitani, 2004).

Complessivamente, possiamo affermare che i risultati ottenuti confermano l'esistenza di almeno otto rifugi per il *L. italicus*, 5 dei quali collocabili all'interno dell'area calabrese e corrispondenti sostanzialmente con i massicci montuosi dell'Aspromonte, Serre, Sila e Catena Costiera, e un altro in un'area a nord della piana di Crati-Sibari difficilmente circoscrivibile, ma comunque compresa tra l'Italia centrale e la Puglia (vedi figura 18). La corrispondenza tra i 5 aplogruppi individuati in Calabria e l'orografia di questa regione è particolarmente sorprendente (vedi Figura 18). Come precedentemente esposto, osservando il pattern filogeografico in Calabria del *L. italicus*, si possono inferire le tracce di più eventi di frammentazione. Il pattern temporale e spaziale di questi eventi risulta essere parallelo ai cicli di frammentazione a cui è andata incontro la Calabria durante le oscillazioni del livello del mare del Plio-Pleistocene. Probabilmente anche alcune caratteristiche come scarsa capacità dispersiva, filopatria e predilizione per ambienti termofili (Scillitani, 2004), hanno reso il tritone italiano particolarmente predisposto a trattenere nel suo pattern di diversità genetica i segni dell'evoluzione paleogeografica del suo habitat e dei processi microevolutivi che hanno contribuito a determinarlo. Pertanto, il pattern di diversità genetica del tritone in Calabria può rappresentare un esempio ideale che permette di dimostrare chiaramente la stretta interazione tra processi microevolutivi, caratteristiche biologiche, paleogeografia e oscillazioni climatiche del Plio-Pleistocene.

In fine, l'evidenza di due linee evolutive profondamente divergenti (cladi N e S) e parapatriche potrebbe suggerire l'esistenza di due specie criptiche all'interno del *L. italicus*. Tuttavia, quest'ipotesi deve essere considerata con molta cautela. Infatti, è bene precisare che il marcatore mitocondriale non è un marcatore adatto per lo studio sia di eventuali pattern di introgressione sia per assegnare lo status di specie a linee evolutive divergenti (Ferguson, 2002;

vedi anche Canestrelli & Nascetti, 2008). Inoltre, anche se non è stata individuata un'area di sympatria per le due linee evolutive del tritone, non significa necessariamente che essa non esista. Infatti, potrebbe trattarsi per esempio di un'area piuttosto ristretta di ibridazione, ma anche in questo caso questa non risulterebbe comunque indicativa di un limitato scambio genico tra le due linee evolutive, poiché un'origine recente di questa eventuale zona di contatto potrebbe comunque spiegare altrettanto bene il pattern osservato. Per poter dunque accertare un eventuale contatto secondario, seguito eventualmente da ibridazione introgressiva tra le due linee evolutive del *L. italicus*, e per poter accertare il loro effettivo status tassonomico sono necessari molti più campioni dalla probabile zona di contatto secondario e l'uso di marcatori nucleari.

4.3 *RANA DALMATINA*

4.3.1 RISULTATI

Analisi della regione mitocondriale rDNA 16S, network di parsimonia e distribuzione geografica degli aplotipi.

Un frammento di DNA mitocondriale della lunghezza di 421 paia di basi, interno al gene codificante per il 16S rRNA è stato analizzato in 33 individui della *Rana dalmatina*, provenienti da 3 località della Slovenia, 3 località della Croazia e 16 località dell'Italia (Tabella 16). Le sequenze ottenute sono state confrontate e analizzate con quelle trovate per il 16S su campioni europei in GenBank, delle quali 2 corrispondono a individui campionati nella località Codri della Moldavia (numero di accesso GQ259205 e GQ259206; Petraccioli *et al.*, 2010), uno nella Altube Spagna (Kosuch *et al.*, 2003, numero di accesso AY014381) e uno in Germania presso Drover Heide (Veith *et al.*, 2003, numero di accesso AY147941).

Complessivamente, dall'analisi di queste sequenze, sono stati individuati 7 aplotipi definiti da 12 siti variabili. Non sono state osservate né inserzioni né delezioni. Nella tabella 16 viene indicata la distribuzione degli aplotipi individuati per le singole popolazioni esaminate. Nella figura 20A viene riportato il network di parsimonia statistica che mostra le relazioni tra gli aplotipi osservati nei siti presi in esame, mentre nella figura 20B viene riportata la distribuzione geografica di questi aplotipi. Sebbene estremamente distanti geograficamente i campioni della Spagna, della Germania e della Moldavia mostrano lo stesso aplotipo individuato in Italia settentrionale e nelle popolazioni della Slovenia e Croazia. Tutti gli aplotipi tranne due (HI3 e HI4) vengono individuati nei campioni delle località lungo la penisola italiana, ma mentre l'aplotipo HI1, ampiamente distribuito in Europa, lo si osserva solo nell'Italia Settentrionale, due aplotipi (HII1 e HII2) ben distinti rispetto agli altri vengono osservati negli individui campionati nel sito 19 (Fogolino, centro Italia), mentre un altro aplotipo (HIII1), considerevolmente differenziato da quelli individuati nel resto della penisola italiana, viene osservato all'interno delle popolazioni campionate nell'Italia meridionale.

Analisi delle regioni mitocondriali Cyt-b e COI, network di parsimonia e distribuzione geografica degli aplotipi

Per 244 individui campionati in 40 località della penisola italiana e della Slovenia e Croazia sono stati ottenuti due frammenti di DNA mitocondriale, uno di 741 paia di basi per un tratto della regione codificante per l'enzima Citocromo-b (Cyt-b) e uno di 653 paia di basi per un tratto

della regione codificante per la sub-unità I dell'enzima Citocromo-ossidasi (COI). Per il frammento della Cyt-b sono stati osservati 59 siti variabili, mentre nella COI 47. Non sono state osservate né inserzioni né delezioni. Le sequenze ottenute per i due frammenti di mtDNA in ciascun individuo sono state cumulate, e pertanto per ogni individuo è stato analizzato un frammento di 1404 paia di basi. Complessivamente sono stati osservati 49 aplotipi, la cui distribuzione all'interno delle popolazioni viene riportata nella tabella 3.

L'analisi di 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 due network (vedi Figura 21A). Il primo comprende gli aplotipi osservati negli individui campionati in Italia centro-settentrionale fino in Slovenia e Croazia (popolazioni 1-20), mentre il secondo network comprende gli aplotipi osservati nelle popolazioni campionate dal centro Italia fino alle popolazioni della Calabria (21-40). La linea di confine tra i due gruppi principali di aplotipi sembrerebbe corrispondere approssimativamente al margine settentrionale del bacino del fiume Volturno (vedi Figura 21). La divergenza genetica media misurata tra i due aplogruppi principali individuati da i due network è risultata essere pari al 4,2% ($\pm 0,5$ S.E.)

Nella struttura dei 2 network si possono distinguere alcuni gruppi di aplotipi (Figura 21A). Nel primo network si distinguono un aplogruppo N dall'aplogruppo S, nel secondo network si distingue l'aplogruppo A dall'aplogruppo B. Mentre la divergenza genetica media tra gli aplotipi del gruppo N e S è risultata essere pari al 0,9% ($\pm 0,2$ S.E.), quella tra l'aplogruppo A e B è risultata essere pari allo 0,8% ($\pm 0,2$ S.E.). Inoltre, l'aplogruppo B può essere ulteriormente suddiviso in almeno tre aplogruppi (BI, BII e BIII). Questa suddivisione degli aplotipi in sei gruppi viene supportata anche dall'analisi non gerarchica dei cluster, condotta attraverso il software BAPS.

Come si può osservare dalla figura 21, ciascun aplogruppo individuato, mostra una chiara correlazione con la geografia. L'aplogruppo N risulta essere ampiamente diffuso nelle popolazioni centro settentrionali della penisola italiana, mentre l'aplogruppo S appare limitato ad alcune popolazioni campionate nella regione Lazio. Aplotipi di questi due gruppi sono risultati essere copresenti nelle popolazioni 17 e 19. Tutti gli aplotipi compresi nel secondo network, con la sola eccezione di 4 aplotipi del aplogruppo A (A2, A3, A4 e A8, popolazioni 21 e 22; vedi Tabella 3), sono stati osservati nelle popolazioni campionate nelle regione Calabria. In particolare, gli aplotipi al gruppo A vengono prevalentemente osservati nelle popolazioni a nord della piana di Crati-Sibari (popolazioni 23-28; CS Figura 21B), mentre quelli del gruppo B a sud di questa piana. Inoltre, all'interno del gruppo B possiamo rilevare come l'aplogruppo BII sia presente solo nelle popolazioni all'interno delle due piane calabresi, ovvero la piana di Crati-Sibari e quella di Catanzaro (CA Figura 21B), mentre il clade BI risulti più diffuso nelle popolazioni a sud della

piana di Catanzaro (37-41), sebbene la sua presenza viene osservata anche in popolazioni della Catena Costiera (popolazioni 30 e 32). Infine, il clade BIII risulta essere diffuso nelle popolazioni della Calabria centrale, e in condizioni di copresenza con aplotipi degli altri aplogruppi (vedi Figura 21).

Le stime di diversità genetica mitocondriale per i diversi aplogruppi sono riportate in Tabella 17. Per gli aplogruppi dell'Italia centro settentrionale (N ed S) si osservano bassi valori di diversità genetica, mentre quelli relativi agli aplogruppi A, B e BIII sono risultati particolarmente alti, soprattutto quello dell'aplogruppo B con 0,879 (S.D. 0,016) per la diversità aplotipica e 0,00246 (S.D. 0,00140) per la diversità nucleotidica.

Test di demografia storica

L'analisi di demografia storica è stata condotta a livello dei diversi aplogruppi individuati sia attraverso la struttura dei network che dall'analisi con il software BAPS. Il risultato dell'analisi della frequenza delle differenze tra coppie di aplotipi, “*mismatch distribution*”, viene riportato nella figura 22. Come si può osservare dalla figura, si evidenzia un ottimo accordo tra la distribuzione delle differenze tra coppie di aplotipi osservate e quelle attese sia in caso di rapida espansione demografica che in caso di espansione spaziale per aplogruppi N, BI, BII, BIII e un discreto accordo tra la distribuzione delle differenze tra coppie di aplotipi osservate e quelle attese sia in caso di rapida espansione demografica che in caso di espansione spaziale per aplogruppi C, A e B. In tutti gli aplogruppi, i test statistici di demografia storica (SSD_{DE} SSD_{SE}) non portano a rigettare l'ipotesi nulla di rapida espansione demografica e spaziale, tranne nel aplogruppo A per il quale l'ipotesi nulla di espansione spaziale è stata rigettata. Infine, i valori di F_S (Fu, 1997) sono risultati negativi e significativi per gli aplogruppi B, BI, e BIII, mentre il valore F_S per l'aplogruppo N è risultato altamente significativo (vedi Tabella 16).

4.3.2 DISCUSSIONI

L'analisi della diversità genetica condotta attraverso il frammento mitocondriale per la regione codificante per l'rRNA 16S, suggerisce almeno due ipotesi. La prima ipotesi è che l'Italia probabilmente potrebbe aver svolto un importante ruolo di rifugio per la *R. dalmatina* a scala del suo intero areale. Si osserva infatti, come la porzione maggiore della diversità aplotipica per il 16S sia collocata proprio in Italia e come nei campioni della Spagna, della Germania e della Moldavia sia presente lo stesso aplotipo che è stato trovato all'interno delle popolazioni settentrionali della penisola italiana. La seconda ipotesi è che probabilmente l'Italia potrebbe aver offerto più rifugi

per le popolazioni di *R. dalmatina* e che pertanto la storia evolutiva delle popolazioni di questa specie potrebbe esser stata determinata da una complessa interazione di diversi processi microevolutivi. Gli aplotipi individuati nelle popolazioni italiane infatti, possono essere suddivisi in tre gruppi con una precisa distribuzione geografica. Mentre per poter verificare la prima ipotesi occorre un campionamento più dettagliato del resto dell'areale europeo della *R. dalmatina*, l'analisi dei due frammenti relativi a tratti delle regioni del mtDNA codificanti per la Cyt-b e la COI, regioni notoriamente più variabili rispetto al 16S, condotta su un esteso campionamento della penisola italiana, confermano sicuramente la seconda ipotesi. Il pattern della distribuzione geografica della variabilità genetica delle popolazioni italiane a livello di questi due ultimi marcatori mitocondriali è risultato infatti estremamente complesso e strutturato. Inoltre, il pattern di diversità genetica evidenziato presenta delle importanti analogie sia con quello emerso per le altre due specie prese in esame in questa tesi che con quello di altre specie presenti in letteratura. L'analisi della variazione genetica ha individuato l'esistenza di due aplogruppi ben differenziati (4,2%), localizzati a nord e a sud del margine settentrionale del bacino idrografico del fiume Volturno. La sede di questa discontinuità filogeografica coincide con una importante discontinuità filogeografica evidenziata anche nel pattern di diversità genetica delle popolazioni di *S. salamandra* (vedi par. 4.1.2) e tra le specie *Salamandrina perspicillata* e *S. terdigitata* (Nascetti *et al.*, 2005; Canestrelli *et al.*, 2006b). Altre linee di concordanza vengono individuate tra le principali discontinuità filogeografiche emerse nel pattern di diversità genetica delle popolazioni calabresi della *R. dalmatina*. Infatti, le discontinuità evidenziate presso la piana di Crati-Sibari (tra l'aplogruppo A e l'aplogruppo B) e la piana di Catanzaro (tra l'aplogruppo BI e BII), coincidono con le principali discontinuità evidenziate sia in *L. italicus* (vedi par. 4.2.2) che in altre specie come ad esempio la *Bombina pachypus* (Canestrelli *et al.*, 2006a), o la *Rana (Pelophylax) lessonae* (Canestrelli & Nascetti, 2008). Pertanto risulta evidente come la ciclica sommersione delle piane calabresi, per effetto delle cicliche oscillazioni glacio-eustatiche del livello del mare del Plio-Pleistocene, possa aver giocato un ruolo determinante nell'innescare ripetuti eventi di frammentazione allopatrica anche tra gruppi di popolazioni calabresi della *R. dalmatina*. Inoltre, osservando la distribuzione geografica degli aplogruppi individuati (vedi Figura 21) si può rilevare come aplotipi dei diversi aplogruppi siano co-presenti nelle popolazioni presso le aree precedentemente citate come sedi di discontinuità filogeografica. Questo dato insieme ai risultati dei test di demografia storica (vedi tabella 17 e figura 22) indica che il pattern di distribuzione geografica della diversità genetica della *R. dalmatina*, soprattutto in Calabria, è stato determinato anche da processi di espansione demografica seguiti da contatti secondari. Inoltre, un evento di espansione per le popolazioni di *R. dalmatina* dell'Italia settentrionale e della Slovenia e Croazia è ulteriormente supportato anche dalla forma “star-like” dell'aplogruppo N nel network di parsimonia statistica, caratterizzato da un

aplotipo centrale ampiamente diffuso tra più popolazioni al quale sono connessi diversi aplotipi differenti per una sola sostituzione nucleotidica.

Inoltre, l'individuazione di un aplogruppo ben differenziato nell'area della costa laziale (aplogruppo C) costituisce un dato di estremo interesse in quanto lascia ipotizzare per la prima volta in quest'area la presenza di un importante rifugio.

Complessivamente, dall'analisi del pattern di distribuzione geografica della diversità delle popolazioni italiane della *R. dalmatina* si può affermare che la porzione maggiore della variabilità genetica risiede in Calabria. Infatti, uno dei due gruppi principali di aplotipi (A+B), e 29 aplotipi su 49 ovvero il 59% degli aplotipi osservati nei campioni analizzati, sono stati trovati nelle popolazioni calabresi. Pertanto, la Calabria rappresenta un *hotspot* di biodiversità intraspecifica per le popolazioni italiane di questa specie. I processi microevolutivi che maggiormente hanno contribuito alla genesi di questo *hotspot* sono stati l'espansione e i contatti secondari tra linee vicarianti, verificatesi dopo gli eventi di frammentazione allopatrica in più rifugi. Tuttavia, è bene notare come nella *R. dalmatina* i processi di espansione e di contatto secondario tra le linee evolutesi in allopatria possano esser stati maggiormente rilevanti in questa specie per effetto della sua capacità dispersiva rispetto alle altre due specie studiate (Ponsero e Joly, 1998; Rebelo & Leclair, 2003; Scillitani, 2004). In futuro sarà importante analizzare le popolazioni di *R. dalmatina* anche attraverso l'utilizzo di marcatori nucleari. In questo modo sarà possibile evidenziare un eventuale contributo dello scambio genico tra le popolazioni presso le aree emerse a livello del mtDNA come sedi di discontinuità filogeografica.

In fine, è importante sottolineare come solo grazie ad un campionamento dettagliato della Calabria (18 località) è stato possibile evidenziare non solo un alto livello di diversità genetica ma anche come questa diversità sia caratterizzata da una complessa struttura geografica, prodotta da processi di frammentazione allopatrica, espansione e contatti secondari. Ricordiamo infatti come i valori di diversità aplotipica e nucleotidica osservati negli aplogruppi A e B siano risultati particolarmente elevati (vedi tabella 17). Questi valori ci indicano come la probabilità di trovare due individui con lo stesso aplotipo in Calabria centro-meridionale sia estremamente bassa, mentre sia più probabile trovare due individui con aplotipi molto diversi l'uno dall'altro. Pertanto, con pochi siti di campionamento probabilmente sarebbe emersa solo la presenza di una maggiore variabilità al sud rispetto al nord (pattern “*southern richness - northern purity*”). In tal caso, l'origine dell'*hotspot* di diversità intraspecifica della *R. dalmatina* al sud poteva essere interpretata erroneamente come il prodotto della stabilità e dell'ampiezza demografica delle popolazioni nell'area meridionale della penisola italiana. Dal momento che gran parte degli studi di filogeografia effettuati in passato si basavano su campionamenti assai meno dettagliati di quello da noi adottato (vedi ad esempio Bilton *et al.*, 1998), i risultati qui presentati costituiscono un

forte monito, sia per studi futuri che per una rivalutazione di quelli precedenti.

5. IMPLICAZIONI E CONCLUSIONI GENERALI

La coincidenza geografica tra *hotspot* di biodiversità intraspecifica e le presunte aree di rifugio glaciale ha portato ad ipotizzare l'esistenza di una relazione causale tra di loro. Uno scenario proposto per spiegare tale relazione, interpreta queste aree come storiche aree depositarie della variabilità genetica intraspecifica che, grazie a condizioni ambientali favorevoli, avrebbero offerto a specie temperate le condizioni per la persistenza di grandi e stabili popolazioni attraverso le oscillazioni climatiche del Quaternario (Hewit, 1996). Tale scenario è stato ritenuto particolarmente plausibile per le specie endemiche (Lewis & Crawford, 1995; Derieg *et al.*, 2008). I dati ottenuti in questa tesi non supportano questo scenario per le tre specie prese in esame. L'analisi filogeografica condotta sulle popolazioni di *L. italicus* e *R. dalmatina* ha individuato una forte corrispondenza geografica tra l'area meridionale della penisola italiana (considerata come uno dei maggiori rifugi europei) e l'*hotspot* di diversità intraspecifica per queste due specie. In Calabria, infatti, per ciascuna specie vengono individuati non solo più del 50% degli aplotipi, ma anche alcune delle principali linee evolutive. Tuttavia, mentre i dati ottenuti supportano la persistenza di queste specie nella regione Calabria, essi non supportano uno scenario di una prolungata stabilità demografica di grandi popolazioni. Infatti, la ricostruzione della storia evolutiva di queste due specie ha rivelato come il pattern di diversità genetica sia del *L. italicus* che del *R. dalmatina* sia stato determinato da cicliche fasi di frammentazione allopatrica, innescate dalle cicliche oscillazioni glacio-eustatiche del livello del mare del Plio-Pleistocene. Mentre nel pattern della *R. dalmatina* è evidente anche un forte contributo di processi di espansione, contatto secondario e rimescolamento delle linee vicarianti, questo non è emerso nel *L. italicus*. Tuttavia, come spiegato nel capitolo dedicato alla discussione dei risultati del tritone italiano (par. 4.2.2), sulla base dei dati ottenuti non possiamo escludere anche per questa specie un contributo di contatti secondari. Le cause delle differenze osservate tra il pattern di diversità genetica della *R. dalmatina* e quello del *L. italicus* sono con tutta probabilità da imputarsi alle diverse caratteristiche ecologiche delle due specie. Infatti la *R. dalmatina* è caratterizzata da maggiori capacità dispersive rispetto al *L. italicus* (Ponsero e Joly, 1998; Scillitani, 2004). La sede dell'*hotspot* di diversità all'interno delle popolazioni italiane di *S. salamandra*, invece, non coincide come per il tritone italiano e la rana agile con la penisola calabrese, ma si trova in un'altra area geografica, ovvero presso l'Appennino ligure e quello settentrionale. Ma anche in questo caso, l'origine di questo *hotspot* va ricercata nella complessa interazione dei processi di frammentazione allopatrica, di contatto secondario e successiva ibridazione introgressiva. In particolare, l'*hotspot* di diversità genetica della *S. salamandra* in Italia coincide proprio con l'area di contatto secondario o di *melting spot* tra le due sottospecie *S.s. salamandra* e *S. s. giglioli*. Tuttavia, è bene ricordare come,

solo grazie all'uso combinato delle due classi di marcatori (nucleari e mitocondriali) è stato possibile osservare una complessa interazione tra le due sottospecie con differente pattern di introgressione a livello del DNA mitocondriale rispetto a quello nucleare, frutto di una pletora di processi microevolutivi, sia di natura stocastica che dipendenti da selezione.

Dunque, nel complesso i pattern di diversità genetica delle specie studiate, nonostante le rispettive peculiarità delle loro storie evolutive, sono risultati simili tra loro in quanto tutti sono stati determinati da processi di frammentazione allopatrica, eventualmente seguita da contatto secondario con rimescolamento tra linee evolutesi in allopatria. Pattern simili sono stati osservati anche in altre specie e in differenti linee endemiche, non solo nel sud della penisola italiana (per es.: Canestrelli *et al.*, 2008; Canestrelli *et al.*, 2010), ma anche in altre penisole europee (Martínez-Solano *et al.*, 2006; Gomez & Lunt, 2007, Sotiropoulos *et al.*, 2007; Previšić *et al.*, 2009), nonché in altre aree che sono state storicamente frammentate dalla formazione di bracci di mare durante le trasgressioni marine del Plio-Pleistocene (per es. nella Baja di California, nell'arcipelago dell'Egeo nelle Filippine: Riddle *et al.*, 2000; Papadopoulou *et al.*, 2009; Ravago-Gotanco and Juinio-Meñez, 2010) o in aree che sono state caratterizzate dall'azione di qualche altro importante evento geologico (per es. in America del sud: Cosacov *et al.*, 2010; Sedano *et al.*, 2010) o paleoclimatico (per esempio: in Australia: Byrne, 2008). Questa concordanza suggerisce che, al di là delle differenze tra le caratteristiche fisiografiche, delle storie paleogeografiche e dei conseguenti pattern filogeografici, probabilmente è il verificarsi di ripetute fasi di divergenza allopatrica, eventualmente seguite da ibridazione introgressiva, la caratteristica comune nella storia della formazione di un *hotspot* di diversità intraspecifica. Dunque, il ruolo della frammentazione allopatrica e dell'ibridazione introgressiva non sembra essere affatto marginale nella formazione di un *hotspot* di biodiversità come invece è stato largamente ritenuto in passato, soprattutto per specie animali. Ciò implica la necessità di un cambiamento sull'opinione generale che si ha di tale processo evolutivo e sulla sua importanza in ambito conservazionistico. Dal momento che i processi di frammentazione e scambio genico non possono più essere visti né come marginali né come incidentali, ma altresì sostanzialmente ubiquitari e soprattutto centrali nel processo di formazione degli *hotspot* di biodiversità intraspecifica, essi appaiono determinanti nel consentire la persistenza a lungo termine di popolazioni e specie (Van Valen, 1973), e dunque meritevoli di estrema attenzione anche dal punto di vista conservazionistico.

Infine, confrontando i risultati ottenuti in questa tesi con quelli di diversi studi condotti su taxa della penisola italiana, emerge un altro aspetto di estrema rilevanza: la coincidenza spaziale tra le sedi di discontinuità filogeografiche e/o ibridazione introgressiva. Le sedi di tale corrispondenza sono localizzate prevalentemente presso l'Appennino ligure e quello settentrionale, la piana del bacino idrografico del fiume Volturno, la Piana di Crati-Sibari e la

piana di Catanzaro. Casi analoghi di coincidenza spaziale tra discontinuità filogeografiche e/o zone di contatto secondario vengono individuate anche tra specie codistribuite in altre regioni del mondo (vedi per esempio: Calsbeek *et al.*, 2003; Feldman and Spicer, 2006; Byrne, 2008; Lessa *et al.*, 2010; Rissler and Smith, 2010). Ebbene, alla luce di quanto è stato esposto precedentemente, queste aree sono sedi di hotspot di diversità intraspecifica e dunque sono aree dove si concentra il potenziale evolutivo di diverse specie. Questo potenziale evolutivo costituisce la risorsa fondamentale per la persistenza a lungo termine delle popolazioni naturali, poiché rappresenta la capacità di mantenere adeguati livelli di variabilità, tali da poter garantire loro la possibilità di risposta agli inevitabili mutamenti ambientali (Van Valen, 1973). Dunque, queste aree dove coincidono le discontinuità filogeografiche e/o di ibridazione introgressiva per più specie, non sono solo le sedi di *hotspot* di diversità intraspecifica, ma anche la sede storica e attuale di processi microevolutivi che incrementano la variabilità genetica, quindi “*hotspot evolutivi*” (Vandergast *et al.*, 2008). Pertanto, individuare e proteggere queste aree permette di realizzare l’obiettivo principale della biologia della conservazione: proteggere la biodiversità e i processi che la generano e la sostengono (Frankel, 1974; Erwin, 1991; Crandall *et al.*, 2000; Moritz, 2002).

BIBLIOGRAFIA

- Acquafredda P. and Palmentola G. (1986). Il glacialismo quaternario nell'Italia meridionale dal Massiccio del Matese all'Aspromonte. *Biogeographia*, **10**, 13–18.
- Alexandrino J., Arntzen J. and Ferrand N. (2002). Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity*, **88**, 66-74.
- Allendorf F.W. and Luikart G. (2007). *Conservation and the Genetics of populations*. Blakwell Publishing, Oxford, UK.
- Avice J.C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species, Harvard Univ Pr.
- Avice J.C. (2008). Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *The Royal Society*, 265, 1707-1712.
- Avice J.C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3–15.
- Babik W., Branicki W., Crnobrnja-Isailović J., Cogălniceanu D., Sas I., Olgun K., Poyarkov N.A., García-París M. and Arntzen J.W. (2005). Phylogeography of two European newt species-discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology*, **14**, 2475-2491.
- Ballard J. and Whitlock M. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**: 729-744.
- Barbanera F., Zuffi M., Guerrini M., Gentili A., Tofanelli S., Fasola M. and Dini F. (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.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F. (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. *Université de Montpellier II, Montpellier (France)*.
- Bella J., Serrano L., Orellana J. and Mason P. (2007). The origin of the *Chorthippus parallelus* hybrid zone: chromosomal evidence of multiple refugia for Iberian populations. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 568-576.
- Bennati R., Bonetti M., Lavazza A. and Gelmetti D. (1996). Epidemia da herpesvirus in popolazioni di *Rana dalmatina* nel comune di Brescia. in Amato S., Rivabene G., Zanghellini S. (eds.), Atti del 1° convegno Italiano di Erpetologia Montana. *Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol.*, **71**. Museo Tridentino di Scienze Naturali, Trento, pp. 241-243.

- Bennett K., Tzedakis P. and Willis K. (1991). Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography*, **18**, 103-115.
- 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**, 53-62.
- Bilton D., Mirol P., Mascheretti S., Fredga K., Zima J. and Searle J. (1998). Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **265**, 1219.
- Birky-Jr C., Fuerst P. and Maruyama T. (1989). Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, **121**, 613.
- 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**, 119-131.
- Bonfiglio L., Mangano G., Marra A., Masini F., Pavia M. and Petruso D. (2002). Pleistocene Calabrian and Sicilian bioprovinces. *Geobios*, **35**: 29-39.
- Bucci-Innocenti S., Ragghianti M. and Mancino G. (1983). Chromosome and C-heterochromatin polymorphisms in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Chromosoma*, **88**, 208-215.
- Buggs R. (2007). Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity*, **99**, 301-312.
- 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.
- Calsbeek R., Thompson J.N. and Richardson J.E. (2003) Patterns of molecular evolution and diversification in a biodiversity hotspot: The California Floristic Province. *Molecular Ecology*, **12**, 1021-1029.
- 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**, 3741-3754.
- 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**, 221-227.

- Canestrelli D., Cimmaruta R. and Nascetti G. (2007). Phylogeography and historical demography of the Italian treefrog, *Hyla intermedia*, reveals multiple refugia, population expansions and secondary contacts within peninsular Italy. *Molecular Ecology*, **16**, 4808-4821.
- 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**, 1923-1936.
- 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**, 3856-3872.
- 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**, 5432-5451.
- Capula M., Ceccarelli A. (2003). Distribution on genetic variation and taxonomy of insular and mainland populations of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*. *Amphibia-Reptilia*, **24**, 483–495.
- 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 ‘glacio-eustatic fluctuation base-level’. *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.
- Corander J., Waldmann P. and Sillanpää M. (2003). Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, **163**, 367.
- Corander J. and Marttinen P. (2006). Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology*, **15**, 2833-2843.
- Cosacov A., Sérsic A., Sosa V., Johnson L. and Cocucci A. (2010). Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography*, **37**, 1463-1477.
- Crandall K. and Templeton A. (1993). Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134**, 959.
- Crandall K.A., Bininda-Emonds O.R.P., Mace G.M. and Wayne R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290–295.
- Cruz M.J., Rebelo R. and Crespo E.G. (2006). Effects of an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, on the distribution of south-western Iberian amphibians in their breeding habitats. *Ecography*, **29**, 329-338.
- Cruzan M.B. and Templeton A.R. (2000). Paleoecology and coalescence: phylogeographic

- analysis of hypotheses from the fossil from the fossil record. *TREE*, **15**, 491-496.
- 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.
- Derieg N.J., Sangaumphai A. and Bruederle L.P. (2008). Genetic diversity and endemism in North American *Carex* section *Ceratocystis* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, **95**, 1287-1296.
- Doyle J. and Doyle J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, **19**, 11-15.
- Drummond A., Ho S., Phillips M. and Rambaut A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, **4**, 699.
- Dupanloup I., Schneider S. and Excoffier L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571-2581.
- Elenga H., Peyron O., Bonnefille R., Jolly D., Cheddadi R., Guiot J., Andrieu V., Bottema S., Buchet G. and De Beaulieu J. (2000). Pollen-based biome reconstruction for southern Europe and Africa 18,000 yr BP. *Journal of Biogeography*, **27**, 621-634.
- Erwin T.L. (1991). An evolutionary basis for conservation strategies. *Science*, **267**, 41-42.
- Excoffier L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, **13**, 853-864.
- 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., Kallersjo M., Kluge A.G. and Bult C. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**, 315-319.
- Feldman C.R. and Spicer G.S. (2006) Comparative phylogeography of woodland reptiles in California: repeated pattern of cladogenesis and population expansion. *Molecular Ecology*, **15**, 2201-2222.
- Felsenstein J. (1974). The evolutionary advantage of recombination. *Genetics*, **78**, 737.
- Finney D.J. (1948) The Fisher-Yates test of significance in 2X2 contingency tables. *Biometrika*, **35**, 145-156.
- Frankel O.H. (1974) Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics*, **78**, 53-65.
- Fu Y.X., (1997) Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Gabriel W., Lynch M. and Bürger R. (1993). Muller's ratchet and mutational meltdowns. *Evolution*,

- 47, 1744-1757.
- Gasser F. (1978). Le polytypisme de l'espèce paléarctique *Salamandra salamandra* (amphibien urodele). II. Systématique, relations génétiques et tendances évolutives dans l'aire de répartition. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, **119**, 635–668.
- 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 plio-pleistocenico di Reggio Calabria nel quadro geodinamico dell'arco calabro. *Bollettino Geologico Italiano*, **100**, 433–466.
- Giacoma C. (1988). The ecology and distribution of newts in Italy. *Ann. 1st. Mus. Zool. Univ. Napoli*, **26**, 49-84.
- Giacoma C. and Sparreboom M. (1987). On the sexual behaviour of the Italian newt, *Triturus italicus* (Caudata: Salamandridae). *Bjdr. Dierk.*, 57: 19-30
- Giacoma C. and Balletto E. (1988). Phylogeny of the salamandrid genus *Triturus*. *Italian Journal of Zoology*, **55**, 337-358.
- Giovannotti M., Nisi Cerioni P., Kalboussi M., Aprea G. and Caputo V. (2007). Phylogeographic inferences from the mtDNA variation of the three-toed skink, *Chalcides chalcides* (Reptilia: Scincidae). *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution*, **308**, 3–297.
- Giovannotti M., Nisi-Cerioni P. and Caputo V. (2010). Mitochondrial DNA sequence analysis reveals multiple Pleistocene glacial refugia for *Podarcis muralis* (Laurenti, 1768) in the Italian Peninsula. *Italian Journal of Zoology*, **77**, 277-288.
- Giraudi C. and Frezzotti M. (1997). Late Pleistocene Glacial Events in the Central Apennines, Italy. *Quaternary Research*, **48**, 280-290.
- Grosenbacher K. (1997). Der Springfrosch *Rana dalmatina* in der Schweiz. In: Krone, A., K.-D. Kühnel & Berger (Hrsg.): Der Springfrosch (*Rana dalmatina*); Ökologie und Bestandssituation. — *Rana*, **2**, 59-65.
- Gonçalves H., Martínez-Solano I., Pereira R., Carvalho B., García-París 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.
- Guarino F., Caputo V. and Angelini F. (1992). The reproductive cycle of the newt *Triturus italicus*. *Amphibia-Reptilia*, **13**, 121-133.

- Guarino F. and Bellini L. (1993). Reproductive activity and plasma androgen concentrations in the male of *Rana dalmatina*. *Italian Journal of Zoology*, **60**, 281-286.
- Harpending H. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human biology; an international record of research*, **66**, 591.
- Hartel T. (2008). Long-term within pond variation of egg deposition sites in the agile frog, *Rana dalmatina*. *Biologia*, **63**, 439-443.
- Hartel T., Nemes S., Cogalniceanu D., Öllerer K., Moga C., Lesbarrères D. and Demeter L. (2009). Pond and landscape determinants of *Rana dalmatina* population sizes in a Romanian rural landscape. *acta oecologica*, **35**, 53-59.
- Hasegawa M., Kishino H. and Yano T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, **22**, 160-174.
- Hettyey A., Török J., Hévízi G. and Fox S. (2005). Male mate choice lacking in the agile frog, *Rana dalmatina*. *Copeia*, 403-408.
- 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 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**, 1742-9994.
- Hein J., Schierup M. and Wiuf C. (2005). *Gene Genealogies, Variation and Evolution: A Primer in Coalescent Theory*. Oxford: Oxford University Press.
- 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*.
- Houlahan J., Findlay C., Schmidt B., Meyer A. and Kuzmin S. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, **404**, 752-755.
- Jensen J., Bohonak A. and Kelley S. (2005). Isolation by distance, web service. *Bmc Genetics*, **6**, 13.
- Joly J. (1968). Données écologiques sur la salamandre tachetée *Salamandra salamandra* (L.). *Ann. Sci. Nat. Zool*, **12**, 301-366.
- Kocher T., Thomas W., Meyer A., Edwards S., Paabo S., Villablanca F. and Wilson A. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA sequence evolution in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**, 6196-6200.
- Kosuch J., Vences M., Dubois A., Ohler A. and Bohme W. (2001). Out of Asia: mitochondrial DNA evidence for an Oriental origin of tiger frogs, genus *Hoplobatrachus*. *Molecular*

- Phylogenetics Evolution*, **21**, 398-407.
- Krystufek B., Buzan E., Hutchinson W. and Hänfling B. (2007). Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. *Molecular Ecology*, **16**, 1221-1232.
- Kuzmin S., Papenfuss T., Sparreboom M., (2004). *Salamandra salamandra* IUCN 2006. In: 2006 *IUCN Red list of Threatened Species*.
- 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**.
- Lesbarrères D. and Lodé T. (2002). Variations in male calls and responses to an unfamiliar advertisement call in a territorial breeding anuran, *Rana dalmatina*: evidence for a “dear enemy” effect. *Ethology Ecology & Evolution*, **14**, 287-295.
- Lessa E.P., D’Elia G. and Pardiñas U.F.J. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology*, **19**, 3031–3037
- Levene H. (1949). On a matching problem arising in genetics. *Ann Math Stat.*, **20**, 91-94.
- 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**, 141-149 .
- Librado P. and Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451.
- 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.
- Martínez-Solano I., Teixeira J., Buckley D. and García-París M. (2006). Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology*, **15**, 3375-3388.
- Michaux J.R., Libois R. and Filippucci M.G. (2005). So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the western Palearctic region. *Heredity*, **94**, 52-63.
- Moritz C. (1994) Defining "Evolutionarily Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.
- Moritz C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary process that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238-254.
- Moritz C., Schneider C. and Wake D. (1992). Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, **41**: 273.

- Myers N., Mittermeier R., Mittermeier C., da Fonseca G. and Kent J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858.
- Nagy Z.T., Joger U., Guicking D. and Wink M. (2002). Phylogeography of the European whip snake *Coluber (Hierophis) viridiflavus* as inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene and ISSR genomic fingerprinting. *Biota*, **3**, 109–118.
- Nascetti G., Zangari F. and Canestrelli D. (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.
- Nevo E. and Beiles A. (1991). Genetic diversity and ecological heterogeneity in amphibian evolution. *Copeia*, 565-592.
- Olalde M., Herrán A., Espinel S. and Goicoechea P. (2002). White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management*, **156**, 89-102.
- Olivieri L. (1991). Differenziamento genetico nel genera *Salamandra* (Amphibia, Urodela, Salamandridae): Aspetti tassonomici ed evolutivi.—Unpubl, Master thesis, Rome Univ.
- Orizaola G. and Brana F. (2006). Effect of salmonid introduction and other environmental characteristics on amphibian distribution and abundance in mountain lakes of northern Spain. *Animal Conservation*, **9**, 171-178.
- Palumbi S., Martin A., Ramano S., McMillan W.O., Stice L. and Grabowski G. (1991). The Simple Fool's Guide to PCR, version 2. University of Hawaii Zoology Department, Honolulu, Hawaii, 46 pp.
- 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.
- Paulo O., Dias C., Bruford M., Jordan W. and Nichols R. (2001). The persistence of Pliocene populations through the Pleistocene climatic cycles: evidence from the phylogeography of an Iberian lizard. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **268**, 1625.
- Pavignano I., Giacoma C. and Castellano S. (1990). A multivariate analysis of amphibian habitat determinants in north western Italy. *Amphibia-Reptilia*, **11**, 311-324.
- Peracca M. (1898). Descrizione di una nuova specie di tritone italiano, *Molge italica* n. sp. *Boll. Mus. Zool. Anat. comp. Univ. Torino*, **13**, 1-6.
- 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.
- Petraccioli A., Odierna G., Picariello O., Giacomini C. and Balletto E. (2010). Karyological diversification of a Moldovan population of *Rana dalmatina* Bonaparte, 1838. *Amphibia-Reptilia*, **31**, 435-438.
- Picariello O., Guarino F.M. and Barbieri F. (2006) *Rana dalmatina*. In: Atlante degli anfibi e dei rettili d'Italia (Atlas of Italian Amphibians and Reptiles). Societas Herpetologica Italica. Sindaco, R., Doria, G., Razzetti, E., Bernini, F., Eds. pp. 352-357.
- Pinho C., Harris D. and Ferrand N. (2007). Contrasting patterns of population subdivision and historical demography in three western Mediterranean lizard species inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, **16**, 1191-1205.
- Podnar M., Mayer W. and Tvrkovič N. (2005). Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, **14**, 575-588.
- Ponsero A. and Joly P. (1998). Clutch size, egg survival and migration distance in the agile frog (*Rana dalmatina*) in a floodplain. *Archiv für Hydrobiologie*, **142**, 343-352.
- 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**, 37-45.
- Previšić A., Walton C., Kučinić M., Mitrikeski P.T. and Kerovec M. (2009). Pleistocene divergence of Dinaric *Drusus* endemics (Trichoptera, Limnephilidae) in multiple microrefugia within the Balkan Peninsula. *Molecular Ecology*, **18**, 634-647.
- Pritchard J.K., Stephens M.S. and Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Ragghianti M. and Wake D. (1986). Genic variation and its evolutionary implications in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Herpetologica*, **42**, 206-214.
- 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 Juinio-Meñez 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.
- Rebelo R. and Leclair M. (2003). Site tenacity in the terrestrial salamandrid *Salamandra salamandra*. *Journal of Herpetology*, **37**, 440-445.

- 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.
- Rissler L.J. and Smith W.H. (2010). Mapping amphibian contact zones and phylogeographical break hotspot across the United States. *Molecular Ecology*, **19**, 5404-5416.
- Rogers A. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, **49**, 608-615.
- Rogers A. and Harpending H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552.
- Rousset F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. and Erlich H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science(Washington)*, **239**, 487-487.
- San Mauro D., Gower D.J., Oommen O.V., Wilkinson M. and Zardoya R. (2004). Phylogeny of caecilian amphibians (Gymnophiona) based on complete mitochondrial genomes and nuclear RAG1. *Molecular phylogenetics and evolution*, **33**, 413-427.
- 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.
- Schmidt B., Schaub M. and Steinfartz S. (2007). Apparent survival of the salamander *Salamandra salamandra* is low because of high migratory activity. *Frontiers in Zoology*, **4**, 19.
- Schmitt T., Habel J., Zimmermann M. and Mueller P. (2006). Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology*, **15**, 1889-1901.
- Schulte U., Kusters D. and Steinfartz S. (2007). A PIT tag based analysis of annual movement patterns of adult fire salamanders (*Salamandra salamandra*) in a Middle European habitat. *Amphibia-Reptilia*, **28**, 531-536.
- Scillitani G. (1996). Tritone italiano, *Triturus italicus* (Peracca 1898). In: Atlante degli anfibii e Rettili della provincia di Foggia, G. Scillitani, V. Rizzi & M. Gioiosa (eds), pp.48-49.
- 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**, 45-54.
- Sedano R. and Burns K. (2010). Are the Northern Andes a species pump for Neotropical birds? Phylogenetics and biogeography of a clade of Neotropical tanagers (Aves: Thraupini). *Journal of Biogeography*, **37**, 325-343.

- Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco.
- Sotiropoulos K., Eleftherakos K., Dzukic G., Kalezic M., Legakis A. and Polymeni R. (2007). Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, **45**, 211-226.
- Sparreboom M. (1997) *Triturus italicus* (Peracca 1898) *Atlas of amphibians and Reptiles in Europe*. pp. 80-81.
- 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.
- Steinfartz S., Weirer M. and Tautz D. (2007). Tracing the first step to speciation: ecological and genetic differentiation of a salamander population in a small forest. *Molecular Ecology*, **16**, 4550-4561.
- Stewart J. and Lister A. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 608-613.
- Swofford D. (2002). PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10. *Sunderland, MA: Sinauer Associates*.
- Swofford D. and Selander R. (1999). BIOSYS-2: 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**, 91-100.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. and Cosson J. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Taberlet P. and Cheddadi R. (2002). Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science(Washington)*, **297**, 2009-2010.
- Tajima F. (1993). Measurement of DNA polymorphism. *Mechanisms of molecular evolution*: 37-59.
- 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.
- 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.
- Thorn R. (1968). Les salamandres. P. Lechevalier, Paris.
- Tortorici L. (1981). Analisi delle deformazioni fragili dei sedimenti postorogeni della Calabria settentrionale. *Bollettino della Società Geologica Italiana*, **100**, 291-308.
- Tripepi S., Serroni P. and Brunelli E. (1999). Guida-atlante degli Anfibi della provincia di Cosenza. *Pellegrini Editore, Cosenza*.
- Tzedakis P., Lawson I., Frogley M., Hewitt G. and Preece R. (2002). Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science*, **297**, 2044.
- 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.
- 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**, 481-500.
- Van Valen L.. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, **1**, 1-30.
- Vandergast G.A., Bohonak A.J., Hathaway S.A., Boys J. and Fisher R.N. (2008). Are hotspots of evolutionary potential adequately protected in southern California? *Biological Conservation*, **141**, 1648– 1664
- 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**, 774-787.
- Veith M. (1994). Morphological, molecular and life history variation in *Salamandra salamandra*. *Mertensiella*, **4**, 355–397.
- Veith M., Kosuch J. and Vences M. (2003). Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, **26**, 310-327.
- Vila M., Vidal-Romaní J. and Björklund M. (2005). The importance of time scale and multiple refugia: incipient speciation and admixture of lineages in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, **36**, 249-260.
- Webb III T. and Bartlein P. (1992). Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **23**, 141-173.
- Weir B. and Cockerham C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wright S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to

systems of mating. *Evolution*, **19**, 395-420.

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.

FIGURE E TABELLE

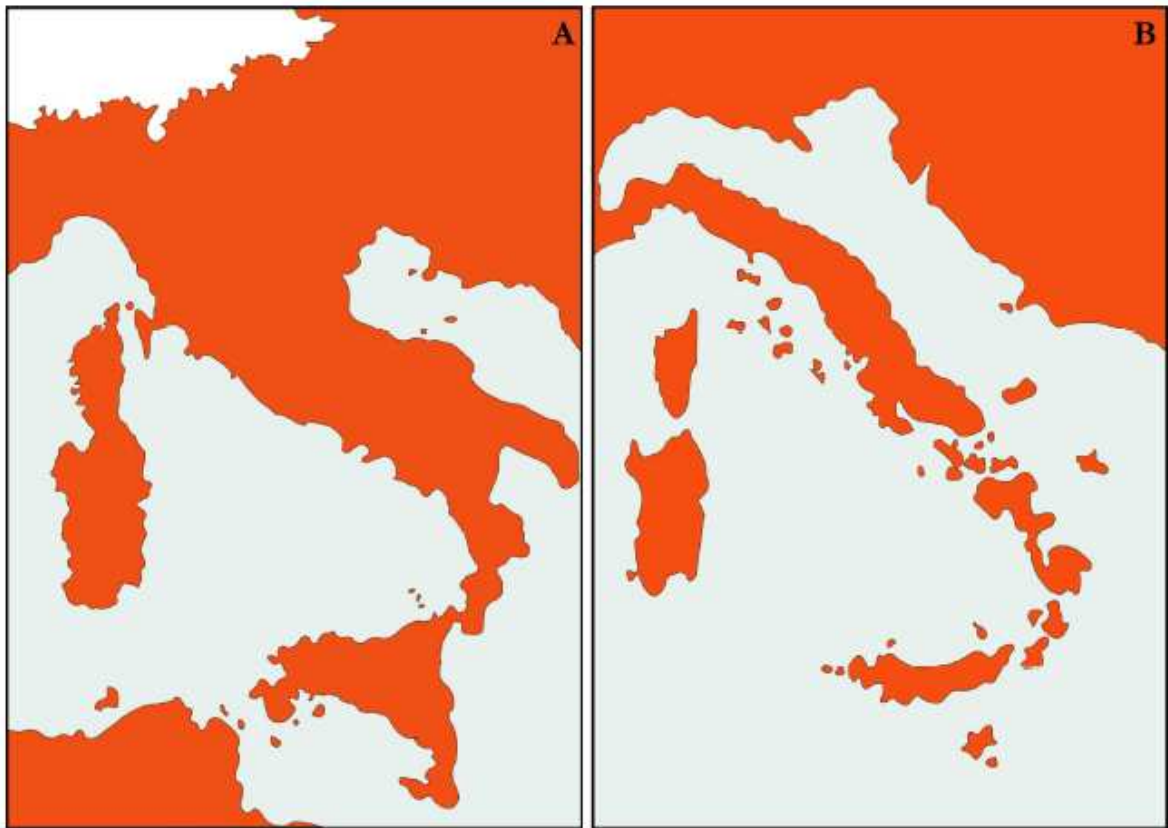


Figura 1. Variazioni della linea di costa durante il Plio-Pleistocene **A:** regressione marina (fasi glaciali); **B:** trasgressione marina (fasi interglaciali).

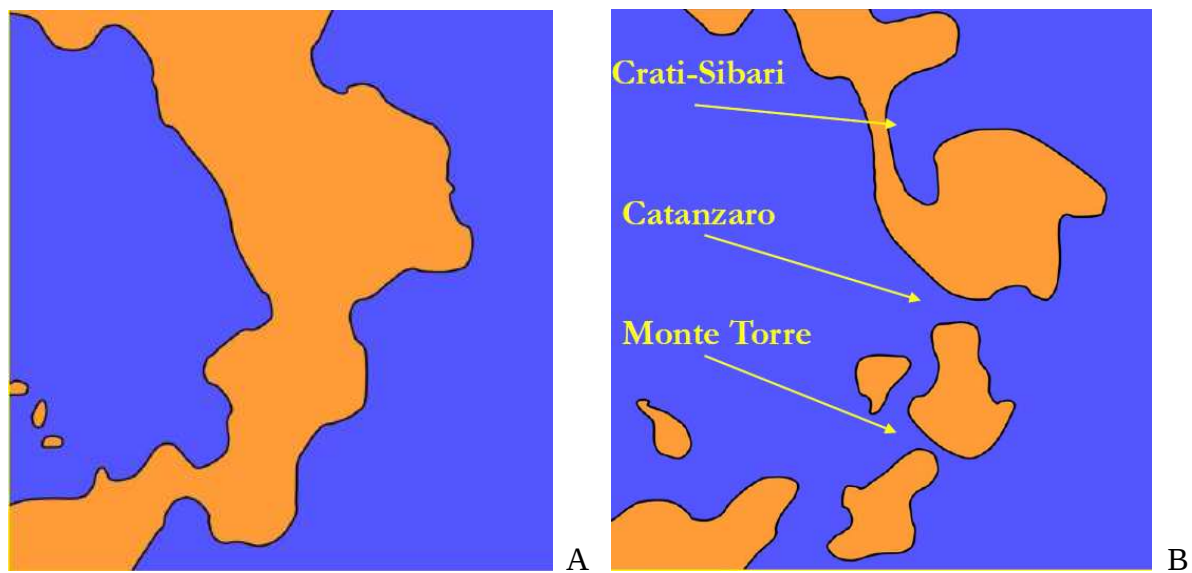


Figura 2. Evoluzione paleogeografica della penisola calabrese nelle fasi glaciali (**A**); e in quelle interglaciali (**B**).

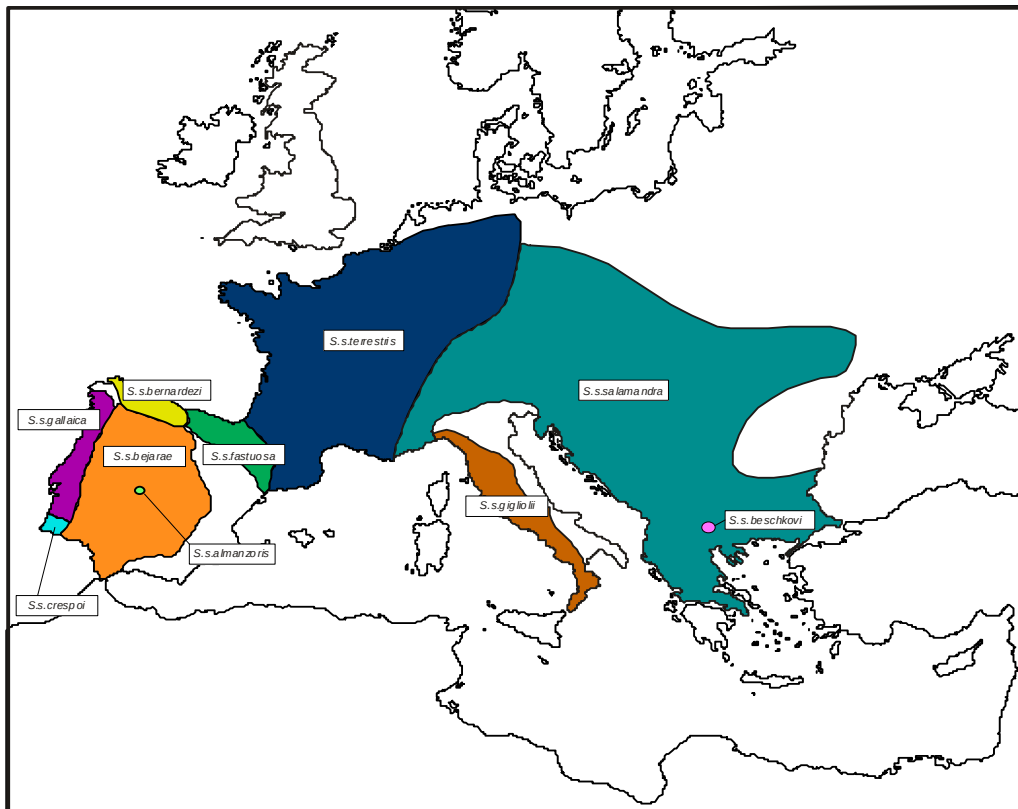


Figura 3. Distribuzione geografica di *S. salamandra* e delle sue sottospecie in Europa.

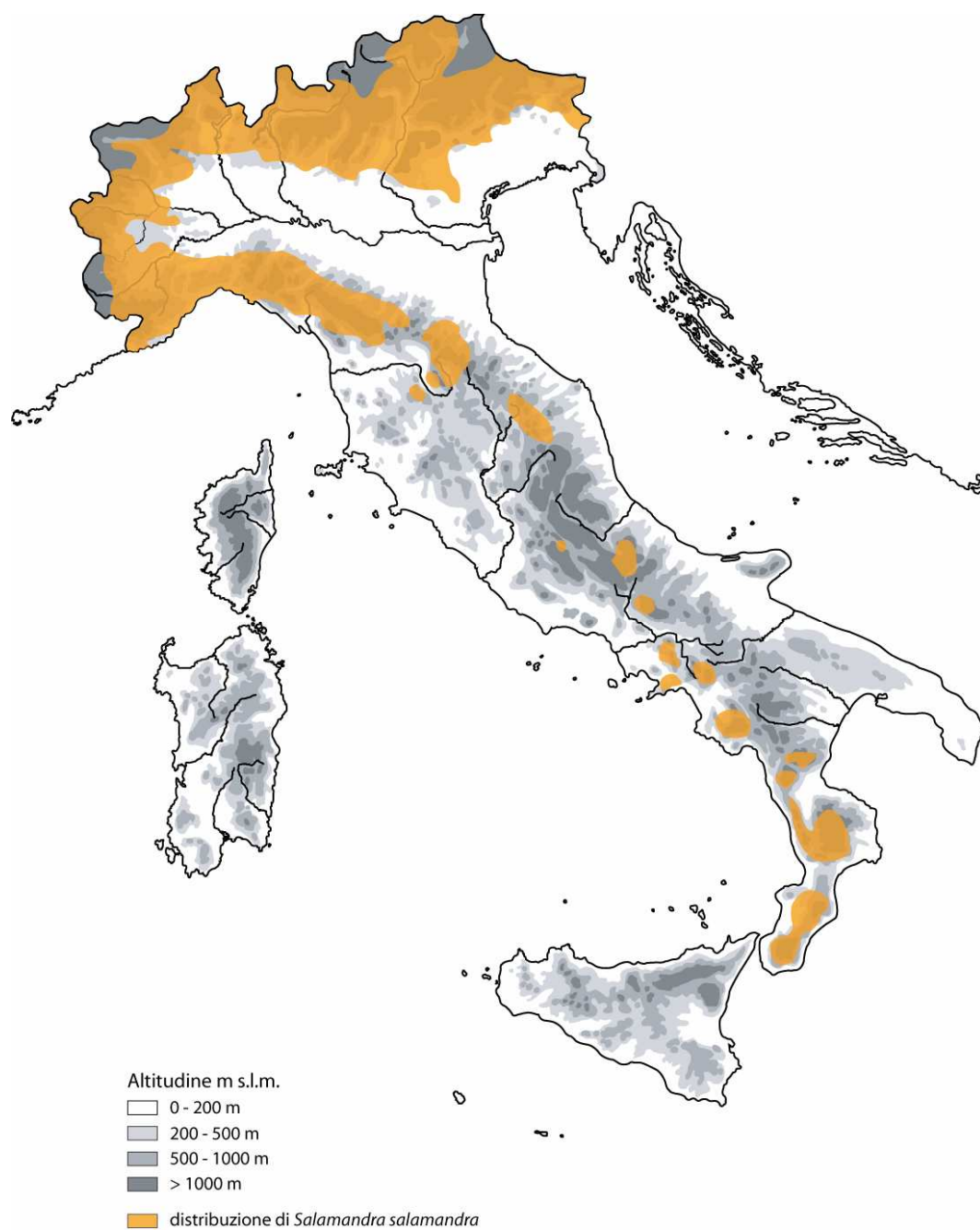


Figura 4. Distribuzione geografica di *S. salamandra* in Italia.



A



B

Figura 5. A. *Salamandra salamandra salamandra*. B *S. s. giglioli*



Figura 6. *Lissotriton italicus*.



Figura 7. Distribuzione geografica di *L. italicus* in Italia.



Figura 8. *Rana dalmatina*.



Figura 9. Distribuzione geografica di *R. dalmatina* in Europa.

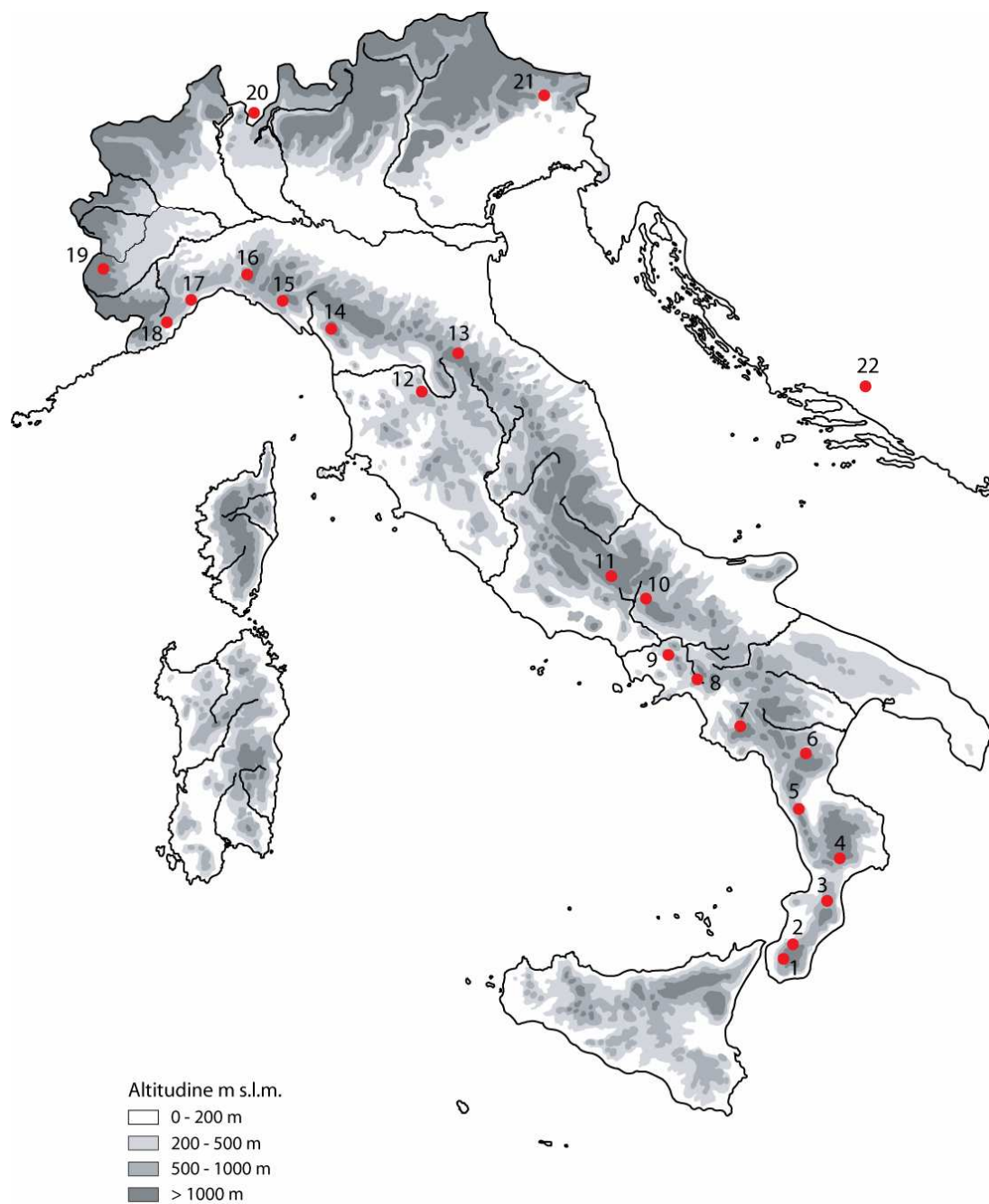


Figura 10. Localizzazione geografica dei siti di campionamento di *S. salamandra* (le località sono numerate come in Tabella 1).

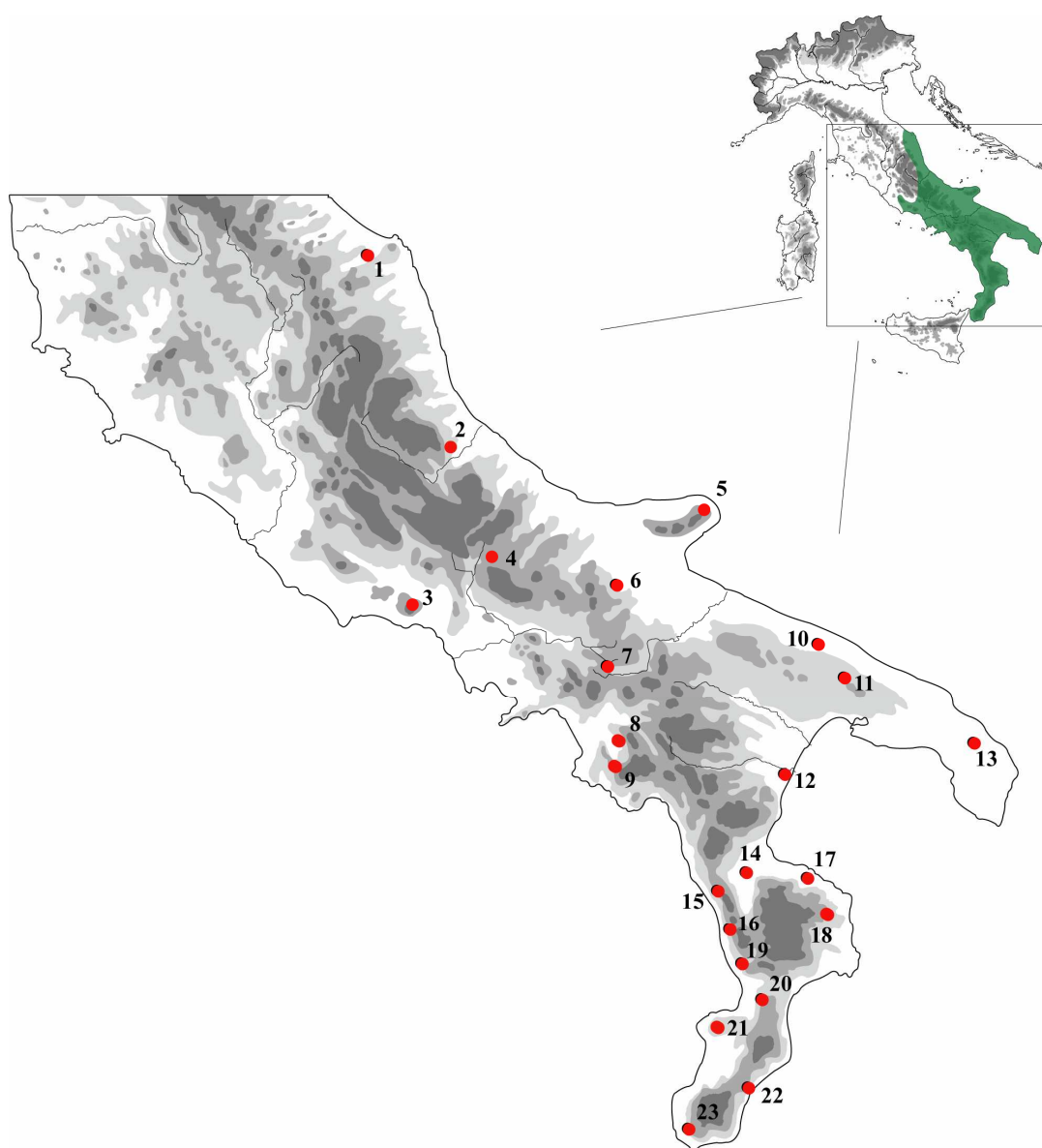


Figura 11. Localizzazione geografica dei siti di campionamento di *L. italicus* (le località sono numerate come in Tabella 2).

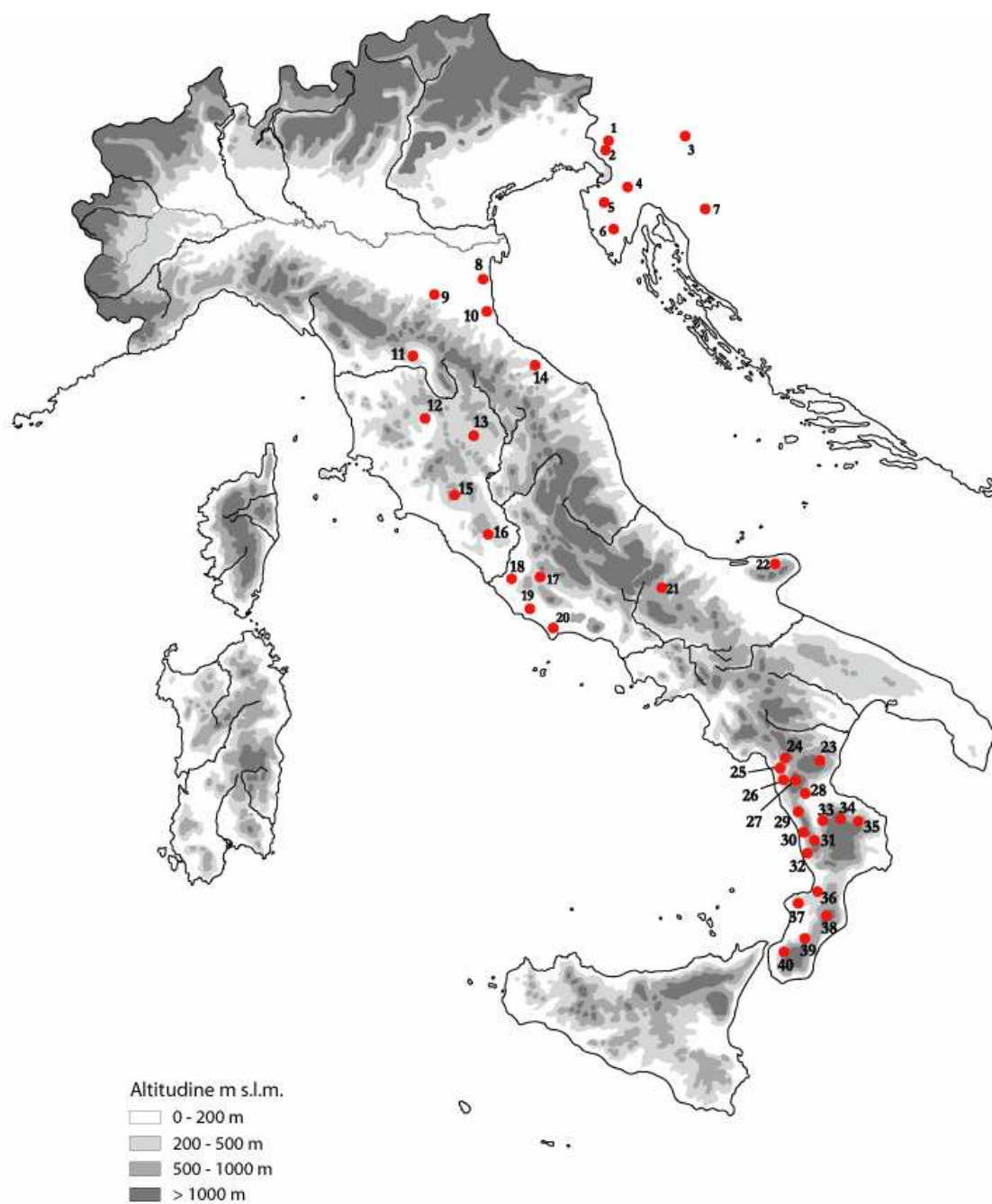


Figura 12. Localizzazione geografica dei siti di campionamento di *R. dalmatina* (le località sono numerate come in Tabella 3).

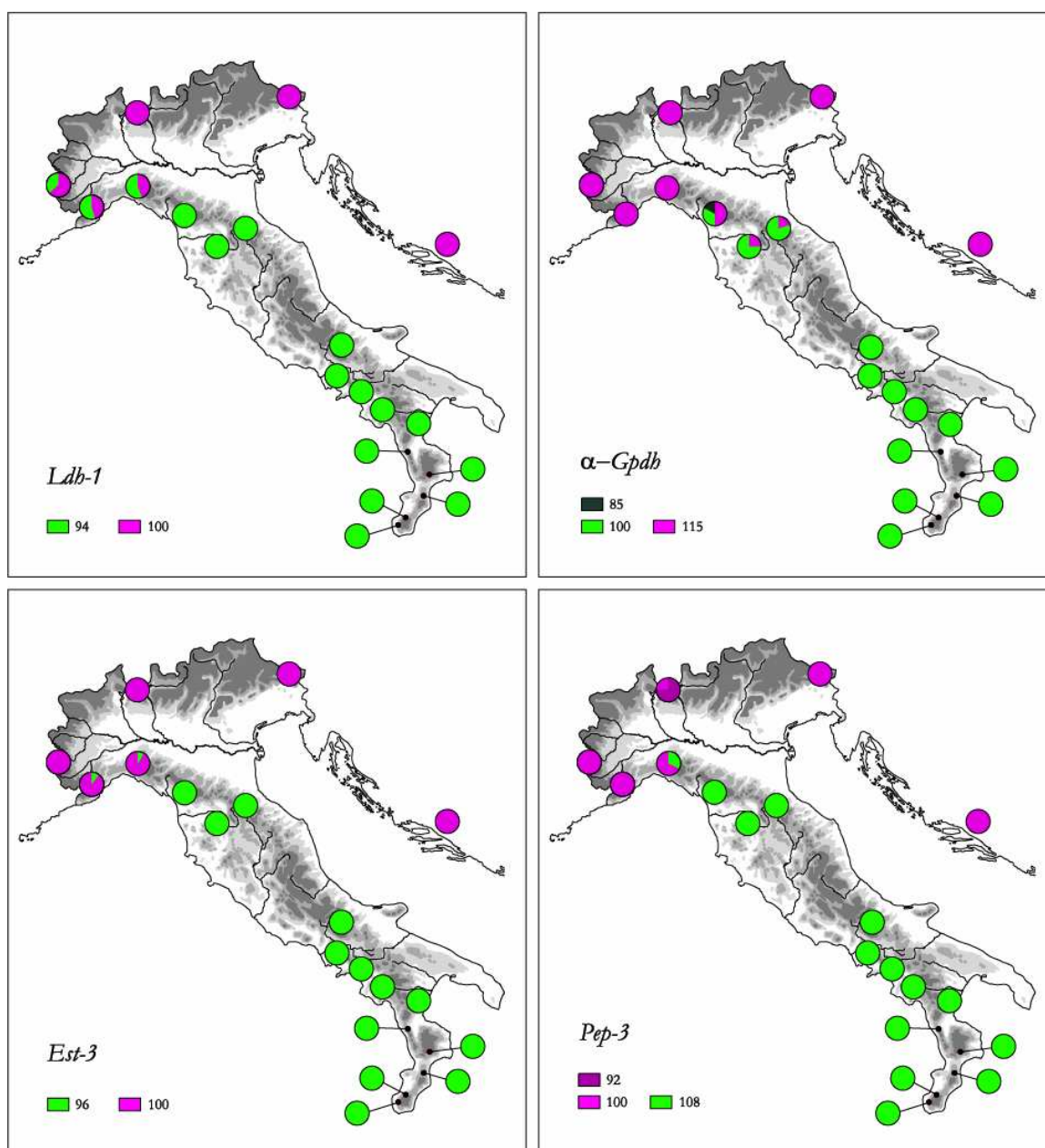


Figura 13. Variazione geografica delle frequenze alleliche a 8 loci polimorfici individuati in 19 popolazioni di *S. salamandra*. (continua)

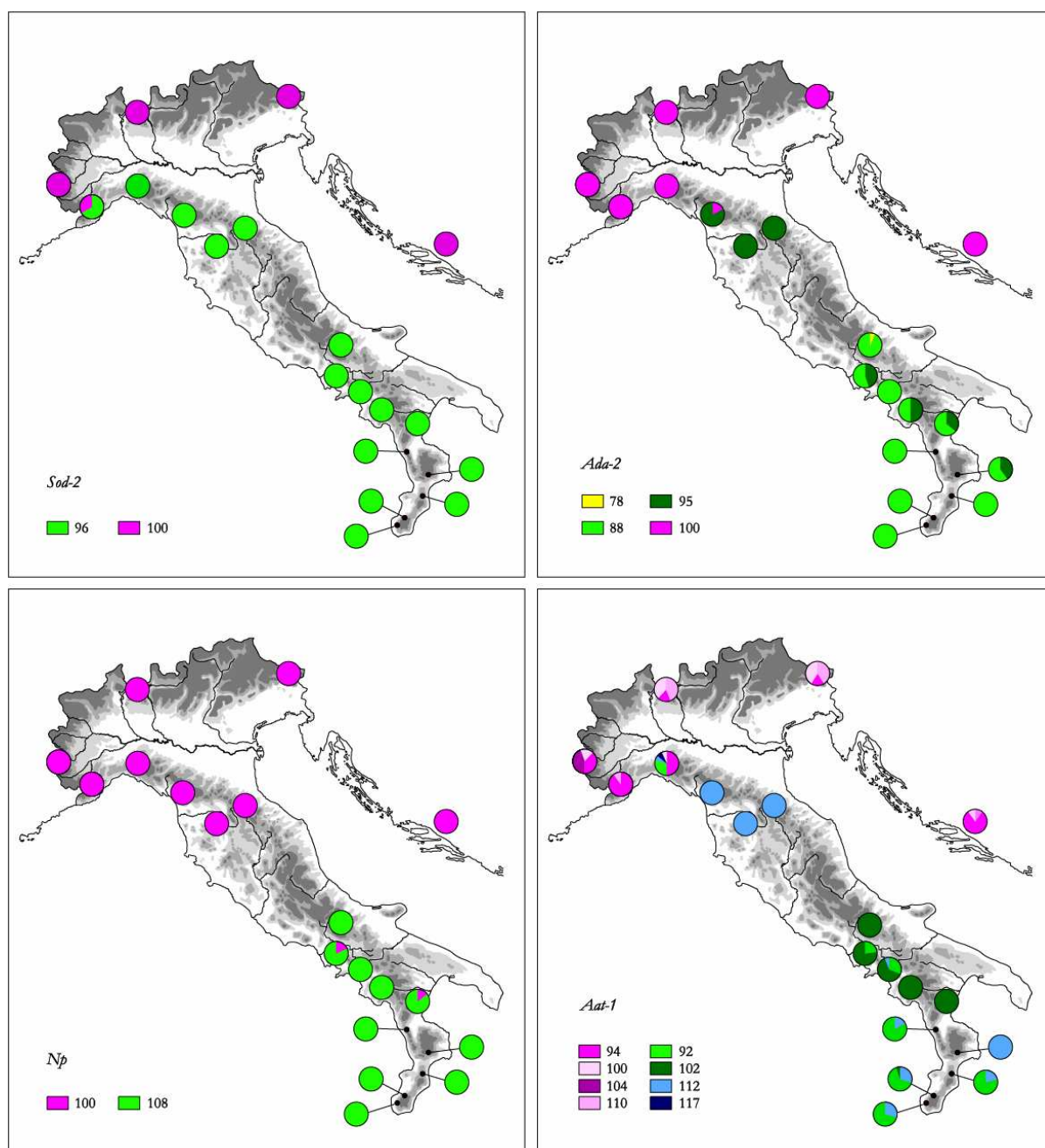


Figura 13. (continua).

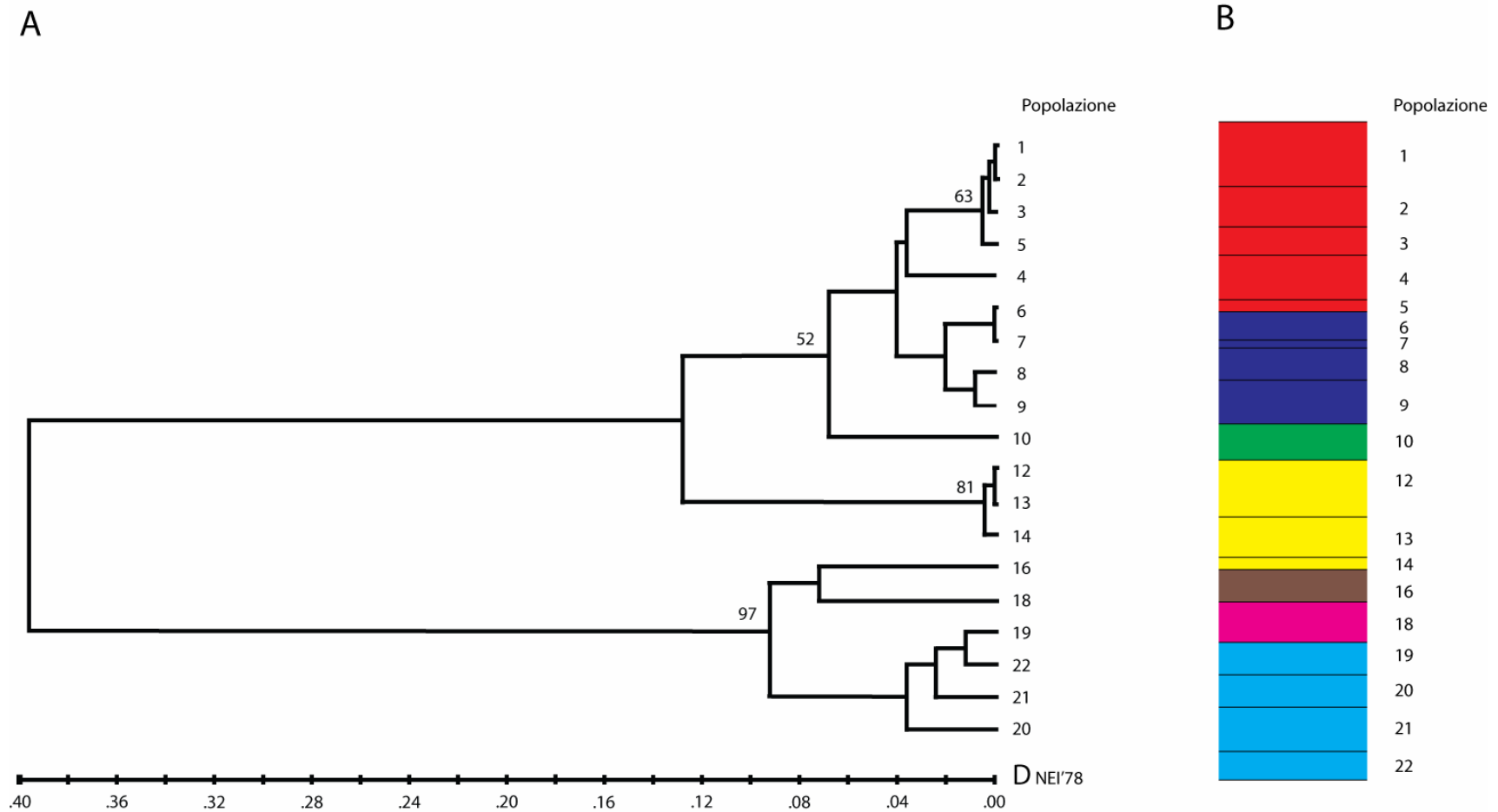


Figura 14. **A** Fenogramma UPGMA basato sulle distanze di Nei (1978). I valori di bootstrap >50% sono riportati ai nodi. **B** Analisi bayesiana non gerarchica dei cluster, effettuata mediante il software BAPS (Corrander *et al.* 2006). Ciascun colore individua un distinto cluster.

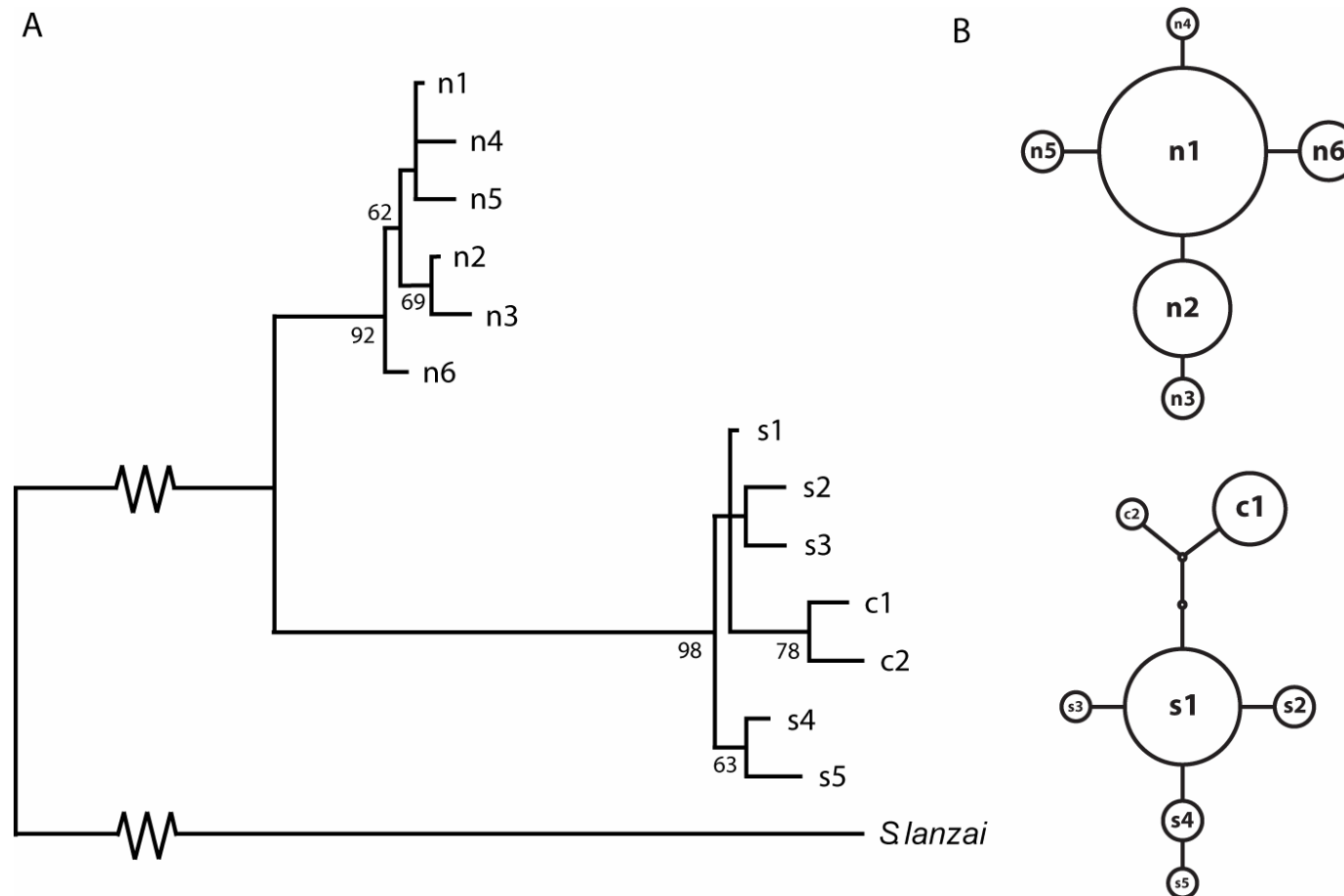


Figura 15. **A** Dendrogramma costruito con il metodo Neighbour-Joining, a partire dai valori di distanza genetica (HKY; Hasegawa *et al.*, 1985) tra gli aplotipi individuati al gene mitocondriale Cyt-b in *S. salamandra*. Ai nodi sono riportati i valori di bootstrap. **B** Network di parsimonia statistica tra gli aplotipi individuati. La dimensione degli aplotipi nel network è proporzionale al numero di osservazioni dell'aplotipo a livello dell'intero dataset..

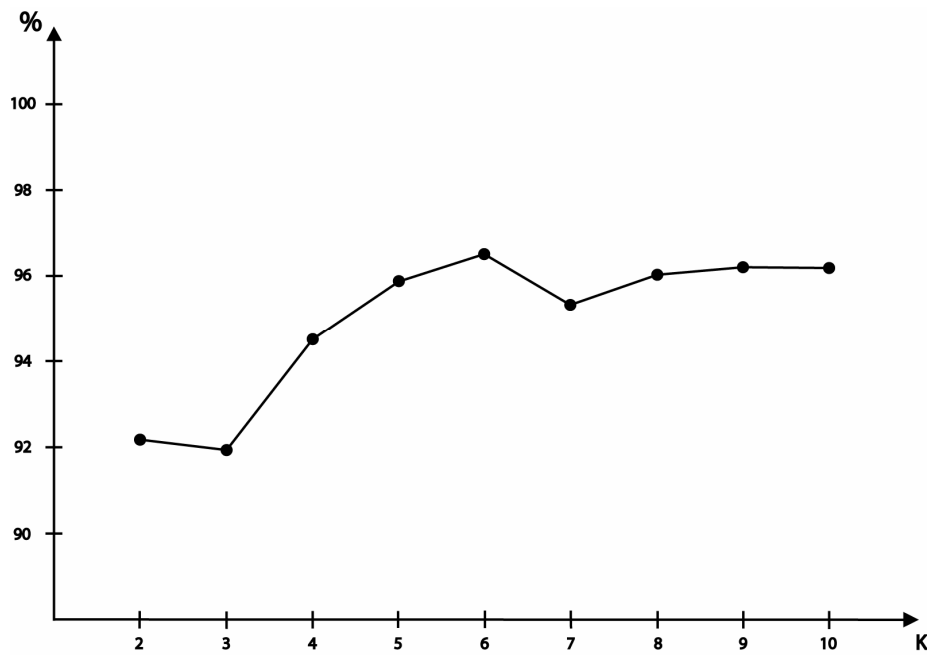
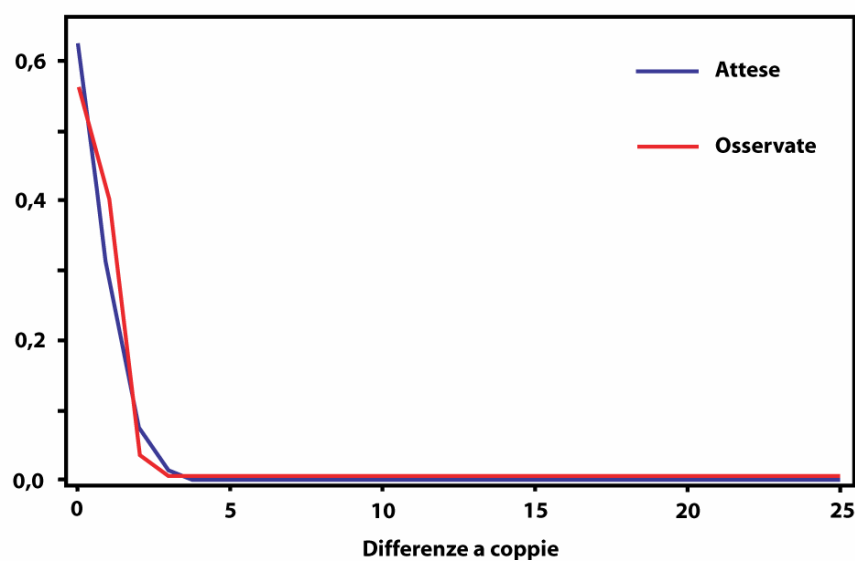


Figura 16. Variazione della percentuale di varianza complessiva spiegata, mediante l'analisi SAMOVA effettuata sul dataset mitocondriale di *S. salamandra*, dalle differenze tra gruppi al variare del numero di gruppi (k) inferiti.

A



B

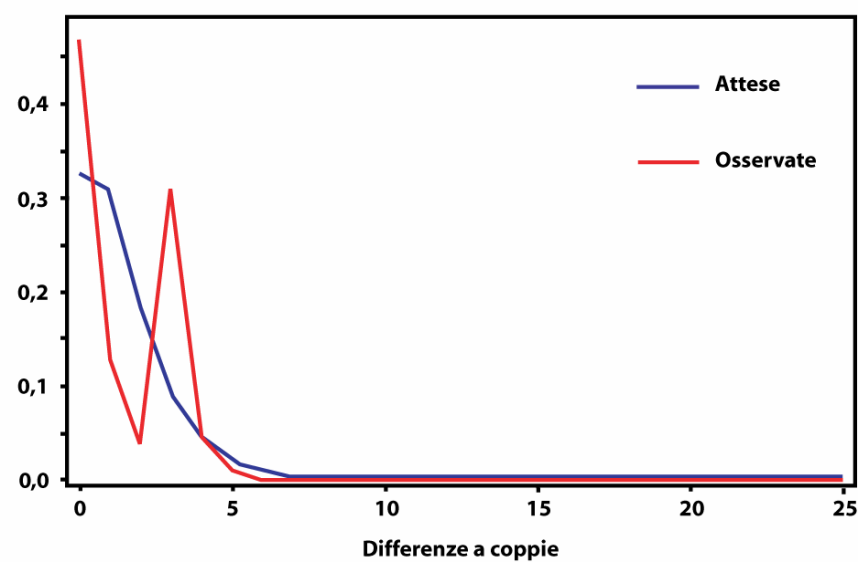


Figura 17. Analisi della frequenza delle differenze tra coppie di aplotipi (“*mismatch distribution*”). La linea rossa rappresenta la distribuzione osservata, mentre la linea blu rappresenta la distribuzione attesa (in base ai dati) in caso di improvvisa espansione demografica della popolazione. **A:** aplogruppo settentrionale **B:** aplogruppo meridionale.

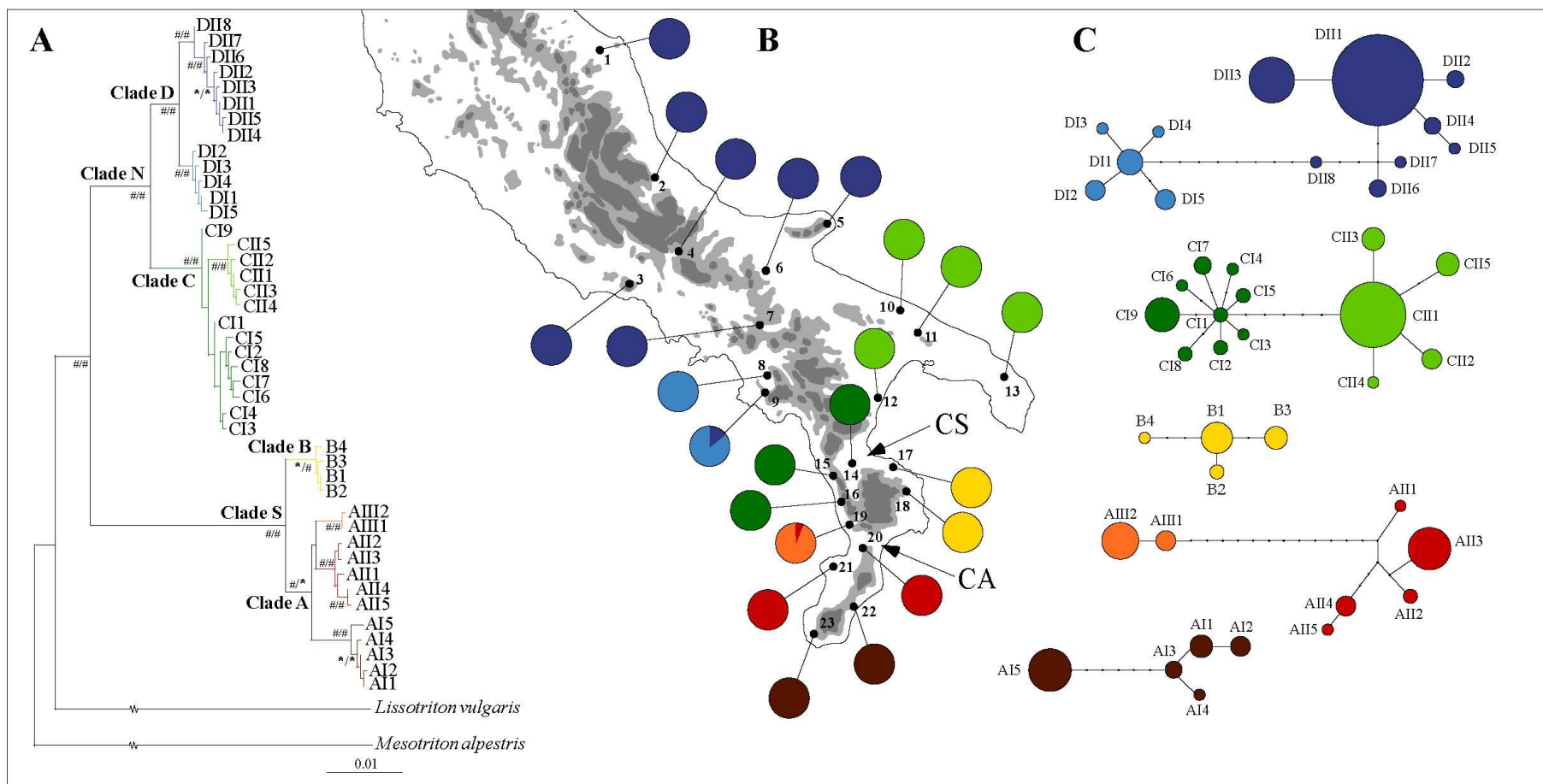


Figura 18. (A) Albero filogenetico ML basato sulla distanza genetica TrN93+ Γ , che illustra le relazioni filogenetiche tra i 43 aplotipi individuati combinando i due frammenti di mtDNA amplificati (ND2 e ND4) per i campioni di *L. italicus*. Ai nodi vengono riportati i valori di bootstrap (bs) sia per l'albero ML che MP (ML/MP). * = bs >70%; # = bs >90%. (B) Distribuzione delle maggiori linee evolutive individuate dall'analisi filogenetica. Le popolazioni sono numerate come in tabella 2. (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 2).

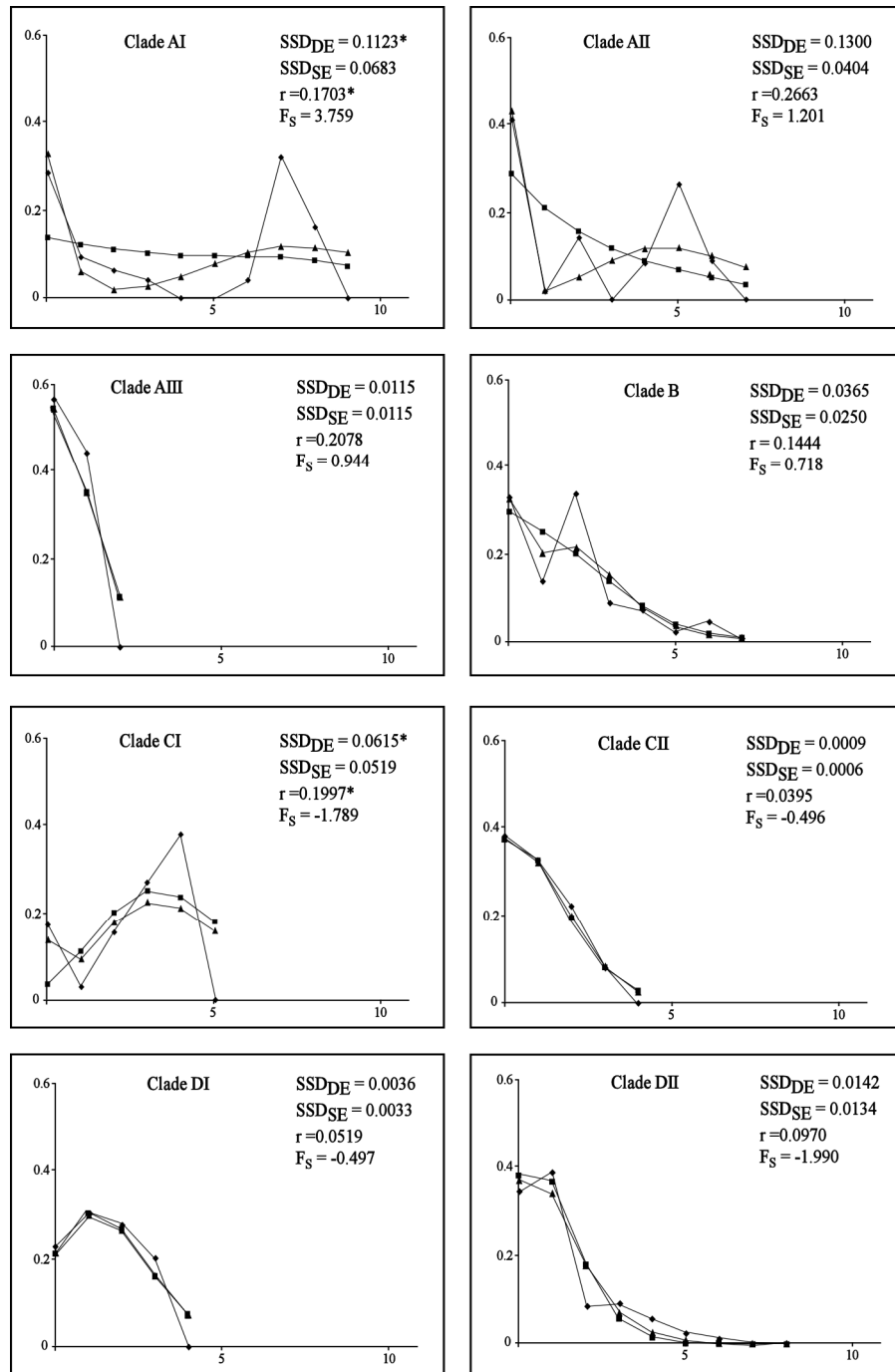


Figura 19. “Mismatch distribution” e valori dei test statistici di demografia storica per gli 8 cladi terminali di *L. italicus* identificati con l'analisi filogenetica. SSD: somma del quadrato della deviazione per la *goodness-of-fit* tra distribuzione delle differenze tra coppie di aplotipi osservata e quella attesa secondo il modello di una rapida espansione demografica (SSD_{DE}) e il modello di espansione spaziale (SSD_{SE}). *r*: *raggedness* (Harpending, 1994). *F_S*: *F_S* della statistica di Fu (Fu, 1997). **P* < 0.05; ♦: distribuzione delle differenze a coppie di aplotipi osservate; ■: distribuzione delle differenze a coppie di aplotipi attese secondo il modello di rapida espansione demografica; ▲: distribuzione delle differenze a coppie di aplotipi attese secondo il modello di espansione spaziale.

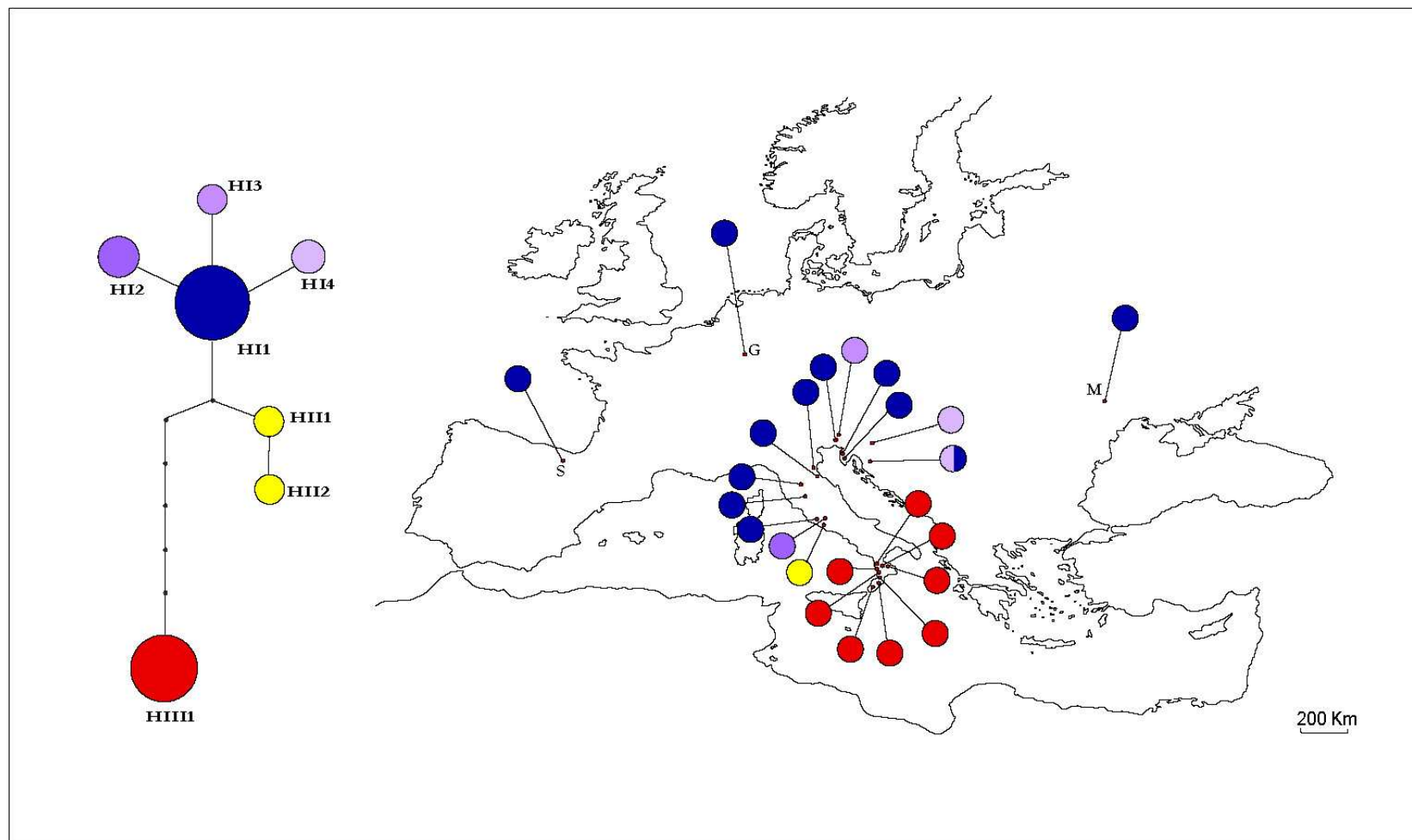


Figura 20. Network di parsimonia statistica tra gli aplotipi individuati per il marcatore mitocondriale 16S nei campioni di *R. dalmatina* e loro distribuzione geografica.

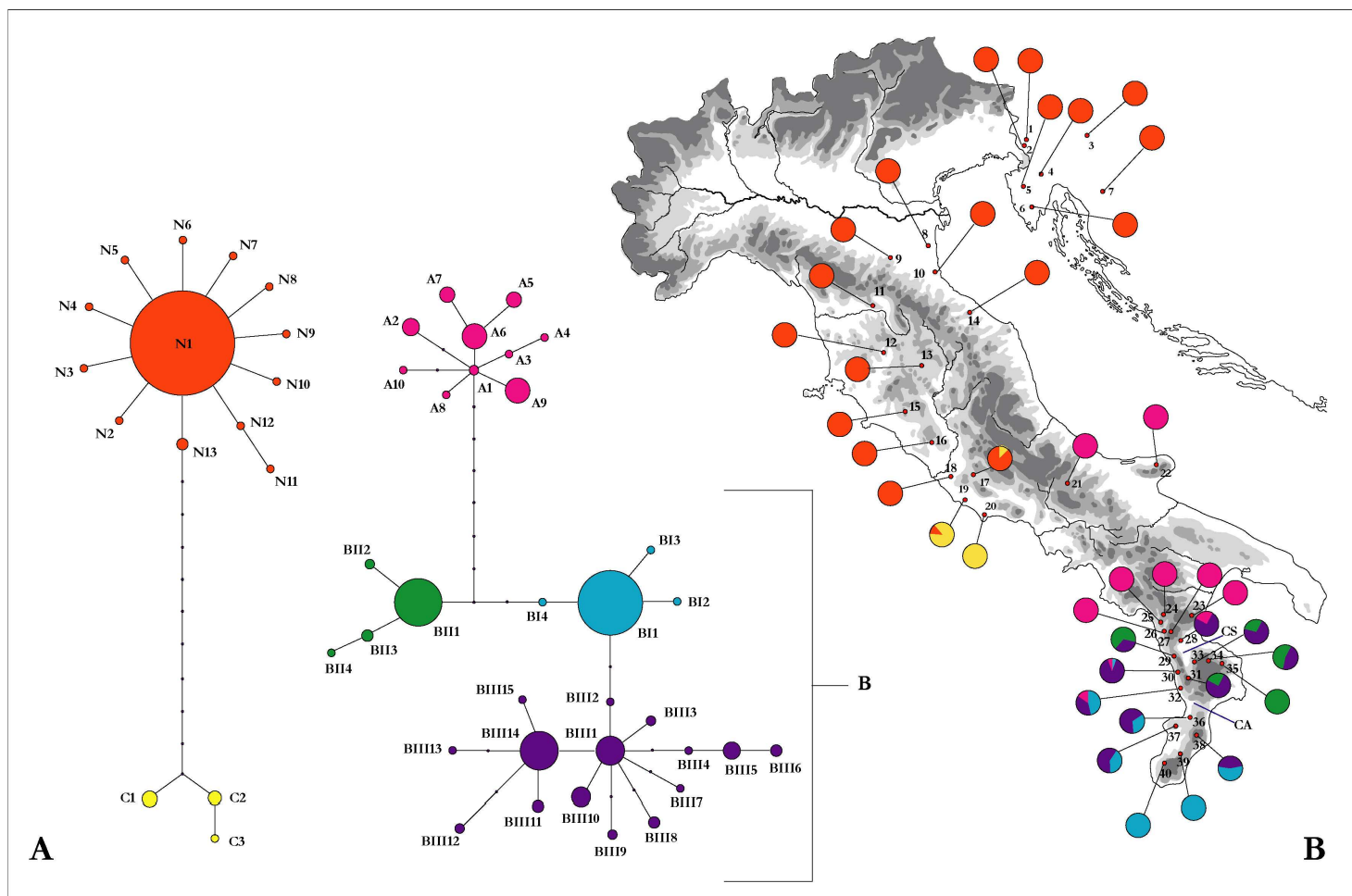


Figura 21. A. Network di parsimonia statistica tra gli aplotipi individuati nei campioni di *R. dalmatina* combinando i due frammenti di mtDNA CytB e COI. La dimensione degli aplotipi nel network è proporzionale al numero di osservazioni dell'aplotipo a livello dell'intero dataset. I cerchi piccoli rappresentano gli aplotipi intermedi inferiti ma non trovati. **B.** Distribuzione geografica dei 6 aplogruppi individuati.

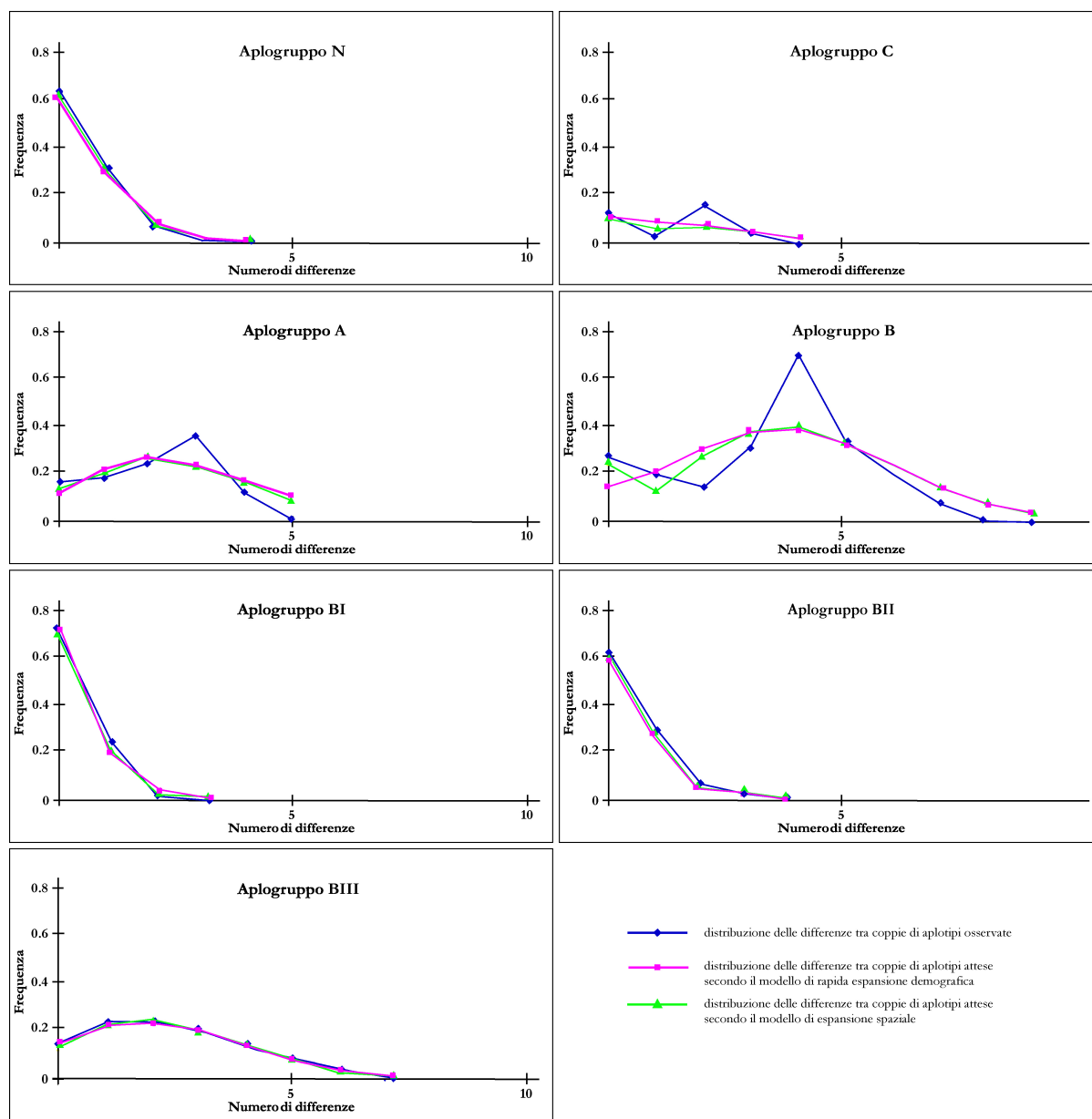


Figura 22. Analisi della frequenza delle differenze tra coppie di aplotipi (“*mismatch distribution*”) per i 7 aplogruppi individuati in *R. dalmatina*.

Tabella 1. Localizzazione geografica dei 22 siti di campionamento di *S. salamandra* e numero di individui analizzati.

	Località di campionamento	Quota (metri s.l.m.)	Coordinate		N	
			lat	long	allozimi	mtDNA
1	Gambarie	1310	38°10'	15°50'	16	15
2	Carmelia	1220	38°14'	15°55'	10	8
3	Serra S.Bruno	805	38°35'	16°20'	7	4
4	Villaggio Mancuso	520	39°01'	16°35'	11	10
5	Fagnano Castello	1090	39°33'	16°01'	3	3
6	S. Severino Lucano	890	40°04'	16°06'	7	9
7	Laurino	750	40°20'	15°19'	2	2
8	Giffoni	770	40°46'	14°55'	8	7
9	Cervinara	550	41°01'	14°36'	11	10
10	Pescolanciano	945	41°43'	14°20'	9	5
11	Val Fondillo	930	41°42'	14°21'	-	4
12	Volpaia	530	43°30'	11°22'	15	10
13	Camaldoli	930	43°50'	11°49'	10	10
14	Cipollaio	820	44°03'	10°15'	3	10
15	Passo del Bracco	610	44°15'	9°34'	-	5
16	Vallecalda	580	44°32'	8°57'	11	4
17	Manie	350	44°12'	8°22'	-	5
18	Colle S. Bartolomeo	320	43°59'	7°57'	10	8
19	Sampeyre	950	44°34'	7°11'	8	8
20	Banco	660	46°00'	8°50'	8	5
21	Campone	450	46°15'	12°49'	11	7
22	Makarska	780	43°17'	17°02'	7	4

lat: latitudine; long: longitudine; N: numero di individui analizzati.

Tabella 2. Localizzazione geografica delle 23 popolazioni campionate di *L. italicus* , numero di individui analizzati e distribuzione geografica degli aplotipi individuati.

	Località di campionamento	Coordinate		<i>N</i>	Aplotipi (<i>n</i>)
		Lat.	Long.		
1	Serra San Quirico	43°26'	13°1'	2	DII1(2)
2	Cascata Vitello D'oro	42°26'	13°49'	1	DII1(1)
3	M. Redentore	41°18'	13°37'	14	DII1(1), DII3(13)
4	Pescolanciano	41°40'	14°20'	16	DII1(13), DII2(3)
5	Foresta Umbra	41°51'	16°01'	4	DII1(4)
6	Roseto Valfortore	41°22'	15°5'	12	DII1(8), DII4(3), DII5(1)
7	Conza	40°51'	15°20'	4	DII6(3), DII7(1)
8	Ottati	40°27'	15°19'	10	DI1(4), DI2(4), DI3(1), DI4(1)
9	Stio	40°18'	15°15'	7	DII8(1), DI1(2), DI5(4)
10	Lago Castiglione	40°57'	17°7'	12	CII1(12)
11	Alberobello	40°47'	17°14'	6	CII3(5), CII4(1)
12	Policoro	40°12'	16°40'	9	CII1(1), CII2(3), CII5(5)
13	Lecce	40°21'	18°10'	7	CII1(7)
14	Tarsia	39°37'	16°16'	9	CI9(9)
15	Lago dei Due Uomini	39°33'	16°1'	8	CI1(2), CI2(2), CI3(1), CI4(1), CI5(2)
16	San Lucido	39°17'	16°05'	6	CI6(1), CI7(3), CI8(2)
17	Crosia	39°34'	16°46'	8	B1(8)
18	Verzino	39°18'	16°51'	8	B2(2), B3(5), B4(1)
19	Nocera Tirinese	39°2'	16°9'	15	AII1(1), AIII1(4), AIII2(10)
20	Polia	38°44'	16°20'	12	AII 3(12)
21	Zungri	38°40'	15°59'	6	AII2(2), AII 4(3), AII5(1)
22	S. Ilario dello Jonio	38°13'	16°11'	13	AI1(5), AI2(4), AI3(1), AI4(3)
23	Madonna dell'Oleandro	38°0'	15°43'	12	AI5(12)

lat: latitudine; long: longitudine; *N*: numero di individui analizzati.

Tabella 3. Localizzazione geografica delle 40 popolazioni campionate di *R. dalmatina*, numero di individui analizzati e distribuzione geografica degli aplotipi di mtDNA individuati.

	Località di campionamento	Coordinate		<i>N</i>	Aplotipi (<i>n</i>)
		lat.	long.		
1	Slovenia Komen	45° 49'	13°45'	3	N1(3)
2	Gorjansko	45° 48'	13°42'	1	N1(1)
3	Kocevje	45° 37'	14°53'	1	N11(1)
4	Croazia Roc	45° 23'	14°03'	1	N1(1)
5	Livade-Trombal	45° 21'	13° 47'	3	N1(3)
6	Svetvincenant	45° 04'	13° 53'	4	N1(3), N8(1)
7	Dreznica	45° 06'	15°07'	4	N1(1), N9(1), N10(1), N12(1)
8	Italia Punta Alberete	44° 31'	12°13'	6	N1(5),N5(1)
9	Pianoro	44°29'	11°20'	4	N1(3),N6(1)
10	Pineta di Classe	44° 21'	12°19'	6	N1(5), N7(1)
11	Grve in Chianti	43°35'	11°18'	4	N1(4)
12	Torrente Farma	43° 47'	11°14'	3	N1(3)
13	Trasimeno	43° 08'	12°10'	1	N1(1)
14	Urbino	43°43'	12°38'	1	N4(1)
15	Selva del Lamone	42°33'	11°43'	7	N1(4), N13(3)
16	Canale Monterano	42°08'	12°06'	3	N1(3)
17	Stagni della Doganella	41°42'	12°43'	8	N1(7), C1(1)
18	Decima Malafede	41°44'	12°25'	6	N1(4), N2(1), N3(1)
19	Fogolino	41° 27'	12°42'	8	N1(1), C1(4), C2(2), C3(1)
20	Circeo	41°14'	13°04'	2	C2(2)
21	Pescolanciano	41°40'	14°20'	1	A8(1)
22	Foresta Umbra	41°51'	16°01'	8	A2(6), A3(1), A4(1)
23	Lago Fondo	39°55'	16°14'	8	A5(5), A6(2), A7(1)

(continua)

lat: latitudine; long: longitudine; *N*: numero di individui analizzati

Tabella 3. (continua)

	Località di campionamento	Coordinate		<i>N</i>	Aplotipi (<i>n</i>)
		lat.	long.		
24	Acqualisparti	39°59'	15°52'	6	A6(2), A7(4)
25	Massadita	39°51'	16°18'	6	A6(6)
26	Santa Domenica in Talao	39°49'	15° 52'	8	A1(1), A9(7)
27	Orsomarso	39°48'	15°54'	1	A1(1)
28	Ficara	39°39'	16°07'	4	A9(1), BIII1(2), BIII7(1)
29	Lago Trifoglietti	39°33'	16°01'	9	BII1(1), BII2(2), BII3(2), BII4(1), BIII4(1), BIII5(2)
30	San Lucido	39° 17'	16°05'	19	A10(1), BI4(1), BIII1(1), BIII5(2), BIII6(3), BIII10(4), BIII14(7)
31	Cerisano	39°15'	16°09'	8	BII1(2), BIII10(3), BIII14(3)
32	Bel Monte Calabro	39°10'	16°05'	13	A9(2), BI1(6), BIII12(2), BIII14(3)
33	San Pietro in Guarano	39°20'	16°18'	7	BII1(2), BIII5(2), BIII11(2), BIII14(1)
34	Campo San Lorenzo	39°20'	16°29'	11	BII1(6), BIII1(1), BIII11(1), BIII14(3)
35	Macchialonga	39°22'	16°32'	12	BII1(11), BII3(1)
36	Lago di Angitola	39°07'	16°06'	6	BI1(2), BIII1(1), BIII3(2), BIII8(1)
37	Capo Vaticano	38°39'	16°01'	10	BI1(4), BIII1(5), BIII15(1)
38	Serra San Bruno	38°36'	16°20'	18	BI1(7), BI3(3), BIII2(1), BIII9(2), BIII1(2), BIII8(2), BIII13(1)
39	Zomaro	38°40'	15°59'	3	BI1(3)
40	Gambarie	38°10'	15°50'	10	BI1(9), BI2(1)

lat: latitudine; long: longitudine; *N*: numero di individui analizzati

Tabella 4. Enzimi analizzati, loci codificanti e sistema tampone utilizzato per ciascun enzima (sistemi tampone numerati come in Tabella 5)

Enzima	Codice internazionale	Locus codificante	Sistema tampone
α -Glicerofosfato deidrogenasi	1.1.1.8	α -Gpdh	2
Lattato deidrogenasi	1.1.1.27	Ldh-1 Ldh-2	4
Malato deidrogenasi	1.1.1.37	Mdh-1 Mdh-2	6
Enzima malico	1.1.1.40	Mdhp-1 Mdhp-2	2
Isocitrato deidrogenasi	1.1.1.42	Idh-1 Idh-2	2
6-Fosfogluconato deidrogenasi	1.1.1.44	6-Pgdh	2
Superossido dismutasi	1.15.1.1	Sod-1 Sod-2	3
Nucleoside fosforilasi	2.4.2.1	Np	3
Aspartato aminotransferasi	2.6.1.1	Aat-1 Aat-2	6
Peptidasi	3.04.11	Pep-3	2
Esterasi	3.1.1.1	Est-3	5
Adenosina deaminasi	3.5.4.4	Ada-1 Ada-2	2
Mannosio fosfato isomerasi	5.3.1.8	Mpi	3
Fosfoglucoisomerasi	5.3.1.9	Pgi	1
Fosfoglucomutasi	5.4.2.2	Pgm-1 Pgm-2	4

Tabella 5. Sistemi tampone utilizzati (le quantità sono per litro di soluzione)

TAMPONI	ELETTRODI	GEL
1 Tris citrato discontinuo (Poulik, 1957)	Tris 0,076 M, acido citrico 0,005 M, pH 8.2 (18,55 g di ac. borico, 2,40 g di NaOH)	Tris 0,076 M , ac. Citrico 0,005 M, pH 8.7 (9,21 g di Tris, 1,05 g di ac. citrico)
2. Tris/citrato continuo (Selander <i>et al.</i> , 1971)	Tris 0,678 M, acido citrico 0,157 M, pH 8 (83,2 g di Tris, 30 g di ac.citrato monoidrato)	Tris 0,023M , ac. Citrico 0,005 M, pH 8 (2,77 g di Tris, 1,1 g di ac. citrico)
3.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)
4. 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
5. Litio/borato discontinuo (Soltis <i>et al.</i> , 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).
6. 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 6. 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%
Icdh	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg		DL-isocitrato 30 mg	MTT 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%
Sod	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NAD 15 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%

(continua)

Tabella 6. (continua)

Enzima	Tamponi di colorazione	coenzimi	enzimi	substrati	metodi di visualizzazione
Aat	0,2 M Tris/HCl pH 8 50 ml			piridossal-5'-fosfato 10 mg	Fast Blue BB 150 mg
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	agar 0,8%
Est	0,1 M Na ₂ HPO ₄ 0,1 M KH ₂ PO ₄ pH 6,5 50 ml			α - e β -naftil-acetato 0,5% in 3,5 ml di acetone + 1,5 ml di H ₂ O	Fast Garnet GBC 100 mg
Ada	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml		EC 2.4.2.1 NP 0,02 ml EC 1.2.3.2 XO 0,02 ml	adenosina 20 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	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0.8%

Tabella 7. Primers e Temperature di annealing utilizzate per l'amplificazione dei diversi frammenti di mt-DNA e grandezza del frammento analizzato per ciascuna specie.

Specie	Regione	Primer	Sequenza primer	T. annealing (°C)	Grandezza del frammento (bp)
<i>S. salamandra</i>	CytB	494-salamod	5'-CATCAAACATCTCCTACTGATGAAA-3'	55	582
		CYTB-salamod	5' GGAGTAAGCAGTGAGATTACC 3'		
<i>L. italicus</i>	ND2	H5018 (Babik <i>et al.</i> , 2005)	5'-TCTGGGTTCATTCAGAAGA-3'	57,5	1137
		L3780 (Babik <i>et al.</i> , 2005)	5'-TCGAACCTACCCTGAGGAGAT-3'		
	ND4	ND4 (Babik <i>et al.</i> , 2005)	5'-CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC-3'	54	760
		Leu (Babik <i>et al.</i> , 2005)	5'-CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA-3'		
<i>R. dalmatina</i>	16S	16Sal (Palumbi <i>et al.</i> , 1991)	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	55	421
		16Sbh (Palumbi <i>et al.</i> , 1991)	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'		
	CytB	494 (Kocher <i>et al.</i> , 1989)	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	50	653
		MVZ16 (Moritz <i>et al.</i> , 1992)	5'-AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTTRAT-3'		
	COI	Amp-P3f (San Mauro <i>et al.</i> , 2004)	5'-CAATACCAAACCCCTT(AG)TT(CT)GT(AT)TGATC-3'	50	751
		Amp-P3r (San Mauro <i>et al.</i> , 2004)	5'-GCTTCTCA(AG)ATAATAAATAT(CT)AT-3'		

Tabella 8. Frequenze alleliche ai 18 loci polimorfici individuati in 19 popolazioni di *S. salamandra* (numerate come in Tabella 1).

Popol./ Locus		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	16	18	19	20	21	22
Ldh-1	94	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	0,56	0,55	0,38	----	----	----
	100	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,44	0,45	0,63	1,00	1,00	1,00
α -Gpdh	85	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,17	----	----	----	----	----	----
	100	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,25	0,20	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	115	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	0,80	0,33	----	----	----	----	----	----
Aat-1	92	0,71	0,65	0,79	----	0,83	----	----	0,31	0,23	----	----	----	----	0,29	----	----	----	----	----
	94	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,50	0,90	0,38	0,19	0,18	0,80
	100	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,07	----	0,19	0,38	0,41	0,10
	102	----	0,05	----	----	----	1,00	1,00	0,63	0,77	1,00	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	104	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,44	----	----	----
	110	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,10	----	0,44	0,41	0,10
	112	0,29	0,30	0,21	1,00	0,17	----	----	0,06	----	----	1,00	1,00	1,00	0,07	----	----	----	----	----
	117	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,07	----	----	----	----	----
Pgi	100	0,23	0,35	0,50	----	----	0,07	----	0,56	0,55	0,22	0,29	0,30	0,67	0,94	1,00	1,00	0,88	0,86	1,00
	108	0,77	0,65	0,50	1,00	1,00	0,93	1,00	0,44	0,46	0,78	0,71	0,70	0,33	0,06	----	----	0,13	0,14	----
6-Pgdh	90	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,38	0,71	0,70	0,83	1,00	0,50	1,00	0,69	0,42	0,83
	100	0,06	----	----	----	----	----	----	----	----	0,63	0,29	0,30	0,17	----	0,50	----	0,31	0,58	0,17
Est-3	96	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	0,08	0,10	----	----	----	----
	100	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,92	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00
Np	100	----	----	----	----	----	0,14	----	----	0,18	----	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	108	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,86	1,00	1,00	0,82	1,00	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Pep-3	92	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,75	----	----
	100	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,68	1,00	1,00	0,25	1,00	1,00
	108	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	0,32	----	----	----	----	----

(continua)

Tabella 8. (continua).

Popol./ Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	16	18	19	20	21	22
Sod-2																			
96	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	0,67	----	----	----	----
100	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,33	1,00	1,00	1,00	1,00
Ada-2																			
78	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,06	----	----	----	----	----	----	----	----	----
88	1,00	1,00	1,00	0,60	1,00	0,64	0,50	1,00	0,55	0,94	----	----	----	----	----	----	----	----	----
95	----	----	----	0,40	----	0,36	0,50	----	0,45	----	1,00	1,00	0,83	----	----	----	----	----	----
100	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ada-1																			
90	----	----	----	----	----	0,07	----	----	0,05	----	----	----	----	----	----	----	----	0,05	----
100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93	1,00	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95	1,00
Pgm-1																			
100	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	0,30	1,00	1,00	1,00	1,00
106	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,70	----	----	----	----
Pgm-2																			
100	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30	1,00	1,00	1,00	1,00
110	----	0,10	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,70	----	----	----	----
Mdh-1																			
100	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	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00
106	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,05	----	----	----	----
Mdh-2																			
100	0,97	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	1,00
110	0,03	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Icdh-1																			
100	1,00	0,95	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
110	----	0,05	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Icdh-2																			
100	0,94	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	0,94	1,00	1,00	1,00
110	0,06	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,06	----	----	----
Mdhp-1																			
100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,79	0,50	0,81	1,00	0,22	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
104	----	----	----	----	----	0,21	0,50	0,19	----	0,78	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Tabella 9. Stime dei parametri di diversità genetica (mitocondriale e nucleare) per le 22 popolazioni campionate di *S. salamandra* (numerate come in Tabella 1).

Pop.	Allozimi				Mitocondriale		
	A	$P\%$	H_o	H_e	Aplotipi	b	$\pi(\times 10^3)$
1	1,2 (0,1)	21,7	0,047 (0,024)	0,046 (0,023)	s1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
2	1,2 (0,1)	17,4	0,065 (0,037)	0,053 (0,029)	s1, s3	0,250 (0,180)	0,431 (0,610)
3	1,1 (0,1)	8,7	0,062 (0,047)	0,036 (0,026)	s1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
4	1,0 (0,0)	4,3	0,017 (0,017)	0,021 (0,021)	s1, s2	0,355 (0,159)	0,613 (0,731)
5	1,0 (0,0)	4,3	0,014 (0,014)	0,012 (0,012)	s4, s5	0,666 (0,314)	1,151 (1,433)
6	1,2 (0,1)	21,7	0,062 (0,028)	0,057 (0,026)	c1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
7	1,1 (0,1)	8,7	0,043 (0,043)	0,043 (0,030)	c1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
8	1,2 (0,1)	13,0	0,054 (0,030)	0,057 (0,032)	c2, n2, n3	0,666 (0,160)	9,431 (5,913)
9	1,2 (0,1)	21,7	0,078 (0,037)	0,075 (0,034)	n2	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
10	1,2 (0,1)	17,4	0,025 (0,015)	0,055 (0,028)	n2	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
11	-	-	-	-	n2	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
12	1,1 (0,1)	13,0	0,065 (0,036)	0,052 (0,029)	n1, n4	0,200 (0,154)	0,345 (0,524)
13	1,1 (0,1)	13,0	0,061 (0,034)	0,050 (0,028)	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
14	1,2 (0,1)	17,4	0,101 (0,053)	0,070 (0,035)	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
15	-	-	-	-	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
16	1,3 (0,2)	21,7	0,075 (0,035)	0,080 (0,038)	n6	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
17	-	-	-	-	n1, n5	0,600 (0,175)	1,034 (1,132)
18	1,3 (0,1)	34,8	0,128 (0,047)	0,119 (0,040)	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
19	1,2 (0,1)	13,0	0,054 (0,034)	0,053 (0,034)	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
20	1,2 (0,1)	17,4	0,071 (0,036)	0,072 (0,036)	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
21	1,2 (0,1)	17,4	0,050 (0,029)	0,063 (0,035)	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
22	1,1 (0,1)	8,7	0,032 (0,022)	0,027 (0,019)	n1	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)

A : numero medio di alleli per locus; P : proporzione di loci polimorfici (criterio del 95%); H_o : eterozigosità osservata; H_e : eterozigosità attesa (Nei, 1978); b : diversità aplo-tipica; π : diversità nucleotidica. In parentesi sono indicati gli errori standard.

Tabella 10. Valori di distanza genetica di Nei (D_{NEI} ; 1978) tra le 19 popolazioni di *S. salamandra* (numerate come in Tabella 1).

Popolazione	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	16	18	19	20	21	22
1	----																		
2	0,00	----																	
3	0,00	0,00	----																
4	0,03	0,03	0,04	----															
5	0,00	0,00	0,01	0,04	----														
6	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	----													
7	0,06	0,06	0,07	0,05	0,06	0,00	----												
8	0,02	0,01	0,01	0,05	0,03	0,02	0,03	----											
9	0,04	0,03	0,03	0,05	0,04	0,01	0,02	0,01	----										
10	0,08	0,08	0,09	0,10	0,09	0,04	0,03	0,04	0,06	----									
12	0,12	0,12	0,13	0,07	0,14	0,11	0,13	0,14	0,09	0,18	----								
13	0,13	0,12	0,13	0,07	0,14	0,11	0,13	0,14	0,09	0,18	0,00	----							
14	0,14	0,13	0,13	0,09	0,16	0,13	0,15	0,14	0,10	0,21	0,00	0,01	----						
16	0,28	0,27	0,25	0,30	0,29	0,29	0,32	0,26	0,23	0,37	0,21	0,22	0,15	----					
18	0,44	0,42	0,42	0,46	0,47	0,45	0,49	0,42	0,39	0,49	0,34	0,34	0,27	0,07	----				
19	0,42	0,40	0,39	0,43	0,44	0,42	0,46	0,39	0,36	0,50	0,33	0,34	0,26	0,06	0,09	----			
20	0,44	0,43	0,42	0,46	0,46	0,45	0,48	0,42	0,39	0,50	0,35	0,35	0,28	0,10	0,13	0,05	----		
21	0,47	0,46	0,45	0,49	0,49	0,47	0,51	0,45	0,42	0,51	0,36	0,37	0,30	0,09	0,10	0,03	0,03	----	
22	0,46	0,45	0,43	0,48	0,49	0,47	0,50	0,44	0,40	0,54	0,37	0,38	0,30	0,07	0,08	0,01	0,04	0,02	----

Tabella 11. Risultati dell'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) in *S. salamandra*, effettuata tenendo conto del miglior raggruppamento per il dataset allozimico, come indicato dall'analisi non gerarchica dei cluster effettuata con il software BAPS (Corander *et al.*, 2006).

Componenti della variazione	Gradi di libertà	Percentuale di variazione	Statistiche F
Tra gruppi	6	73,87	$F_{CT} = 0.74$
Tra popolazioni all'interno dei gruppi	12	6,30	$F_{SC} = 0.24$
All'interno delle popolazioni	307	19,83	$F_{ST} = 0.80$

Tabella 12. Matrice dei valori di F_{ST} (stimati tenendo conto della distanza genetica di Tamura & Nei, 1993) tra le 22 popolazioni di *S. salamandra* (numerate come in Tabella 1) studiate a livello mitocondriale (582 bp interne al gene per l'enzima Citocromo-b).

Popolazione	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	----																					
2	0,08	----																				
3	0,00	0,00	----																			
4	0,17	0,06	0,00	----																		
5	0,93	0,75	0,79	0,72	----																	
6	1,00	0,96	1,00	0,94	0,97	----																
7	1,00	0,93	1,00	0,90	0,90	0,00	----															
8	0,86	0,80	0,73	0,81	0,72	0,85	0,71	----														
9	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,09	----													
10	1,00	0,99	1,00	0,98	0,99	1,00	1,00	0,00	0,00	----												
11	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	----											
12	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,27	0,91	0,88	0,87	----										
13	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,29	1,00	1,00	1,00	0,00	----									
14	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,29	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	----								
15	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	1,00	1,00	0,15	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	----							
16	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	1,00	1,00	0,24	1,00	1,00	1,00	0,87	1,00	1,00	1,00	----						
17	0,99	0,97	0,98	0,97	0,96	0,99	0,97	0,17	0,87	0,79	0,76	0,27	0,42	0,42	0,25	0,76	----					
18	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,24	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,36	----				
19	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,24	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,36	0,00	----			
20	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	1,00	1,00	0,15	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,25	0,00	0,00	----		
21	1,00	0,99	1,00	0,98	0,99	1,00	1,00	0,22	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,33	0,00	0,00	0,00	----	
22	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	1,00	1,00	0,10	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	----

Tabella 13. Risultati dell'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) in *S. salamandra*, effettuata sul dataset mitocondriale, tenendo conto della distanza genetica di Tamura & Nei, 1993. I gruppi popolazioni sono stati definiti come suggerito dall'analisi SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002).

Componenti della variazione	Gradi di libertà	Percentuale di variazione	Statistiche F
Tra gruppi	5	96,49	$F_{CT} = 0.96$
Tra popolazioni all'interno dei gruppi	16	0,16	$F_{SC} = 0.04$
All'interno delle popolazioni	132	3,35	$F_{ST} = 0.96$

Tabella 14. 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) e stime di diversità nucleotidica (π) e aplo tipica (h) (Nei, 1987) per ciascuno degli otto cladi terminali individuati dall'analisi filogenetica di *L. italicus* (in parentesi viene riportata la deviazione standard).

Clade	TMRCA*		Diversità genetica	
	mean	95% hpd	π (x10 ³)	h
AI	84	26-156	2.16 (1.24)	0.72 (0.07)
AII	72	23-136	1.30 (0.82)	0.59 (0.12)
AIII	28	2-53	0.23 (0.24)	0.44 (0.11)
B	72	23-136	0.87 (0.61)	0.68 (0.09)
CI	54	18-101	1.40 (0.86)	0.83 (0.07)
CII	39	15-70	0.53 (0.41)	0.62 (0.08)
DI	44	14-81	0.76 (0.55)	0.78 (0.06)
DII	93	33-167	0.66 (0.47)	0.66 (0.06)
A	305	139-495		
S	481	226-796		
C	127	229-44		
D	216	84-376		
N	581	255-989		
INGROUP	1678	808-2660		

Tabella 15. Risultati dell'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA;

Excoffier *et al.*, 1992) in *L. italicus*, effettuata sul dataset mitocondriale, tenendo conto della distanza genetica di Tamura & Nei (1993) con gamma pari a 0,142. I gruppi popolazioni sono stati definiti come suggerito dall'analisi filogenetica secondo gli 8 cladi terminali.

Componenti della variazione	Gradi di libertà	Percentuale di variazione	Statistiche F
Tra gruppi	7	97,26	$F_{CT} = 0,97$
Tra popolazioni all'interno dei gruppi	15	1,73	$F_{SC} = 0,63$
All'interno delle popolazioni	172	1,01	$F_{ST} = 0,99$

Tabella 16. Localizzazione geografica e numero dei campioni di *R. dalmatina* analizzati attraverso il marcatore mitocondriale 16S e distribuzione degli aplotipi individuati. (Le popolazioni sono numerate come in Tabella 3)

Località di campionamento			<i>N</i>	Aplotipi
1	Slovenia	Komen	1	HI3(1)
2		Gorjansko	1	HI1(1)
3		Kocevje	1	HI4(1)
5	Croazia	Livide-Trombal	2	HI(2)
6		Svetvincenant	1	HI1(1)
7		Dreznica	2	HI1(1), HI4(1)
8	Italia	Punta Alberete	1	HI1(1)
10		Pineta di Classe	1	HI1(1)
11		Greve in Chianti	1	HI1(1)
12		Torrente Farma	1	HI1(1)
16		Canale Monterano	2	HI2(2)
18		Decima Malafede	2	HI2(2)
19		Fogolino	2	III1(1), III2(1)
26		Santa Domenica in Talao	1	III3(1)
29		Lago Trifoglietti	1	III3(1)
31		Cerisano	1	III3(1)
32		Bel Monte Calabro	1	III3(1)
34		San Pietro in Guarano	2	III3(2)
35		Campo San Lorenzo	1	III3(1)
37		Lago di Angitola	1	III3(1)
39		Serra San Bruno	1	III3(1)
41		Gambarie	2	III3(2)
S	Spagna	Altube*	1	HI1(1)
G	Germania	Drover Heide**	1	HI1(1)
M	Moldavia	Codri***	2	HI1(2)

*Numero di accesso in GenBank: AY014381 (Kosuch *et al.*, 2003).

**Numero di accesso in GenBank: AY147941 (Veith *et al.*, 2003).

***Numero di accesso in GenBank: GQ259205 e GQ259206 (Petraccioli *et al.*, 2010)

Tabella 17. Stime dei parametri di diversità genetica e valori dei test statistici di demografia storica per i principali cladi identificati dall'analisi non gerarchica dei cluster effettuata con il software BAPS sul dataset mitocondriale della *R. dalmatina*, ottenuto cumulando i frammenti della CoI e della CytB. F_s : statistica di Fu (Fu, 1997); SSD: somma del quadrato della deviazione tra i valori della distribuzione delle differenze tra coppie di aplotipi osservata e quella attesa secondo il modello di rapida espansione demografica (SSD_{DE}) e il modello di espansione spaziale (SSD_{SE}).

Aplogruppo	<i>N</i>	<i>Diversità aplotipica</i>	<i>Diversità nucleotidica</i>	F_s	SSD _{DE}	SSD _{SE}
N	66	0,380 (0,077)	0,00032 (0,00032)	-16,488***	0,00052	0,00052
C	10	0,644 (0,101)	0,00094 (0,00072)	1,021	0,0906	0,06963
A	42	0,854 (0,026)	0,00150 (0,00095)	-2,103	0,0219	0,01987*
B	126	0,879 (0,016)	0,00246 (0,00140)	-6,385*	0,0309	0,02515
BI	36	0,257 (0,093)	0,00019 (0,00024)	-2,517**	0,0043	0,00101
BII	28	0,378 (0,110)	0,00033 (0,00033)	-1,442	0,00007	0,00006
BIII	62	0,868 (0,026)	0,00165 (0,00101)	-5,119**	0,0004	0,00061

In parentesi sono indicati gli errori standard.

*=P < 0.05; **P<0.01;***P<0.001