



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA E GESTIONE
SOSTENIBILE DELLE RISORSE AMBIENTALI- XXXI CICLO

**ORIGINE, EVOLUZIONE E CONSERVAZIONE DEGLI
HOTSPOT DI DIVERSITA' GENETICA INTRASPECIFICA**

(S.S.D BIO/07)

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Alice Pezzarossa

Tutor

Prof. Daniele Canestrelli

Coordinatore del Corso

Prof.ssa Roberta Cimmaruta

Co-tutor

Dott. Luigi Maiorano

Anno Accademico 2017/2018

INDICE

PREMESSA	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1 Definizione di un hotspot	6
1.2 Nascita di un hotspot di diversità genetica intraspecifica	7
1.3 Obiettivi generali	9
2. ZAMPIGLIA M., BISCONTI R., MAIORANO L., ALOISE G., SICLARI A., PELLEGRINO F., MARTINO G., PEZZAROSSA A., CHIOCCHIO A., MARTINO C., NASCETTI G. & CANESTRELLI D., 2018. DISSEZIONE DI UN HOTSPOT DI DIVERSITA' GENETICA INTRASPECIFICA (SOTTOMESSO)	11
2.1 Introduzione	13
2.2 Materiali e Metodi	15
2.2.1 Dati di presenza della specie	15
2.2.2 Diversità genetica e struttura di popolazione	16
2.2.3 Saggio dell'agente patogeno	17
2.2.4 Modello di distribuzione della specie	17
2.3 Risultati	20
2.3.1 Presenza della specie nello spazio e nel tempo	20
2.3.2 Diversità genetica e struttura di popolazione	20
2.3.3 Presenza di <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	21
2.3.4 Modello di distribuzione della specie	21
2.4 Discussione	22
2.4.1 Pattern di variazione spaziale e temporale	22
2.4.2 Struttura geografica e target di conservazione	24
2.5 Tabelle e figure	26
Materiale supplementare	31

3. DIVERSITA' INTRASPECIFICA E MODELLI DI DISTIBUZIONE: UN APPROCCIO INTEGRATO PER LA RICOSTRUZIONE DI RIFUGI GLACIALI MULTI-TAXON	34
3.1 Introduzione	36
3.2 Materiali e metodi	39
3.2.1 Specie oggetto dello studio	39
3.2.2 Modelli di distribuzione della specie	39
3.2.3 Paleodistribuzioni e rifugi glaciali	42
3.3 Risultati	44
3.3.1 Dati di distribuzione delle specie e variabili climatiche	44
3.3.2 Calibrazione e validazione dei modelli	44
3.3.3 Paleodistribuzioni e rifugi glaciali	44
3.4 Discussione	46
3.5 Tabelle e figure	50
Materiale supplementare	53
4. IDENTIFICAZIONE E CONFRONTO DI HOTSPOT DI DIVERSITA' GENETICA MITOCONDRIALE E NUCLEARE MULTI-TAXON	83
4.1 Tabelle e figure	87
5. DISCUSSIONE GENERALE	147
BIBLIOGRAFIA	151

*It is not the strongest of the species that survives,
not the most intelligent that survives.
It is the one that is the most adaptable to change.*

Charles Darwin

PREMESSA

Questa tesi si basa sullo studio degli hotspot di diversità genetica intraspecifica di specie di vertebrati terrestri endemici dell'Italia peninsulare. Nel capitolo 1 vengono esposte le tematiche che hanno ispirato lo studio e gli obiettivi generali della tesi. Nel capitolo 2 viene illustrata l'eterogenetia spaziale e temporale di dati genetici, epidemiologici e climatici di un hotspot di diversità genetica della specie endemica *Bombina pachypus*, e vengono suggerite strategie per la pianificazioni di efficaci strategie di conservazione. Nel capitolo 3 vengono ricostruiti rifugi glaciali multi-taxon grazie all'integrazione di dati di diversità genetica intraspecifica in modelli di distribuzione delle specie. Nel capitolo 4 vengono presentati in forma assolutamente preliminare i risultati riguardanti il calcolo degli hotspot di diversità genetica intraspecifica per diversi taxa e il loro attuale stato di conservazione da parte dell'attuale rete di aree protette. Infine, nel capitolo 5 viene presentata una discussione generale dei risultati ottenuti ed una analisi della loro rilevanza ai fini degli obiettivi generali dello studio.

1. INTRODUZIONE

1.1 DEFINIZIONE DI HOTSPOT

L'epoca in cui stiamo vivendo è stata descritta come il 6° evento di estinzione di massa (Leakey & Lewin, 1996), per via del rapidissimo declino che la biodiversità sta subendo. Le principali cause di questo declino sono da ricercare nelle azioni antropiche, come la perdita e la frammentazione degli habitat, il sovra-sfruttamento delle risorse, l'inquinamento, l'introduzione di specie aliene e i cambiamenti climatici. Come dimostrato da molte ricerche la salvaguardia della biodiversità non è essenziale solo ai fini della sopravvivenza delle singole specie ma anche per poter fornire i servizi ecosistemici di cui la specie umana si avvantaggia e che aiutano ad assicurare un ambiente salutare e resiliente in cui vivere (Pereira et al., 2013). Tuttavia, nonostante gli sforzi fatti fino ad oggi anche a livello internazionale per proteggere e mantenere la biodiversità, i tassi di perdita non sembrerebbero diminuire (Ceballos et al., 2015). Uno dei principali obiettivi della biologia della conservazione è, quindi, quello di proporre strategie valide ed efficaci che possano arrestare questo declino e garantire la protezione della biodiversità. Una delle strategie storiche in tal senso è quella di identificare le aree particolarmente ricche di biodiversità per renderle target prioritari per la protezione della biodiversità stessa. Tali aree infatti non sono distribuite in maniera uniforme nel pianeta, ma sono concentrate in specifiche regioni. Per la prima volta nel 1988 Myers ha definito queste regioni come "hotspot", riferendosi ad aree ricche di specie endemiche e allo stesso tempo in grave pericolo a causa della perdita di habitat. Ad oggi sono stati identificati 35 hotspot, che occupano solo il 17,3% della superficie terrestre, tutti caratterizzati dalla combinazione di alti tassi di specie endemiche e alti tassi di perdita di habitat (Marchese, 2015).

Dal momento in cui è stato proposto, il concetto di hotspot è stato ampiamente usato nell'ambito della biologia della conservazione per identificare quelle aree chiave che andrebbero protette in maniera prioritaria rispetto ad altre. Inoltre, potendo come concetto essere applicato a qualsiasi scala geografica e a qualsiasi tipologia di ambiente, il termine hotspot è stato utilizzato sempre più frequentemente e anche con accezioni diverse. Pur essendo infatti proposto in riferimento ad un'area ricca di specie endemiche, il suo significato è stato esteso anche a zone eccezionalmente ricche di componenti della biodiversità diversi dalla specie, come la diversità di ecosistemi, la diversità filogenetica e la diversità genetica intraspecifica.

Le metriche basate sul livello di specie risultano da sempre le più frequenti per l'identificazione degli hotspot. Tuttavia è ormai chiaro come anche i processi evolutivi che generano e contribuiscono al mantenimento della biodiversità siano fondamentali da proteggere (Moritz, 2002). I processi evolutivi sono stati tipicamente integrati nella pianificazione per la conservazione della biodiversità attraverso metriche diverse dalla diversità di specie; in particolare la metrica proposta e largamente utilizzata è la diversità filogenetica, che rappresenta l'unicità evolutiva ed è calcolata come la lunghezza del percorso filitico che connette i vari taxa tra loro in una comune filogenesi (Faith, D.P., 1992; Carvalho et al., 2011; Carvalho et al., 2017).

E' ormai noto però, come la sopravvivenza a breve e a lungo termine delle popolazioni davanti ai cambiamenti derivi dalla loro abilità di adattamento, che dipende in ultima analisi dalla quantità di diversità intraspecifica ereditabile presente nelle popolazioni stesse (Frankel, 1974; Moritz, 2002; Hoffmann & Sgrò, 2011). La diversità genetica intraspecifica fornisce dunque la materia grezza su cui agisce la selezione naturale, e può essere considerata come la componente basale della biodiversità. Quando diverse popolazioni, tutte con un alto livello di variabilità genetica, sono concentrate nella stessa area è possibile definire un hotspot di diversità genetica intraspecifica, il quale dovrebbe rappresentare una priorità dal punto di vista della conservazione (Hewitt, 2000; Petit et al., 2003; Hewitt, 2004b; Hampe & Petit, 2005). Nonostante i dati molecolari necessari al calcolo della diversità genetica intraspecifica siano ormai disponibili per un alto numero di taxon (Perez-Espona et al., 2017), i progressi nell'identificazione di hotspot di diversità genetica sono ancora scarsi. Una delle maggiori difficoltà riguarda la capacità di rendere spazialmente espliciti dati molecolari e processi evolutivi (Vandergast et al., 2008; Carvalho et al., 2017), il che non solo ha portato a scarsi esempi di calcolo di tali hotspot, ma anche alla loro identificazione su scale geografiche troppo ampie per poter caratterizzare nel dettaglio queste aree.

1.2 NASCITA DI UN HOTSPOT DI DIVERSITA' GENETICA INTRASPECIFICA

Se l'interesse per gli hotspot di diversità intraspecifica nell'ambito della conservazione è ancora scarso, le ricerche svolte in ambito filogeografico per quanto riguarda i loro pattern di distribuzione geografica e i processi evolutivi che li hanno originati, sono numerose (Avice, 2000; Hewitt, 2004b e citazioni). Un pattern chiaro, che contraddistingue l'intero pianeta, riguarda la variazione latitudinale della diversità genetica che risulta massima ai tropici e diminuisce avvicinandosi ai poli (Miraldo et al., 2016). Questo cline latitudinale, che caratterizza

peraltro anche la ricchezza di specie e quella filogenetica, è stato spiegato tramite diverse ipotesi, tutte riconducibili alla maggiore disponibilità di energie presente ai tropici che contribuirebbe a sostenere popolazioni demograficamente stabili e tassi di mutazione più rapidi (Pereira et al., 2016).

Diversi studi hanno accertato come i principali fattori storici alla base dell'origine degli hotspot di diversità genetica siano da ricercare nelle oscillazioni climatiche del Quaternario e nei loro impatti sulle distribuzioni geografiche delle specie. In Europa, grazie a dati fossili, palinologici, genetici e più recentemente anche ai modelli di distribuzione delle specie, è stato possibile ricostruire come molte specie sopravvissero alle avverse condizioni climatiche delle fasi glaciali concentrandosi nelle penisole meridionali, per tale motivo descritte come i principali rifugi glaciali (ad es. Hewitt, 2000; ma vedi anche Stewart & Lister, 2001 e Deffontaine et al., 2005). La condizione di isolamento nelle aree di rifugio durante le fasi glaciali avrebbe permesso l'accumulo di divergenza genetica tra le popolazioni; durante le fasi interglaciali invece le popolazioni avrebbero ricolonizzato le aree limitrofe espandendosi anche verso latitudini superiori. Tale espansione avrebbe favorito la nascita del fenomeno conosciuto come "northern purity and southern richness" (Hewitt, 1996, 1999 & 2000), ossia alla maggior diversità genetica presente nelle popolazioni meridionali rispetto a quelle settentrionali causata dall'espansione verso nord solo di un sottocampione del pool genico originale.

Sempre grazie a studi filogeografici svolti su numerosi taxa, le penisole meridionali sono risultate essere i principali hotspot di diversità genetica (Hewitt, 2011a). Per spiegare la nascita di hotspot di diversità intraspecifica in queste regioni, sono stati forniti principalmente due scenari (Hewitt, 1996; Hewitt, 2000). Il primo scenario, quello tradizionale, suggerisce che le specie siano sopravvissute all'interno dei rifugi sottoforma di popolazioni grandi e stabili demograficamente, le quali non hanno subito sostanziose perdite di variabilità genetica nel tempo. Secondo questo primo scenario, dunque, il principale processo microevolutivo implicato nell'origine di un hotspot sarebbe stato la prolungata stabilità demografica che caratterizzava le popolazioni presenti nei rifugi (Petit et al., 2003; Carnaval et al., 2009). Il secondo scenario, più recente, prevede l'esistenza di multiple aree di rifugio, e propone che gli hotspot di diversità genetica intraspecifica si siano generati grazie ai ciclici fenomeni di frammentazione, differenziamento allopatrico e successivo contatto secondario avvenuti tra le popolazioni presenti nei vari rifugi in seguito alle contrazioni ed espansioni avvenute durante le oscillazioni climatiche (Gomez & Lunt, 2007). Secondo quest'ultimo scenario, dunque, gli hotspot di diversità intraspecifica sembrerebbero essersi generati grazie al flusso genico tra popolazioni divergenti rimaste precedentemente isolate e non coinciderebbero quindi con le aree di rifugio

glaciale, bensì con le aree di contatto secondario (Canestrelli et al., 2010). E' bene considerare come la stabilità climatica e i contatti tra linee divergenti non siano da considerarsi processi che si escludono mutualmente, ma potrebbero aver contribuito entrambi alla generazione di un hotspot.

Ambedue gli scenari sulla nascita di un hotspot sono stati costruiti grazie agli strumenti e agli schemi di campionamento della filogeografia, così come l'identificazione della loro posizione geografica (Hewitt, 2011b). Ciò ha comportato l'identificazione degli hotspot ad una scala geografica ampia, e poco adatta allo studio dei processi microevolutivi che li hanno generati. Infatti, molto spesso gli hotspot vengono identificati a partire dallo studio dei pattern di diversità genetica all'interno dell'intero areale di una specie e, conseguentemente, solo un numero limitato di campioni ricadrà nell'area di rifugio potenziale, spesso limitata rispetto alla distribuzione complessiva. L'identificazione delle aree di rifugio con gli schemi di campionamento della filogeografia e la conseguente identificazione di un hotspot, dunque, potrebbero aver portato a tralasciare l'influsso di processi microevolutivi diversi dalla stabilità demografica.

1.3 OBIETTIVI GENERALI

Nello studio dell'origine, dell'evoluzione e della conservazione degli hotspot, rimangono dunque inesplorati importanti aspetti. Il primo riguarda l'analisi dettagliata di un hotspot per analizzare se esso sia un'unità geneticamente omogenea da un punto di vista spaziale e temporale. Essendo infatti identificati sempre su scale geografiche ampie e raramente con un campionamento disegnato per questi obiettivi, mancano studi che riguardano l'analisi dettagliata delle popolazioni presenti all'interno di un'area di hotspot. Il secondo aspetto che risulta ancora poco chiaro, riguarda l'origine di un hotspot e i processi evolutivi che ne sono responsabili. Nonostante i numerosi studi svolti, la scala spaziale utilizzata nell'identificazione sia delle aree di hotspot che di quelle di rifugio non permette di analizzare con chiarezza quali processi evolutivi abbiano contribuito alla loro formazione. La mancanza di tale informazione riduce ulteriormente le capacità di conservare queste aree.

Obiettivo generale della tesi è stato quello di contribuire a colmare tali lacune, attraverso un'indagine sull'origine, la distribuzione spaziale e lo stato di conservazione degli hotspot di diversità genetica intraspecifica all'interno della penisola italiana. In particolare, si è proceduto attraverso tre step principali. Anzitutto, in seguito all'identificazione di un hotspot, nonché putativa area di rifugio di una specie gravemente minacciata (l'ululone appenninico *Bombina*

pachypus), si è voluto indagare sulla stabilità e l'omogeneità di queste aree, procedendo ad un'analisi dettagliata della variazione spaziale e temporale della diversità genetica e della struttura demografica. Successivamente, sono stati ricostruiti i rifugi glaciali a partire da strumenti e schemi di campionamento appartenenti ai modelli di distribuzione delle specie ma mediante un'integrazione dei dati sulla variazione genetica intraspecifica, strategia che ha permesso di ottenere un dettaglio geografico maggiore rispetto a quello possibile tramite studi filogeografici. Ciò ha inoltre permesso di formulare ipotesi sul ruolo evolutivo che questi rifugi hanno avuto nell'origine di un hotspot. Infine, è stato proposto un framework per il calcolo degli hotspot di diversità genetica intraspecifica mitocondriale e nucleare al fine di confrontare la loro distribuzione geografica analizzare il loro stato di protezione da parte dell'attuale rete di aree protette in Italia peninsulare.

2. DISSEZIONE DI UN HOTSPOT DI DIVERSITA' GENETICA INTRASPECIFICA

Mauro Zampiglia, Roberta Bisconti, Luigi Maiorano, Gaetano Aloise, Antonino Siclari, Francesco Pellegrino, Giuseppe Martino, **Alice Pezzarossa**, Andrea Chiocchio, Chiara Martino, Giuseppe Nascetti & Daniele Canestrelli

ABSTRACT

Il costante incremento dei tassi di perdita di biodiversità registrato negli ultimi decenni sottolinea l'urgenza di preservare le abilità delle specie nel rispondere ai cambiamenti ambientali globali. Un approccio potenzialmente efficace a questo fine è quello di dare priorità alla conservazione di aree hotspot di diversità genetica intraspecifica. Queste aree sono spesso state identificate attraverso campionamenti di ampie aree geografiche, utilizzando strumenti analitici e schemi di campionamento tipici degli studi filogeografici. Di conseguenza la risoluzione spaziale spesso risulta troppo grossolana per essere utile ad una pianificazione per la conservazione di specie minacciate, ostacolando in questo modo l'indispensabile dialogo che deve esserci tra gli organi che si occupano della gestione e della conservazione della biodiversità ed i ricercatori che studiano la genetica della conservazione. Nel seguente studio, abbiamo investigato la variazione nello spazio e nel tempo dei pattern di presenza, di diversità genetica, e dei potenziali fattori di rischio in una specie minacciata, l'ululone appenninico *Bombina pachypus*, all'interno di un'area precedentemente identificata come hotspot di diversità genetica per questa specie. I nostri risultati mostrano chiaramente che tale hotspot non è né geograficamente omogeneo, né stabile nel tempo. In una finestra temporale di 10-40 anni le popolazioni di *B. pachypus* sono andate declinando in una buona porzione dell'area hotspot, e i livelli di diversità genetica sono diminuiti. Considerando l'andamento demografico, i dati genetici ed epidemiologici ed i modelli di idoneità climatica presenti e futuri, le popolazioni più meridionali dell'area hotspot sono risultate ancora oggi idonee per azioni urgenti di conservazione *in-situ*, mentre le popolazioni settentrionali sarebbero da gestire attraverso azioni di conservazioni miste, sia *in-situ* sia *ex-situ*, incluse la riproduzione assistita e le traslocazioni. I nostri risultati evidenziano che, nonostante l'identificazione di aree hotspot di diversità genetica sia un passaggio assolutamente necessario, esso non risulta sufficiente a garantire la conservazione di specie minacciate. Le aree hotspot dovrebbero essere studiate ad una scala geografica e temporale più fine, per fornire agli organi

deputati alla gestione e alla protezione della biodiversità le conoscenze essenziali per poter meglio definire le priorità, nonché per poter ottimizzare l'allocazione delle risorse finanziarie dedicate alla conservazione.

Parole chiave:Potenziale evolutivo, declino degli anfibi, hotspot di diversità genetica, strategie gestionali, *Bombina pachypus*, Italia meridionale, *Batrachochytrium dendrobatidis*, modelli di distribuzione delle specie.

2.1 INTRODUZIONE

I tassi di perdita della biodiversità aumentano senza precedenti, e questo sottolinea l'urgenza di preservare le capacità delle specie di rispondere agli attuali cambiamenti ambientali globali (Crandall et al., 2000; Moritz, 2002; Hendry et al., 2010; Eizaguirre & Baltazar-Soares, 2014 e citazioni). Tuttavia, le politiche di conservazione sono generalmente orientate verso la protezione della diversità di specie e di habitat e raramente considerano il potenziale evolutivo delle singole popolazioni di una specie (Mace & Purvis, 2008; Laikre, 2010; Mimura et al., 2017). Un approccio alternativo, ampiamente dibattuto, è quello di mirare direttamente alla conservazione di popolazioni con alti livelli di diversità genetica (Frankham, 2010). Infatti, considerato il profondo legame tra la diversità genetica e la dimensione effettiva di una popolazione, queste popolazioni sono contemporaneamente sia meno affette dalle conseguenze dannose della deriva genetica e della depressione da inincrocio, sia in grado di garantire il potenziale evolutivo e adattativo della specie nel tempo (Frankham, 2010; Allendorf et al., 2012; Lanfear, et al., 2014). Quando più popolazioni che mostrano alti livelli di diversità genetica sono concentrate nella stessa area geografica è possibile definire un hotspot di diversità genetica intraspecifica, il quale rappresenta di conseguenza una priorità per la conservazione delle specie (Hewitt, 2000, 2004a; Petit et al., 2003; Hampe & Petit, 2005;). Inoltre, come indicato da Perez-Espona e colleghi (2017), dati di diversità genetica utili all'identificazione di hotspot sono ormai disponibili per un alto numero di taxon, se non altro per alcune aree del pianeta più intensamente studiate. Tuttavia, nonostante il loro estremo valore e la disponibilità di dati, gli hotspot di diversità genetica sono stati ampiamente ignorati in contesti che riguardavano le strategie gestionali per la conservazione della biodiversità, evidenziando l'esistenza di un profondo divario tra le conoscenze provenienti dalle ricerche dei genetisti della conservazione e le priorità degli enti che si occupano di conservazione (Pérez-Espona e ConGRESS Consortium, 2017; Vernesi et al., 2008).

Tradizionalmente, gli hotspot vengono identificati su grandi aree (e.g. considerando l'intero areale di distribuzione di una specie) attraverso l'uso di strumenti analitici e schemi di campionamento tipici della filogeografia (Hewitt, 2011b), e dunque con una risoluzione spaziale che difficilmente può essere considerata in azioni pratiche di conservazione (Cañadas & Vázquez, 2014). Tutto ciò ha come conseguenza che alcuni tra i più importanti quesiti nelle pratiche di gestione della conservazione rimangano ampiamente inesplorati: può un hotspot essere considerato come un'unità regionale omogenea ai fini gestionali? All'interno di un'area di

hotspot, sono tutte le popolazioni equivalenti? Oppure dovrebbero anch'esse subire un processo di gerarchizzazione, ai fini di una allocazione ottimale delle risorse? Rispondere a queste domande ancora aperte ha importanti implicazioni pratiche sia per la ripartizione delle risorse finanziarie tra le varie pratiche di gestione per la conservazione della biodiversità, sia per la progettazione di aree protette.

In questo studio dimostriamo l'importanza di rispondere a queste domande, proponendo un framework collaborativo tra ricercatori e autorità che si occupano di gestire la biodiversità (quali gli organi governativi e quelli di amministrazione delle aree protette). In questo studio abbiamo analizzato i pattern spaziali e temporali di variazione della presenza, della diversità genetica, e dei potenziali fattori di rischio all'interno dell'area hotspot dell'ululone appenninico, *Bombina pachypus*, una specie minacciata d'estinzione. La presenza di studi pregressi rende questa specie particolarmente idonea per rispondere ai quesiti di ricerca del presente lavoro. L'ululone appenninico è un anfibio endemico della penisola italiana il cui hotspot di diversità genetica è stato identificato nella porzione più meridionale del suo areale di distribuzione (Canestrelli et al., 2006a). Negli ultimi decenni un ampio declino delle popolazioni ha sollevato un interesse per lo stato di conservazione di questa specie (Barbieri et al., 2004) che è attualmente catalogata nella Lista Rossa della IUCN come minacciata (Andreone et al., 2009). Studi precedenti hanno già suggerito il valore potenziale di conservazione dell'area di hotspot per questa specie mostrando che: i) le popolazioni di *B. pachypus* stanno fronteggiando un drammatico declino demografico in tutto l'areale di distribuzione ad eccezione di questa zona (Barbieri et al., 2004); ii) i livelli di diversità genetica in quest'area sono di gran lunga più alti che nel resto dell'areale (Canestrelli et al., 2006a); e iii) le popolazioni di quest'area continuano a sopravvivere nonostante la presenza del fungo "killer" *Batrachochytrium dendrobatidis* (Canestrelli et al., 2013), considerato una delle principali cause di declino per la specie (Stagni et al., 2004).

Per raggiungere i nostri obiettivi abbiamo integrato le conoscenze pregresse con risultati ottenuti da tre step sperimentali. Per prima cosa, abbiamo studiato l'intera regione per valutare se i pattern di presenza delle popolazioni fossero rimasti stabili nel tempo, sia nell'intera regione che in parti di essa. In secondo luogo, abbiamo analizzato la struttura genetica delle popolazioni, quantificato i loro livelli di diversità genetica e li abbiamo paragonati con i valori campionati nel passato nelle stesse aree. Infine, abbiamo eseguito un'analisi degli attuali fattori potenziali di rischio concentrandoci sulla presenza del chitridio patogeno *B. dendrobatidis* e allo stesso tempo valutando la futura variazione dell'idoneità climatica dell'area di hotspot.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 DATI DI PRESENZA DELLA SPECIE

Barbieri e colleghi (2004) hanno indicato l'Italia meridionale (nello specifico la Regione Calabria) come l'unica porzione dell'areale dell'ululone a non aver subito un declino demografico alla fine degli anni '90. Per confermare questi risultati e/o per caratterizzare i pattern di variazione spaziali e temporali, abbiamo analizzato la regione in maniera esaustiva, campionando tutte le popolazioni individuate al suo interno. Le attività di campo sono state condotte da Aprile a Ottobre, periodo che corrisponde alla stagione riproduttiva della specie, dal 2013 al 2016. Sia le attività di campo che le procedure di campionamento sono state approvate dal Ministero dell'Ambiente e del Territorio Italiano (numero di protocollo: 0042634/PNM, e 0007727/PNM).

Abbiamo esaminato sia la letteratura pubblicata su riviste scientifiche accreditate, i report tecnici, nonché le collezioni museali per raccogliere record di presenza dell'ululone in Calabria. Tra i record trovati, ne abbiamo utilizzati solo 56, ossia gli unici ad avere informazioni dettagliate sulla località e l'anno dell'osservazione. Abbiamo poi diviso la regione in quattro aree dove si concentravano la gran parte dei record: Catena Costiera, Sila, Serre e Aspromonte (Figura 1). I confini delle quattro aree sono stati definiti arbitrariamente, sebbene corrispondano grossomodo alle catene montuose presenti nella regione.

Ogni sito di presenza storico è stato visitato tre volte durante l'intera campagna di campionamento. Abbiamo considerato la specie come attualmente presente in ogni sito quando almeno una prova della sua presenza (adulti, girini od ovature) sia stata osservata almeno una volta. Le ricerche di campo sono state estese ad ulteriori 80 siti di campionamento scelti in modo opportunistico in quanto idonei alla presenza della specie e comunque vicini a siti di presenza noti.

I campioni per le successive analisi di laboratorio sono stati presi dagli adulti campionati durante l'ultima delle tre visite condotte ad ogni sito. Per limitare lo stress associato alle procedure di manipolazione degli individui, ognuno è stato sottoposto ad una singola procedura di campionamento (asportazione di un dito, o tampone cutaneo; vedi in seguito).

2.2.2 DIVERSITA' GENETICA E STRUTTURA DI POPOLAZIONE

La struttura genetica e la diversità delle popolazioni sono state determinate genotipizzando 130 individui campionati in 22 siti, distribuiti nell'intera regione (Tabella 1 e Figura 1). Agli individui provenienti da 15 di questi siti ("nuovi" campioni in Tabella 1) è stato prelevato un dito della zampa dopo essere stati anestetizzati con una soluzione di 0.1% MS222 (estere etilico dell'acido 3 ammino benzoico). Tutti gli individui sono stati immediatamente rilasciati nel sito di campionamento, mentre i campioni di tessuto sono stati conservati in alcool al 95%. I tessuti provenienti dai 7 siti rimasti ("vecchi" campioni in Tabella 1) erano stati raccolti durante studi precedenti svolti tra il 1978 e il 2006 (vedi Canestrelli et al., 2006a, 2013 e citazioni), e conservati in alcool al 95%.

Il DNA genomico è stato estratto usando il ZR Genomic DNA™ -Tissue Mini Prep kit (Zymo research) seguendo le istruzioni di fabbricazione. Inizialmente abbiamo testato 11 loci microsatellite che in precedenza erano stati amplificati nella sister-species. *B. variegata*: Bv11.7, Bv32.7, B13, B14, F22, 1A, 5F, 8A, 9H, 10F, 12F (Nürnberg et al., 2003; Stuckas & Tiedemann, 2006; Hauswaldt et al., 2007). Abbiamo escluso dall'analisi i loci Bv32.7 (la cui amplificazione nei nostri campioni è fallita), B13 (il quale ha prodotto reazioni inconsistenti), B14 (il quale ha prodotto dati mancanti nel 26% degli individui), e 12F (il quale è risultato monomorfo nelle prove basate su 30 individui selezionati casualmente). Le condizioni di PCR per i 7 loci analizzati in questo studio, insieme ai coloranti fluorescenti usati per etichettare i primer forward e l'assemblaggio di una multiplex sono riportati nei Materiali Supplementari. L'analisi dei frammenti dei prodotti della PCR è stata eseguita da MacroGen Inc. su un ABI 3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) con un 400HD di taglia standard.

Abbiamo eseguito la denominazione degli alleli con GENEMAPPER® 4.1 controllando l'elettroferogramma a vista. Abbiamo poi analizzato il dataset dei microsatelliti con MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) per valutare la presenza di alleli nulli, per escludere alleli di grandi dimensioni, o per valutare errori di assegnazione. Abbiamo utilizzato GENEPOP 4.5.1 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008) per valutare l'allontanamento dall'equilibrio di Hardy-Weinberg e per il linkage disequilibrium genotipico. Infine, abbiamo stimato la diversità genetica delle popolazioni come eterozigosi attesa (H_e) e ricchezza allelica (A_r) usando GENETIX 4.05.2 (Belkhir et al., 1996) e FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001), rispettivamente. Abbiamo condotto tutte le analisi escludendo i siti dove abbiamo campionato meno di quattro individui.

La struttura genetica di popolazione è stata dedotta per mezzo dell'algoritmo di clustering Bayesiano così come implementato in TESS 2.3.1 (Chen et al., 2007), con il modello di

admixture, secondo il modello autoregressivo condizionale (CAR), e le coordinate geografiche degli individui come informazioni a priori. TESS è stato scelto come metodo di clusterizzazione dal momento che ha performance migliori rispetto a metodi simili quando i numeri di loci sono limitati e/o quando la struttura genetica è debole (Chen et al., 2007; François & Durand, 2010). Abbiamo eseguito una serie di analisi preliminari con 20000 corse, escludendo le prime 5000 come burn-in, e con 10 repliche per ogni valore di K tra 2 e 10 per testare la performance del modello. Per le analisi finali abbiamo fatto correre 100 repliche per ogni valore di K tra 2 e 6, con 100000 mila corse ed eliminando le prime 50000 come burn-in. Il parametro di interazione spaziale è stato settato sul valore di default (0.6) e l'opzione di aggiornamento del parametro è stata attivata. Il modello di clusterizzazione che meglio descrive i dati è stato scelto tramite il criterio di informazione sulla devianza (Deviance Information Criterion, DIC), mediando i valori di DIC tra le 100 repliche di ogni K e selezionando il valore di K per il quale il valore di DIC ha raggiunto un plateau. In ultimo, sono state selezionate le 10 repliche con i valori più bassi di DIC per il K selezionato e sono state mediate tra loro le stime di proporzione di admixture usando CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007).

2.2.3 SAGGIO DELL'AGENTE PATOGENO

I tamponi cutanei provengono da 105 individui campionati in 15 siti (Figura 1). Il DNA genomico è stato estratto dai tamponi seguendo il protocollo di Boyle e colleghi (2004) come modificato da Zampiglia e colleghi (2013). Il saggio di diagnostica molecolare è stato eseguito in 25 µl di volume di reazione utilizzando un protocollo di nested PCR come sviluppato da Goka e colleghi (2009). Il saggio è stato eseguito una volta per ciascun campione e includeva un controllo positivo (DNA estratto da zoospore di *B. dendrobatidis* JEL423, gentilmente fornite dal Prof. Joyce Longcore) e un controllo negativo (DNA libero distillato in acqua). Un subset rappresentativo di individui (20%) è stato analizzato in duplicato.

2.2.4 MODELLO DI DISTRIBUZIONE DELLA SPECIE

Abbiamo calibrato i modelli di distribuzione della specie (Species Distribution Model, SDM) con un dataset di 361 presenze provenienti dall'intero areale di distribuzione della specie e un set di variabili bioclimatiche. Le presenze sono state ottenute cumulando i dati raccolti durante la campagna di campionamento (di questo studio) e le seguenti fonti: Stoch (2000-2005), Global Biodiversity Information Facility (www.GBIF.org), Observado (www.observation.org) e

Canestrelli e colleghi (2006a). Abbiamo filtrato il dataset originale per rimuovere i duplicati e i dati con localizzazione geografica incerta. Per limitare l'autocorrelazione spaziale, abbiamo filtrato le presenze grezze usando la libreria `SPThin` (Aiello-Lammens et al., 2015) nell'ambiente R®, ottenendo cinque subset di calibrazione alternativi con 182 presenze ciascuno (vedi Materiali Supplementari per i dettagli). Utilizzando le stesse fonti consultate per le presenze, abbiamo raccolto tutti i dati disponibili sulla presenza di rettili e anfibi per la stessa area di studio. Per limitare gli effetti dell'errore sistematico di campionamento (Ranc et al., 2017), abbiamo raccolto un totale di 7614 presenze che abbiamo poi utilizzato come punti di background per la calibrazione del modello.

Le variabili bioclimatiche per il clima attuale sono state ottenute da Hijmans e colleghi (2005). Utilizzando l'analisi del fattore di inflazione della varianza (Variance Inflation Factor, VIF) sulle 18 variabili bioclimatiche originali, abbiamo considerato nell'analisi solo le seguenti 7 variabili con un valore di $VIF < 5$: la temperatura media annua, il range medio diurno di temperatura, la stagionalità della temperatura, la temperatura media del quarto più umido, la temperatura media del quarto più secco, la precipitazione del mese più umido e la stagionalità della precipitazione. Per il clima futuro, abbiamo tenuto conto delle stesse 7 variabili calcolate per tre diversi modelli di circolazione generale (CCSM4, MIROC-ESM, MPI-ESM-P) e due diversi scenari di emissione (RCP2.6 and RCP8.5) adottati dall'IPCC5 (Intergovernmental Panel on Climate Change).

Applicando l'approccio dell'ensemble forecasting (Araujo & New, 2007), abbiamo calibrato lo SDM considerando il clima attuale, i cinque set di presenze filtrate, il set di punti di background e i seguenti cinque algoritmi presenti nella libreria `BIOMOD2` (Thuiller et al., 2009) nell'ambiente R®: generalized linear model (GLM), generalized additive model (GAM), generalized boosted model (GBM), multivariate adaptive regression spline (MARS), e maximum entropy (MAXENT).

Per la validazione del modello, abbiamo considerato nuovamente cinque set di presenze alternative, ognuno dei quali includeva i 179 punti di presenza esclusi durante le operazioni di filtraggio dei set di calibrazione e 7488 punti di background distribuiti in modalità casuale (mantenendo la stessa prevalenza dei dataset di calibrazione). Per ogni modello, abbiamo misurato l'area sotto la curva (Area Under the Curve, AUC) ROC (Receiver Operating Characteristic). I modelli con un valore di AUC maggiore e uguale a 0.7 (Swets, 1988) sono stati proiettati nel clima presente e futuro dell'intera Italia peninsulare. Poi, per ogni proiezione abbiamo ottenuto un modello di distribuzione finale, calcolato come la media pesata di tutti i

modelli disponibili (i pesi per ogni modello sono stati basati sul rispettivo valore di AUC di ognuno, come suggerito in Marmion et al., 2009).

2.3. RISULTATI

2.3.1 PRESENZA DELLA SPECIE NELLO SPAZIO E NEL TEMPO

Abbiamo riscontrato la presenza di *B. pachypus* n 28 delle 136 località originali (21%), inclusi gli 11 siti di presenza storica (a fronte dei 56 originali) e 17 nuovi siti. Il numero massimo di siti storici per cui la presenza è stata confermata si trova in Aspromonte (8 su 19, 42%), seguito dalle Serre (2 di 6, 33%) e dalla Catena Costiera (1 di 8, 13%). Nessun sito in Sila è stato confermato (0 presenze su 23). I 17 nuovi siti di presenza non sono distribuiti in maniera uniforme all'interno delle regioni, dato che 15 siti su 17 sono stati trovati in Aspromonte, 2 siti sono stati trovati in Catena Costiera, e nessun sito è stato trovato nelle regioni della Sila e delle Serre. La regione dell'Aspromonte è risultata inoltre essere quella con il numero più alto di individui osservati per sito/giorno, con in media 21.6 individui (d.s. 18.3) da confrontare con la media di 3.5 individui (d.s. 1.9) osservati nelle altre regioni.

2.3.2 DIVERSITA' GENETICA E STRUTTURA DI POPOLAZIONE

Il numero di alleli osservati per ogni locus microsatellite è il seguente: 1A = 11, 8A = 13, 5F = 12, 10F = 12, 9H = 25, Bv11 = 3 and F22 = 9. Tutti i loci sono stati usati per le successive analisi, dal momento che nessuno di essi ha mostrato alleli nulli in più di un sito di campionamento. I dati mancanti rappresentano il 3.7% dell'intero dataset. Nessuna prova di linkage disequilibrium è stata osservata tra i loci, e nessuna deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è stata osservata dopo aver applicato la correzione di Bonferroni (Rice, 1989).

L'eterozigosi attesa oscillava tra lo 0.45 (sito 18) e lo 0.78 (sito 8), mentre la ricchezza allelica oscillava tra il 2.58 (sito 18) e il 4.16 (sito 11, Figura 1C). Tutte le stime di eterozigosi attesa e ricchezza allelica per ognuno dei siti campionati sono mostrate in Tabella 1. Tra i "vecchi" campioni, i valori più alti sia di eterozigosi attesa che di ricchezza allelica sono stati osservati nella regione delle Serre, mentre tra i "nuovi" campioni, quelli con i valori più alti di diversità genetica sono stati osservati nella regione dell'Aspromonte. Sebbene la posizione e le dimensioni dei nostri campioni ci impedissero di effettuare confronti temporali quantitativi, vale la pena notare che i "vecchi" campioni avevano sistematicamente valori di diversità genetica più alta se confrontati con i vicini "nuovi" campioni nella stessa area (Tabella 1).

L'analisi di clusterizzazione Bayesiana della struttura di popolazione ha rivelato la presenza di tre cluster principali all'interno dell'area di studio. I diagrammi a torta che mostrano il contributo dei tre cluster al pool genetico di ogni sito e i diagrammi a barre che mostrano le proporzioni di admixture di ciascun individuo sono mostrati nella Figura 1B. I tre cluster hanno mostrato una chiara struttura geografica lungo l'asse nord-sud: un cluster è limitato nell'area settentrionale in Catena Costiera e nella Sila settentrionale, un cluster ha una distribuzione centrale tra la Sila meridionale e le Serre, e il terzo cluster è stato osservato nel sud in Aspromonte. Dati di admixture tra i cluster sono stati osservati in alcuni individui, in particolare nei siti posizionati nelle aree intermedie (siti 5 e 12).

2.3.3 PRESENZA DI *Batrachochytrium dendrobatidis*

I test diagnostici per la presenza di *B. dendrobatidis* hanno prodotto risultati positivi per la presenza del patogeno sulla pelle di 3 individui proveniente da 2 siti in Catena Costiera. Invece, contrariamente alle valutazioni precedenti (Canestrelli et al., 2013), nessun test è risultato positivo per gli individui campionati nelle Serre e in Aspromonte (Figura 1D). Tutte le analisi sono state compiute due volte e i risultati sono sempre risultati consistenti

2.3.4 MODELLO DI DISTRIBUZIONE DELLA SPECIE

Abbiamo calibrato 25 modelli (5 set di punti di presenza-punti di background per 5 algoritmi) con in media una buona performance (AUC medio = 0.80; d.s. AUC = 0.04). Il GBM è risultato il modello con i valori di AUC più alti (AUC medio = 0.86) e il GLM quello con i valori più bassi (AUC medio = 0.76). La temperatura è risultata essere di gran lunga il fattore bioclimatico più importante per spiegare la distribuzione dell'ululone, con la temperatura media del quarto più secco, la temperatura media del quarto più umido e la temperatura media annua che sono risultate essere le variabili più importanti, seguite dalle due variabili della precipitazione (Tabella 2).

A prescindere dallo scenario considerato, l'idoneità climatica nel futuro diminuirà considerevolmente (Figura 2), specialmente negli Appennini settentrionali e centrali, dove l'idoneità bioclimatica diminuisce drasticamente in alcune aree. Una maggiore stabilità climatica è predetta per la regione meridionale dell'areale, dove in ogni caso il modello predice uno slittamento futuro dell'areale verso altitudini maggiori (Figura 2).

2.4 DISCUSSIONE

Identificare le aree hotspot di diversità genetica intraspecifica è ormai uno step fondamentale per la definizione delle pratiche di conservazione e per la loro efficacia a lungo termine (Thomassen et al., 2011; Brooks et al., 2015). Tuttavia i nostri risultati enfatizzano come questo fondamentale step non risulti comunque sufficiente e sottolineano invece come analisi ad una scala spaziale e temporale più dettagliata, caratteristica dei programmi di monitoraggio (Brodersen & Seehausen, 2014; Mimura et al., 2017), dovrebbero essere adottate. Tali analisi peraltro fornirebbero la conoscenza necessaria per definire meglio le priorità di conservazione e le pratiche di gestione delle aree protette agli enti che si occupano di gestire la conservazione.

L'hotspot di diversità genetica intraspecifica di *B. pachypus* non risulta un'unità geografica omogenea, né in termini di diversità genetica, né della distribuzione dei fattori di rischio. In aggiunta, i nostri risultati mostrano cambiamenti temporali strutturati geograficamente nei diversi aspetti indagati. Nelle sezioni seguenti discuteremo quindi pattern di variazione spazio-temporale, e come possano aiutare ad identificare le priorità in contesti di programmi di conservazione delle specie.

2.4.1 PATTERN DI VARIAZIONE SPAZIALE E TEMPORALE

Nell'arco di meno di 15 anni dall'ultima valutazione della presenza della specie (Barbieri et al., 2004), i pattern di presenza di *B. pachypus* in Italia meridionale sono drammaticamente cambiati, seppur con marcate differenze tra le varie sotto-regioni. Le differenze maggiori sono state riscontrate tra i massicci della Sila e quelli dell'Aspromonte. Nella regione della Sila nessun sito di presenza di *B. pachypus* è stato identificato. Sebbene il mancato ritrovamento della specie non sia una prova inconfutabile della sua assenza in quest'area, tuttavia ne denota un drammatico declino. Nella regione dell'Aspromonte, invece, sono stati confermati vari siti di presenza storici e ne sono stati individuati di nuovi. Il ritrovamento di nuovi siti, combinato con il numero più alto di individui osservati nei siti in quest'area, denota come questa regione sia meno influenzata dal declino demografico osservato nelle altre tre sottoregioni. Tuttavia, la perdita di diversità genetica riscontrata in tutte le popolazioni suggerisce come queste abbiano subito fenomeni di collo di bottiglia all'interno di tutta l'area di hotspot in Italia meridionale, e come quindi la specie stia subendo un forte declino anche nella sottoregione dell'Aspromonte (Figura 1C).

Queste scoperte fanno sorgere preoccupanti domande per la conservazione dell'ululone. Perché *B. pachypus* ha iniziato a subire un forte declino anche in Italia meridionale? E perché questo declino sembrerebbe avere una struttura geografica nel suo andamento? Sebbene i risultati ottenuti dal nostro studio non ci mostrino una chiara risposta, tuttavia possono aiutarci ad escludere alcune delle risposte comunemente suggerite. Un primo fattore spesso invocato come responsabile del declino in altre regioni è il degrado dell'habitat. Tuttavia, in Italia meridionale gli habitat occupati da *B. pachypus* sono ampiamente protetti, in quanto le regioni dell'Aspromonte e della Sila sono coperte di parchi nazionali, mentre la regione delle Serre rientra in un parco regionale. A conferma di quanto detto, nella maggior parte dei siti visitati non sono state trovate prove di alterazione dell'habitat fisico né della comunità ecologica. Pertanto, mentre non è possibile escludere che il degrado dell'habitat abbia un ruolo nel declino della specie nei singoli siti (Barbieri et al., 2004), difficilmente esso può essere il principale fattore responsabile del declino dell'ululone nell'intera area di studio. Un secondo fattore spesso invocato come principale responsabile del declino delle specie è il cambiamento bioclimatico. Anche in questo caso però, a fronte dei nostri risultati, questo cambiamento non sembrerebbe responsabile del declino di *B. pachypus* nell'area di studio, quantomeno non come unico fattore. Infatti, il massiccio della Sila, dove non è stato trovato alcun sito di presenza, non presenta una bassa idoneità climatica se comparata con le aree limitrofe e, inoltre, la maggior parte dei siti storici ricade esattamente all'interno dell'area corrispondente all'optimum bioclimatico. In ultima analisi, neppure la presenza di *B. dendrobatidis* può essere invocata come unico fattore responsabile del declino delle popolazioni di ululone (Pounds e Coloma, 2008 e citazioni). Questo, poiché *B. dendrobatidis* era già diffuso nell'area di studio (compresa la regione dell'Aspromonte) almeno dai primi anni '80 (Canestrelli et al., 2013), ossia ben prima dell'inizio del declino osservato. Certamente, al contrario dei risultati ottenuti nelle precedenti valutazioni, la presenza di *B. dendrobatidis* è confermata nella parte settentrionale dell'area di studio ma non in quella meridionale. Ciononostante, non può essere escluso il suo ruolo se combinato con altri fattori.

I risultati discussi finora portano a due scenari, i quali non si escludono reciprocamente ma risultano entrambi utili nel tentativo di rispondere alle domande poste in precedenza. Nel primo scenario la riduzione complessiva della distribuzione geografica del chitridio (e la sua assenza da siti molto vicini a quelli dove fino al 2003 la sua presenza risultava abbondante) potrebbe essere il risultato di dinamiche epidemiche correlate ai cambiamenti climatici. Difatti, prove sperimentali hanno mostrato come la patogenicità del chitridio diminuisca all'aumentare delle temperature, con possibili implicazioni su scala microgeografica (Greenspan et al.,

2017a), così come aumenta la vulnerabilità dell'ospite veicolata dall'infezione con i cambiamenti climatici (Greenspan et al., 2017b). Nel secondo scenario le differenze geografiche potrebbero essere implicate nei meccanismi di resistenza degli anfibi (Luquet et al., 2012). A tal proposito vale la pena ricordare che i pattern geografici di variazione della presenza di *B. pachypus* e della distribuzione del chitridio sono congruenti con la struttura geografica della variazione genetica delle popolazioni di *B. pachypus*. Infatti, tutte le popolazioni più abbondanti, attualmente libere dall'infezione, appartengono al cluster meridionale confinato nella sottoregione dell'Aspromonte. Nonostante i nostri risultati non siano conclusivi nella risoluzione dei due scenari presentati, preparano il terreno per futuri sforzi sperimentali basati su ipotesi di ricerca testabili.

Un corollario interessante al primo scenario deriva dall'analisi dell'idoneità bioclimatica predetta dagli scenari futuri nella regione dell'Aspromonte. Infatti, in questa regione si prevede un futuro slittamento dell'optimum climatico per *B. pachypus* verso altitudini maggiori. Lo slittamento verso altitudini maggiori prospetta uno scenario in cui due forze contrastanti agiranno sulle popolazioni. Da un lato gli attuali siti di presenza perderanno la loro idoneità climatica nel prossimo futuro, ma in una direzione che renderà l'ululone più suscettibile alla patogenicità del chitridio (per via dell'aumento delle temperature). Dall'altro lato, colonizzare altitudini più elevate permetterebbe a *B. pachypus* di seguire il suo optimum bioclimatico, sebbene a spese di condizioni climatiche più favorevoli anche al suo agente patogeno. Lo scenario proposto potrebbe essere validato sperimentalmente tra le popolazioni provenienti dalla regione dell'Aspromonte attraverso il monitoraggio di variabili ambientali, parametri epidemiologici e tratti di performance di *B. pachypus*. Poiché questa è anche l'unica area in cui la specie risulta relativamente abbondante, il nostro suggerimento è che gli si presti una particolare attenzione nell'ambito della conservazione (aumentando per esempio i monitoraggi), in quanto questa potrebbe rimanere a breve l'unica regione disponibile per condurre ricerche che possano fare luce sui meccanismi che si trovano alla base di questo declino.

2.4.2 STRUTTURA GEOGRAFICA E TARGET CONSERVAZIONISTICI

La comprensione accurata dei meccanismi responsabili del declino di una specie è uno step essenziale per la sua conservazione. Tuttavia, il repentino declino demografico e della diversità genetica riscontrati nelle popolazioni studiate richiedono l'attuazione di azioni tempestive, finalizzate ad evitare la scomparsa delle popolazioni in breve tempo. Basandoci sui risultati ottenuti nel nostro studio, possiamo trarre quattro maggiori implicazioni, utili a

identificare le priorità e a ottimizzare l'utilizzo delle risorse finalizzate per programmi "a breve termine".

Primo, contrariamente a quanto precedentemente dedotto, non tutte le popolazioni che si trovano nell'hotspot dovrebbero essere considerate come prioritarie per i programmi di conservazione della specie *in-situ*. Difatti, nella maggior parte dell'hotspot, il declino è apparso ad uno stadio avanzato (se non definitivo). Dal momento che uno degli obiettivi dei programmi *in-situ* dovrebbe essere massimizzare la probabilità di persistenza delle specie, le popolazioni dell'Aspromonte sembrerebbero le uniche e le ultime con caratteristiche demografiche, genetiche ed epidemiologiche che le rendono idonee ad azioni *in-situ*, inclusi piani di protezione stringenti e costanti monitoraggi dei siti di riproduzione.

Secondo, in quelle aree dove la specie è ancora presente (Catena Costiera e Serre), ma dove i dati suggeriscono un andamento demografico negativo, dovrebbero essere implementati esperimenti pilota di riproduzione in cattività con stock misti (ossia con individui provenienti da entrambe le regioni e dall'Aspromonte). Secondo l'ipotesi che le popolazioni dell'Aspromonte abbiano una performance migliore in termini di resistenza al chitridio, tali esperimenti permetterebbero un flusso benefico di alleli tra le popolazioni (Jones, 2013). Qualora la riproduzione in stock misti fornisse i benefici suggeriti, gli individui prodotti potrebbero essere dei candidati idonei per programmi di reintroduzione finalizzati al recupero della specie.

Terzo, i nostri risultati mostrano una drastica riduzione della presenza del patogeno chitridio sul suo ospite *B. pachypus*, se paragonati a ciò che si era osservato nel recente passato (Canestrelli et al., 2013), ma non implicano un declino del patogeno nell'area di studio. Perciò, suggeriamo di monitorare costantemente la presenza del chitridio *in-situ* sia su *B. pachypus* che su altri ospiti potenziali (Simoncelli et al., 2005; Zampiglia et al., 2013), e di effettuare una profilassi appropriata negli individui utilizzati nei diversi programmi *ex-situ*.

Quarto, ma non ultimo, i nostri risultati hanno mostrato una potenziale riduzione drastica dell'idoneità di habitat per il 2070-2100, abbinata ad uno slittamento dell'areale verso l'alto. I piani di conservazione dovrebbero tener conto di questo trend e prendere decisioni di conseguenza. In particolare, i programmi di riproduzione in cattività dovrebbero essere progettati per stimare la performance della specie lungo il cline altitudinale. Approcci utili in questa direzione potrebbero essere le valutazioni di performance comparative (con e senza il chitridio) in camere climatiche sperimentali, o l'uso di sistemazioni semi-naturali replicate, situate lungo clini ambientali. Tali approcci potrebbero inoltre fornire dati di estremo valore per aiutare a identificare i siti più idonei per programmi di ripopolamento e reintroduzione di questa specie, sia in Italia meridionale che altrove.

2.5 TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Posizione geografica, dimensione del campione, anno di campionamento e stima della diversità genetica per le 22 popolazioni di *B. pachypus* campionate per le analisi della variazione genetica in Italia meridionale. Le aree di campionamento sono definite secondo la Figura 1. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias; A_r : ricchezza allelica.

	Sito		Area	Lat. N	Long. E	Classificazione	Anno	N	H _E (s.e.)	A _r
1	Monte (1981)	Cocuzzo	Catena Costiera	39°14'N	16° 10'E	Vecchio	1981	9	0.62 (0.04)	3.72
2	Monte (2014)	Cocuzzo	Catena Costiera	39°14'N	16° 7'E	Nuovo	2014	4	0.57 (0.06)	3.43
3	Belmonte Calabro		Catena Costiera	39°11'N	16° 6'E	Nuovo	2015	3	-	-
4	Cellara		Sila	39° 7'N	16°12'E	Nuovo	2015	2	-	-
5	Macchia Longa		Sila	39°22'N	16°36'E	Vecchio	1981	9	0.62 (0.04)	3.77
6	Taverna		Sila	39° 1'N	16°35'E	Vecchio	2003	2	-	-
7	Girifalco		Serre	38°49'N	16°29'E	Vecchio	1978	9	0.68 (0.03)	3.99
8	Cardinale		Serre	38°44'N	16°24'E	Vecchio	1978	4	0.78 (0.03)	4.14
9	Lacina		Serre	38°34'N	16°23'E	Nuovo	2013	5	0.63 (0.04)	3.43
10	Serra San Bruno		Serre	38°34'N	16°19'E	Nuovo	2013	1	-	-
11	Stilo		Serre	38°30'N	16°25'E	Vecchio	2003	8	0.76 (0.02)	4.16
12	Zomaro		Aspromonte	38°17'N	16° 6'E	Nuovo	2013-2015	8	0.65 (0.03)	3.75
13	Delianuova		Aspromonte	38°14'N	15°53'E	Nuovo	2013	2	-	-
14	Melia		Aspromonte	38°13'N	15°43'E	Nuovo	2015	8	0.53 (0.04)	2.93
15	Gambarie		Aspromonte	38° 10'N	15°50'E	Vecchio	1981	9	0.67 (0.04)	3.96
16	Rifugio Giardini		Aspromonte	38° 9'N	15°55'E	Nuovo	2015	5	0.61 (0.05)	3.41
17	Rifugio Canovai		Aspromonte	38° 7'N	15°57'E	Nuovo	2015	5	0.56 (0.05)	2.89
18	Samo		Aspromonte	38° 5'N	16° 0'E	Nuovo	2015	8	0.45 (0.04)	2.58

Tabella 1. *continua*

19	Cardeto	Aspromonte	38° 4'N	15°44'E	Nuovo	2015	6	0.50 (0.05)	2.63
20	Mosorrofa	Aspromonte	38° 5'N	15°43'E	Nuovo	2015	7	0.49 (0.05)	2.79
21	Condofuri	Aspromonte	37°59'N	15°52'E	Nuovo	2015	9	0.56 (0.04)	3.17
22	Montebello Ionico	Aspromonte	37°58'N	15°44'E	Nuovo	2016	7	0.46 (0.05)	2.84

Tabella 2. Importanza delle variabili per i differenti algoritmi. I valori in tabella sono le medie tra le varie ripetizioni modellistiche. Un valore pari a 0 non assume alcuna influenza della variabile sul modello, più alto è il valore, maggiore è l'influenza delle variabili sul modello (massimo = 1; Thuiller et al., 2009). Variabili climatiche definite in Hijmans e colleghi (2005).

	GLM	GBM	GAM	MARS	MAXENT
Temperatura media annua	0.2776	0.0398	0.638	0.3724	0.0526
Range medio diurno	0.0564	0.1744	0.046	0.0518	0.0574
Stagionalità della temperatura	0.0892	0.1094	0.235	0.1472	0.1038
Temperatura media del quarto più umido	0.2074	0.2478	0.2064	0.1662	0.2264
Temperatura media del quarto più secco	0.1822	0.2006	0.6012	0.3826	0.2162
Precipitazione del mese più umido	0.1612	0.0892	0.145	0.137	0.1118
Stagionalità della precipitazione	0.0966	0.037	0.213	0.1814	0.1444

Figura 1. Pattern di variazione spaziale e temporale della presenza della specie, diversità genetica e presenza del chitridio, per l'ululone appenninico in Italia meridionale (Regione Calabria). Le fonti dei dati e dei campioni storici sono riportati nel testo. A: Siti di presenza passati e presenti di *B. pachypus* nell'area; le aree tratteggiate mostrano le quattro sottoregioni considerate nello studio. B: I risultati dell'analisi di clusterizzazione Bayesiana utilizzata per determinare la struttura genetica di popolazione di *B. pachypus* nell'area; proporzioni di admixture per ogni individuo campionato per i 3 cluster genetici identificati come la miglior opzione di clusterizzazione dal metodo implementato in TESS. C: Variazione geografica nelle stime di diversità genetica (A_r : ricchezza allelica), tra le popolazioni di *B. pachypus* campionate sia per il presente studio che nel passato. D: Presenza passata e presente del chitridio patogeno *B. dendrobatidis* tra le popolazioni campionate di *B. pachypus* dell'area di studio.

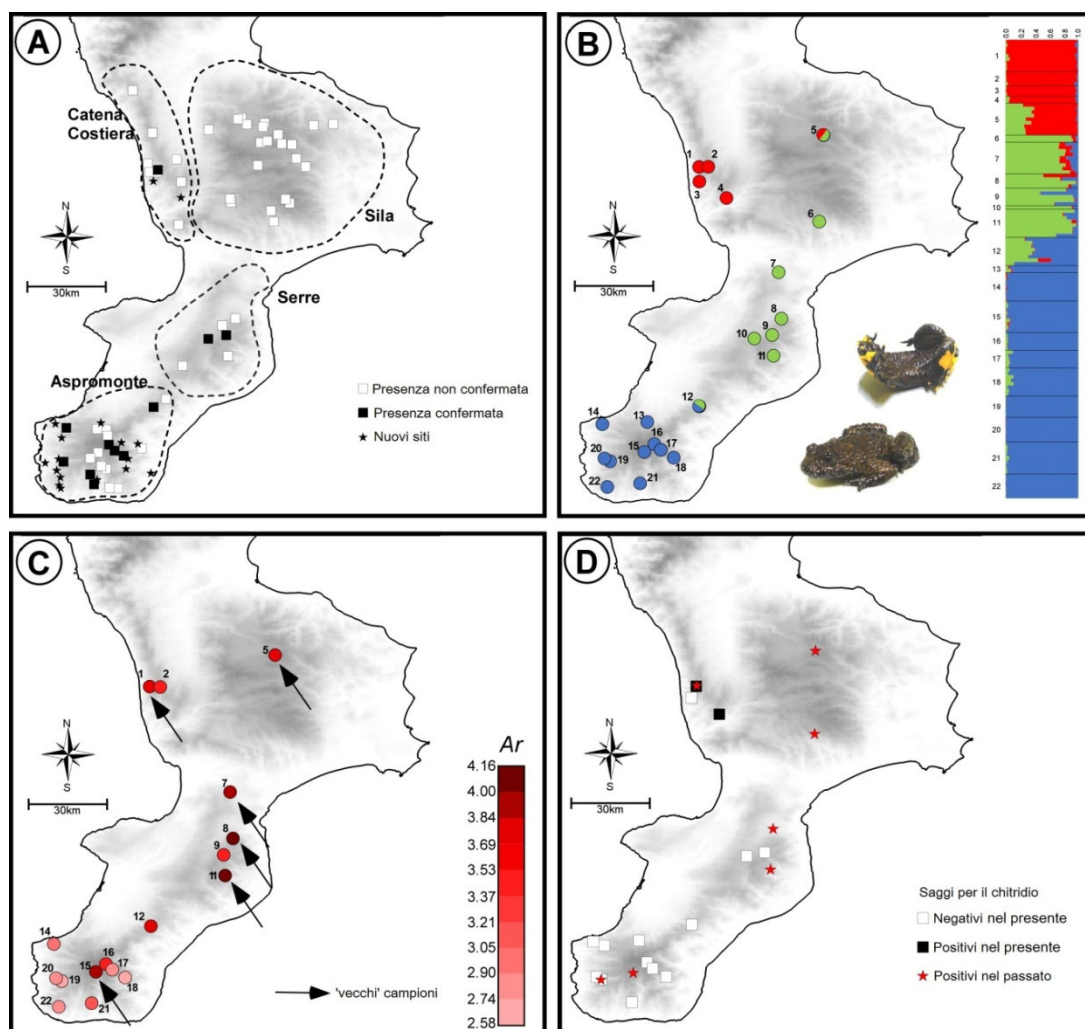
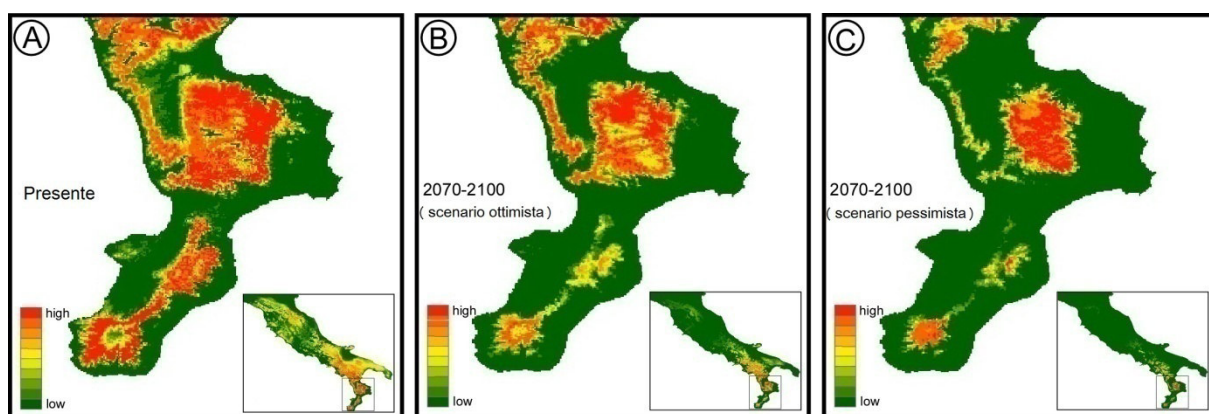


Figura 2. Modelli di distribuzione della specie *B. pachypus* secondo le attuali condizioni bioclimatiche (A), e la sua proiezione nel prossimo futuro (2070-2100), secondo uno scenario ottimistico (B) e pessimistico (C) di emissione di gas serra (RCP2.6 e RCP8.5 rispettivamente).



MATERIALE SUPPLEMENTARE

Materiali e Metodi

PCR dei microsatelliti

F22: il primer forward è stato etichettato con TAMRA; il mix di reazione (10 µl) conteneva 10-20 ng/µl di DNA, 0.25 µM di ogni primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0.5 U di GoTaq DNA Polimerasi (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 95° C per 2 min, 35 cicli di 30 sec a 95° C, 30 sec a 47° C, 30 sec a 72° C e un'estensione finale a 72° C per 15 min.

9H: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; il mix di reazione (10 µl) conteneva 10-20 ng/µl di DNA, 0.25 µM di ogni primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0.5 U di GoTaq DNA Polimerasi (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 95° C per 2 min, 35 cicli di 30 sec a 95° C, 30 sec a 52° C, 30 sec a 72° C e un'estensione finale a 72° C per 15 min.

5F: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; il mix di reazione (10 µl) conteneva 10-20 ng/µl di DNA, 0.25 µM di ogni primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0.5 U di GoTaq DNA Polimerasi (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 95° C per 5 min, 35 cicli di 30 sec a 95° C, 30 sec a 50° C, 45 sec a 65° C e un'estensione finale a 60° C per 15 min.

Bv11: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; il mix di reazione (10 µl) conteneva 10-20 ng/µl di DNA, 0.25 µM di ogni primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0.5 U di GoTaq DNA Polimerasi (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 95° C per 5 min, 35 cicli di 30 sec a 95° C, 30 sec a 53° C, 45 sec a 65° C e un'estensione finale a 60° C per 15 min.

1A: il primer forward è stato etichettato con TAMRA; il mix di reazione (10 µl) conteneva 10-20 ng/µl di DNA, 0.25 µM di ogni primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0.5 U di GoTaq DNA Polimerasi (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 95° C per 2 min, 35 cicli di 30 sec a 95° C, 30 sec a 56° C, 30 sec a 72° C e un'estensione finale a 72° C per 15 min.

8A: il primer forward è stato etichettato con HEX; il mix di reazione (10 µl) conteneva 10-20 ng/µl di DNA, 0.25 µM di ogni primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0.5 U di GoTaq DNA Polimerasi (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 95° C per 2 min, 35 cicli di 30 sec a 95° C, 30 sec a 55° C, 30 sec a 72° C e un'estensione finale a 72° C per 15 min.

10F: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; il mix di reazione (10 µl) conteneva 10-20 ng/µl di DNA, 0.25 µM di ogni primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0.5 U di GoTaq DNA Polimerasi (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 95° C per 2 min, 35 cicli di 30 sec a 95° C, 30 sec a 58° C, 30 sec a 72° C e un'estensione finale a 72° C per 15 min.

I prodotti della PCR sono stati assemblati in due multiplex post-PCR: una che includeva 10F, 1A e Bv11 e l'altra che includeva 9H, 8A and F22. I 5F sono stati genotipizzati da soli

Filtro spaziale del dataset di presenze

Per limitare l'effetto della clusterizzazione spaziale tra le presenze usate per calibrare i differenti algoritmi, abbiamo applicato, nello spazio geografico, un filtro spaziale alle 361 presenze originali (Aiello-Lammens et al. 2015). Abbiamo usato il pacchetto R SPTHIN che richiede la definizione di una distanza minima che viene utilizzata per rimuovere in maniera casuale le presenze che hanno tra loro una distanza inferiore a tale distanza. Per determinare empiricamente questa distanza di filtraggio, abbiamo generato 10000 set ognuno da 361 punti (lo stesso numero dei punti di presenza della specie collezionati) distribuiti in maniera casuale nell'intera area di calibrazione (i.e., l'area campionata dalle presenze); per ciascuno dei 10000 set abbiamo calcolato la distanza media tra ogni punto e il punto più vicino ad esso, e poi abbiamo calcolato la media tra tutti i 10000 set di punti distribuiti in maniera casuale, che è risultata essere di 11277 metri. Utilizzando questa stessa distanza, abbiamo ottenuto cinque dataset alternativi con 182 presenze ciascuno (ognuna delle quali distante almeno 11277 metri dal punto di presenza più vicino) usati per la calibrazione del modello e 179 presenze usate per la validazione del modello.

3. DIVERSITA' INTRASPECIFICA E MODELLI DI DISTRIBUZIONE: UN APPROCCIO INTEGRATO PER LA RICOSTRUZIONE DI RIFUGI GLACIALI MULTI-TAXON

ABSTRACT

I rifugi glaciali hanno consentito la sopravvivenza delle popolazioni di una o più specie durante i cicli glaciali pleistocenici e rappresentano oggi un laboratorio naturale per lo studio dei processi evolutivi che hanno generato la diversità genetica e di specie. In Europa, le penisole mediterranee sono tra i principali hotspot di diversità genetica e di specie e per questo sono state identificate come i principali rifugi glaciali. Tradizionalmente l'identificazione dei rifugi è stata condotta sullo studio di dati palinologici, paleontologici e filogeografici, e più recentemente utilizzando i modelli di distribuzione delle specie (Species Distribution Models, SDMs). Questi hanno permesso di identificare i rifugi ad una risoluzione spaziale più idonea per una demarcazione geografica accurata delle aree di rifugio e per lo studio di processi microevolutivi. Tuttavia questi studi non considerano la diversità intraspecifica durante la ricostruzione delle paleo-distribuzioni delle specie. Qui, proponiamo il primo studio multi-taxon per identificare le principali aree di rifugio glaciale per i vertebrati terrestri della penisola italiana integrando l'informazione sulla variazione genetica intraspecifica nella calibrazione di SDMs. I risultati ottenuti descrivono sia a livello di singoli taxa che a livello globale alcuni pattern spaziali come la presenza di rifugi multipli e di ridotte estensioni, l'aumento di queste aree dal nord verso il sud della penisola, e infine l'identificazione di gran parte dei rifugi lungo le coste della penisola, con una particolare concentrazione per la penisola calabra e quella salentina. Pur mancando un supporto dai dati fossili a conferma dei nostri risultati, a causa della presenza attuale dei rifugi sotto il livello del mare, tuttavia i pattern spaziali osservati potrebbero essere giustificati se consideriamo il flusso genico come promotore principale della diversità intraspecifica, a seguito dei ripetuti contatti secondari tra le linee divergenti rimaste isolate nei rifugi durante i periodi inter e post-glaciali. I nostri risultati supportano fortemente questa seconda ipotesi, facendo coincidere i rifugi multi-taxon con le aree maggiormente affette da continui cambiamenti geografici come le passate linee di costa. Il nostro studio fornisce un solido framework per la ricostruzione dei rifugi glaciali, sottolineando l'efficacia di combinare i modelli di distribuzione delle specie con dati di diversità genetica intraspecifica al fine di ricostruire la corretta posizione dei rifugi glaciali e per la comprensione dell'evoluzione dei pattern di diversità genetica.

Parole chiave: rifugi glaciali, modelli di distribuzione delle specie, paleo-distribuzioni, diversità genetica intraspecifica, penisola italiana, rifugi multipli.

3.1 INTRODUZIONE

I rifugi glaciali sono aree geografiche che hanno consentito la sopravvivenza delle popolazioni di una o più specie durante le fasi climaticamente più estreme dei cicli glaciali pleistocenici. Grazie al mantenimento di condizioni ambientali favorevoli per le diverse specie, i rifugi glaciali hanno rappresentato un serbatoio di biodiversità durante il Pleistocene, e rappresentano oggi un laboratorio naturale per lo studio dei processi evolutivi che hanno guidato la storia evolutiva delle singole specie e delle comunità (Hewitt, 1996).

Le penisole mediterranee sono tra i principali hotspot di diversità di specie e di diversità genetica del pianeta, e sono state identificate come i principali rifugi glaciali per le specie europee temperate (Taberlet, 1998; Hewitt, 2011a). Per spiegare lo straordinario livello di diversità intraspecifica presente in queste aree sono state proposte due ipotesi principali. Secondo la prima ipotesi, nelle aree di rifugio glaciale le specie avrebbero mantenuto popolazioni ampie e demograficamente stabili per molto tempo (uno o più cicli glaciali), evitando o comunque riducendo la perdita di diversità genetica alla quale vanno solitamente incontro popolazioni piccole o molto frammentate (Hewitt, 1996; Hewitt, 2000; Petit et al., 2003). La seconda ipotesi, al contrario, chiama in causa processi dinamici, quali la vicarianza, il differenziamento genetico, il successivo contatto secondario e l'ibridazione. Secondo questo scenario infatti, le diverse specie sarebbero sopravvissute in rifugi altamente strutturati, all'interno dei quali le popolazioni si sarebbero differenziate geneticamente, ed al ripristino di condizioni idonee alla ricolonizzazione le popolazioni si sarebbero espanse e rimescolate geneticamente, dando luogo a processi di ibridazione intraspecifica con conseguente aumento sostanziale dei livelli di variabilità genetica (Gómez & Lunt, 2007; Canestrelli et al., 2010; Canestrelli et al., 2012a). Entrambe le ipotesi evidenziano il ruolo chiave dei rifugi glaciali nel modellare i pattern geografici di variazione genetica delle specie. L'identificazione e la corretta localizzazione geografica delle aree di rifugio glaciale rappresenta dunque un obiettivo fondamentale per la comprensione dei processi evolutivi che hanno contribuito alla formazione dei pattern di diversità genetica.

L'identificazione dei rifugi consiste nella ricostruzione della distribuzione delle specie nel passato. Tradizionalmente, l'identificazione di putative aree rifugio si basava sullo studio di record fossili e pollinici (Huntley & Birks, 1983; Bennett et al., 1991). Tuttavia, nonostante questo approccio fornisca informazioni precise sui siti di presenza delle specie, queste informazioni hanno carattere puntiforme e forniscono dunque ricostruzioni incomplete della distribuzione

passata (Petit et al., 2002; Provan & Bennett, 2008). Un limite ulteriore rappresentato da questo approccio è l'assenza pressoché completa di fossili per numerosi taxa, nonché la difficoltà di identificare correttamente la specie di appartenenza del resto fossile (Provan & Bennett, 2008). Negli ultimi anni, la ricostruzione della storia evolutiva delle specie si è avvalsa dell'approccio molecolare. La filogeografia, la branca della biologia evolutiva che studia la distribuzione geografica dei geni ed i processi evolutivi coinvolti, ha consentito un notevole passo avanti nell'identificazione delle aree rifugio pleistoceniche. Gli studi di filogeografia hanno permesso di individuare aree con livelli di diversità genetica notevolmente più alte, che sono state dunque proposte come putative aree rifugio (Hewitt, 1996; Avise 2000). Tuttavia, la principale limitazione di questo approccio è rappresentata dalla probabile estinzione di varianti genetiche, nonché dalla difficoltà per molte specie di effettuare campionamenti sufficientemente rappresentativi della variazione genetica attualmente esistente (Vega et al., 2010). Inoltre, entrambi gli approcci identificano i rifugi con una risoluzione spaziale spesso troppo bassa per una demarcazione geografica accurata ed un'analisi dell'eventuale struttura delle singole aree rifugio.

Un dettaglio geografico maggiore può essere raggiunto utilizzando i modelli di distribuzione della specie (Species Distribution Models, SDMs) (Waltari et al., 2007). Gli SDMs predicono la distribuzione potenziale di una specie stimando la relazione tra dati di presenza della specie e variabili ambientali (Guisan & Zimmermann, 2000). Inoltre, la relazione specie-habitat può essere proiettata in periodi passati per predire come la specie abbia risposto ai cambiamenti climatici del passato e per ricostruirne la distribuzione. Nonostante le costanti migliorie apportate agli SDMs da un punto di vista metodologico e la loro diffusissima applicazione, rimangono tuttavia dei limiti teorici. La proiezione in differenti periodi temporali è basata sull'assunto che una specie sia in equilibrio costante con le caratteristiche ambientali di cui necessita e che la nicchia ecologica di una specie non evolva né temporalmente, né spazialmente (Peterson, 2011). Inoltre, per entrambi gli assunti viene ignorato se i dati di presenza di una specie rappresentino una singola unità evolutiva o un insieme di linee filogeografiche che possono variare tra loro geneticamente ed evolutivamente (Pearman et al., 2010). Recentemente dati genomici hanno mostrato come specie precedentemente considerate come una unica entità siano in realtà una collezione di multipli taxa, e come questi taxa abbiano una forte struttura genetica geografica (Wielstra et al., 2018).

Un passo avanti nell'utilizzo degli SDM per l'identificazione dei rifugi Pleistocenici consiste nell'integrazione all'interno dei modelli delle informazioni riguardanti la struttura genetica e la variazione intraspecifica delle specie studiate. L'inclusione di tali informazioni

permette di considerare separatamente i dati di presenza dei diversi taxa, generando modelli di distribuzione distinti, che meglio rappresentano dunque la variazione intraspecifica nella risposta evolutiva ai cambiamenti ambientali (Pearman et al., 2010; Pfenninger et al., 2012; D'Amenet al., 2013). Mentre questo approccio è stato già utilizzato per proiettare la distribuzione delle specie nel futuro secondo gli scenari esistenti, la sua applicazione nella ricostruzione delle paleo-distribuzioni è invece ancora raro (ma vedi Phuong et al., 2017; Dinis et al., 2019), mentre nessuno studio ne ha sinora considerato le possibili implicazioni nell'identificazione delle macro-aree di rifugio glaciale.

In questo studio abbiamo integrato l'informazione sulla variazione genetica intraspecifica nella generazione di SDM, al fine di identificare le principali aree di rifugio glaciale per i vertebrati terrestri della penisola italiana. Per ciascuna delle specie studiate abbiamo raccolto i dati di presenza rappresentativi esclusivamente dei taxa endemici dell'Italia peninsulare e costruito un modello della distribuzione spaziale, che abbiamo successivamente proiettato sui layer bioclimatici disponibili per l'ultimo massimo glaciale alla massima risoluzione spaziale disponibile (Last Glacial Maximum, LGM). Successivamente abbiamo analizzato i pattern di concordanza tra i modelli e le proiezioni, al fine di identificare le aree di rifugio glaciale principali. Infine, abbiamo discusso le implicazioni dei risultati ottenuti per la comprensione dell'evoluzione dei pattern di diversità durante il tardo Pleistocene.

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 SPECIE OGGETTO DELLO STUDIO

Il nostro studio si concentra sui vertebrati terrestri endemici della penisola italiana. Abbiamo considerato non solo le specie endemiche ma anche le sottospecie. Inoltre, dal momento che studi filogeografici dettagliati riguardanti specie non endemiche hanno mostrato la presenza di unità intraspecifiche endemiche della penisola, differenziate geneticamente dal resto della specie, abbiamo deciso di integrare anche questi taxa nelle analisi. I taxa in questione sono stati identificati per ciascuna specie sulla base della presenza di un sostanziale ridotto flusso genico in specifiche aree che ha permesso la demarcazione dei diversi taxa. Abbiamo esaminato la letteratura pubblicata su riviste scientifiche accreditate, i report tecnici, nonché i dati non pubblicati prodotti dal nostro gruppo di ricerca. Abbiamo escluso quegli studi che non riportavano definizioni chiare delle divisioni intraspecifiche da un punto di vista genetico e geografico. Abbiamo raccolto dati per 22 vertebrati endemici, di cui 16 anfibi, 3 rettili e 3 piccoli mammiferi, includendo specie, sottospecie e unità intraspecifiche (da qui in avanti parleremo di *taxon*) (Tabella 1). Per la denominazione dei taxa, abbiamo utilizzato la nomenclatura esistente in accordo con l'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (International Union for Conservation of Nature, IUCN), e qualora non esistesse ci siamo riferiti al *taxon* basandoci sulla sua distribuzione geografica lungo la penisola; considerando che nessuna specie è stata divisa in più di due taxa ci siamo riferiti sempre al *taxon* settentrionale o al *taxon* meridionale.

3.2.2 MODELLI DI DISTRIBUZIONE DELLE SPECIE

Per identificare i rifugi abbiamo costruito un SDM calibrato con sole presenze ("presence-only" in Pearce & Boyce, 2006) per ogni *taxon*. Partendo da dati di distribuzione e dati climatici, e utilizzando l'approccio dell'ensemble forecasting, abbiamo modellizzato la distribuzione potenziale di ogni *taxon*. Abbiamo poi proiettato i modelli nel clima attuale e nel clima del LGM, ricostruendo quindi la localizzazione dei rifugi glaciali sulla base delle aree di presenza potenziale dei taxa. Infine, a partire dai rifugi dei singoli taxa, abbiamo identificato le aree di rifugio multi-*taxon*. Per la calibrazione del modello, i dati di presenza e i dati climatici sono stati campionati su una griglia latitudinale-longitudinale di 30", in quanto corrispondente

alla risoluzione spaziale dei layer climatici a disposizione per l'area di studio. Tutte le operazioni GIS sono state svolte utilizzando ArcGIS 10.1 (ESRI, Redlands, CA, USA).

AREE DI CALIBRAZIONE

Per calibrare gli SDMs, abbiamo considerato l'Italia peninsulare come area di calibrazione per la maggior parte dei taxa (Figura S1 in Materiali Supplementari). Per i taxa la cui distribuzione attuale si estende anche in Sicilia, questa è stata aggiunta all'area di calibrazione (*Hyla intermedia*; *Bufo bufo* taxon meridionale; *Podarcis siculus* taxon meridionale). Per *Bufo bufo* taxon meridionale abbiamo escluso la porzione nord della penisola (Pianura Padana e Alpi), perché analisi dettagliate della storia evolutiva hanno mostrato come quest'area non sia mai stata colonizzata da questo taxon e quindi in seguito a varie prove abbiamo deciso di escluderla dalla calibrazione (Chiocchio et al., *in prep*). Per i taxa la cui attuale distribuzione era limitata alla sola Calabria, abbiamo ristretto l'area di calibrazione utilizzando i fiumi Sangro e Volturno come confini settentrionali (*Lissotriton italicus* taxon meridionale; *Sciurus meridionalis*; *Myodes glareolus* taxon meridionale).

DATI DI DISTRIBUZIONE DEI TAXA

I punti di presenza dei taxa sono stati ottenuti considerando dati provenienti da fonti diverse: le località campionate negli studi filogeografici selezionati per il nostro studio (Tabella 1), CKmap 5.3.8 (Stoch, 2000-2005), Global Biodiversity Information Facility (www.GBIF.org) e Observado (www.observation.org). Abbiamo filtrato il dataset originale eliminando tutti i duplicati, i punti non georeferenziati e i punti con un'accuratezza spaziale $\geq 30''$.

La procedura con cui vengono selezionati sia le presenze che i punti di background influisce sulla calibrazione del modello (Barbet-Massin et al, 2012). Quando i dati con cui gli SDMs sono calibrati provengono da fonti differenti e non condividono uno schema di campionamento comune possono essere affetti da un errore sistematico di campionamento nonché da autocorrelazione spaziale (Rangel et al., 2006; de Oliveira et al., 2014; Varela et al., 2014). Per limitare l'influenza di questo errore sistematico, abbiamo adottato strategie diverse per i punti di presenza e per i punti di background. Per i punti di presenza, abbiamo applicato all'interno dello spazio geografico un filtro spaziale ai fini di ridurre l'aggregazione delle presenze. Abbiamo usato la libreria "spThin" in R© che richiede la definizione di una distanza minima, utilizzata per rimuovere in maniera casuale le presenze che hanno tra loro una distanza

inferiore a tale distanza minima (Aiello-Lammens et al., 2015). Per determinare empiricamente questa distanza, abbiamo generato per ogni taxon 10000 set di n punti distribuiti casualmente all'interno dell'area di campionamento (i.e. l'area campionata dalle presenze), dove n corrisponde al numero di presenze disponibili per ogni taxon. Per ognuno dei 10000 set abbiamo calcolato la distanza media tra ogni punto e il punto più vicino ad esso, e infine abbiamo calcolato la distanza media tra tutti i 10000 set. Grazie a questa distanza minima, abbiamo poi ottenuto cinque set alternativi di presenze filtrate che abbiamo usato per la calibrazione del modello.

Per i punti di background invece, abbiamo applicato l'approccio del target-group (TG) (Ranc et al., 2016). L'assunto che sta alla base di questo approccio è che i punti di presenza di specie che prevedono tecniche di campionamento simili da parte dell'osservatore possono essere raggruppati e usati come punti di background per approssimare l'errore sistematico di campionamento altrimenti sconosciuto (Phillips et al., 2009). Abbiamo quindi collezionato i punti del database compilato da Maiorano et al. (2013) per anfibi, rettili e mammiferi distribuiti nella penisola italiana e appartenenti alle stesse famiglie dei taxa inclusi nel nostro studio. Abbiamo deciso di raggruppare i dati di anfibi e rettili perché molto spesso vengono campionati dagli stessi osservatori e condividono quindi lo stesso errore sistematico di campionamento. Infine, abbiamo usato queste presenze come punti di background per la calibrazione dei modelli, escludendo di volta in volta per ogni taxon le sue presenze. Per quei taxa la cui distribuzione è limitata alla penisola della Calabria, abbiamo invece generato 4000 punti distribuiti casualmente poiché la calibrazione con i punti di background TG è fallita (Figura S2 in Materiali Supplementari).

Per la validazione dei modelli, abbiamo considerato nuovamente cinque set di presenze, ognuno dei quali includeva i punti precedentemente esclusi durante le procedure di filtraggio dei dataset di calibrazione. Come punti di background invece abbiamo generato n punti distribuiti casualmente, mantenendo per ogni taxon la stessa prevalenza dei set di calibrazione.

VARIABILI CLIMATICHE

Abbiamo ottenuto le variabili per il clima attuale (calcolato come media tra il 1960 e il 1990) e per il clima al LGM (risoluzione di 2.5') da Hijmans e colleghi (2005). Questo dataset contiene 19 variabili bioclimatiche che rappresentano la variazione e la media dei dati della temperatura e della precipitazione. Per limitare la multicollinearità abbiamo utilizzato l'analisi del fattore di inflazione della varianza (Variance Inflation Factor, VIF) sulle variabili bioclimatiche originali, e abbiamo considerato nell'analisi solo le variabili con una $VIF < 5$ (Zuur et al., 2010).

Abbiamo tenuto conto della letteratura che critica l'utilizzo di un singolo modello di circolazione generale (General Circulation Model, GCM) (Diniz-Filho et al., 2009; Nogués-Bravo, 2009; Buisson et al., 2010), e abbiamo ricostruito le paleodistribuzioni basandoci su tre differenti GCMs: il Community Climate System Model (CCSM4), il Model for Interdisciplinary Research on Climate (MIROC-ESM) e il Max-Planck-Institute Earth System Model (MPI-ESM-P).

CALIBRAZIONE E VALIDAZIONE DEI MODELLI

Per modellizzare la distribuzione delle linee abbiamo usato l'approccio dell'ensemble forecasting così come implementato nella libreria "biomod2" nell'ambiente R© (Thuiller et al., 2009), e considerando i seguenti cinque algoritmi: generalized linear model (GLM), generalized additive model (GAM), generalized boosted model (GBM), multivariate adaptive regression spline (MARS), e maximum entropy (MAXENT). Abbiamo calibrato i modelli con i cinque dataset di calibrazione, e la performance di ognuno è stata calcolata utilizzando i cinque set di validazione, andando a misurare l'area sotto la curva (Area Under the Curve, AUC) ROC (Receiver Operating Characteristic) (Swets, 1988). Solo i modelli con un valore di $AUC \geq 0.7$ sono stati poi proiettati nel clima attuale dell'intera Italia peninsulare. Abbiamo poi ottenuto un SDM finale, calcolato come la media pesata di tutti i modelli disponibili (i pesi per ogni modello sono stati basati sul rispettivo valore di AUC, come suggerito in Marmion et al., 2009). Infine, abbiamo trasformato i modelli continui in mappe binarie di presenza/assenza usando come valore soglia quello che massimizzava la somma della sensibilità e della specificità.

3.2.3 PALEODISTRIBUZIONI E RIFUGI GLACIALI

Abbiamo proiettato i modelli con un valore ≥ 0.7 nel clima del passato, scegliendo come area di proiezione quella corrispondente all'Italia peninsulare del passato. Infatti, durante il LGM quest'area era diversa da come si presenta oggi a causa del livello del mare inferiore di molte decine di metri dall'attuale, il che comportava una quantità maggiore di terre emerse rispetto ad oggi. Abbiamo definito i confini dell'area di proiezione utilizzando il ghiacciaio alpino a Nord, il Mar Mediterraneo ad Ovest e a Sud, e le montagne Balcaniche a Est. Per ogni GCMs, abbiamo prodotto un modello finale, calcolato come per il modello di distribuzione attuale, ovvero come la media pesata di tutti i modelli disponibili. Poi, utilizzando il valore soglia che massimizza la

somma della sensibilità e della specificità, abbiamo ottenuto per ogni modello le mappe binarie di presenza/assenza di ogni taxon, una per ogni GCMs.

Per ogni set di variabili bioclimatiche, abbiamo rilevato quali aree del passato avessero dei valori di queste variabili al di fuori del range considerato per la calibrazione attraverso la Multivariate Environmental Similarity Surface (MESS) (Elith et al, 2010). L'analisi MESS è stata condotta usando il programma MaxEnt, v. 3.3.3 (Phillips et al., 2004).

La localizzazione dei rifugi glaciali è stata determinata a partire dalle mappe binarie dei tre GCMs. Abbiamo sommato le tre mappe binarie e abbiamo selezionato quelle aree classificate come idonee in funzione del maggior numero di GCMs possibile (tre, due o uno). Per ottenere la mappa dei rifugi multi-taxon, abbiamo sommato insieme tutte le mappe dei singoli taxa. Per capire quale fosse l'impatto sul risultato finale delle nostre scelte metodologiche, abbiamo definito le aree di rifugio anche con due metodi alternativi: a) selezionando tutte le aree classificate come idonee da massimo due GCMs su tre; e b) selezionando tutte le aree classificate come idonee da ciascuno dei GCMs. Per ognuna delle metodologie alternative abbiamo poi ottenuto la mappa dei rifugi multi-taxon

3.3 RISULTATI

3.3.1 DATI DI DISTRIBUZIONE DELLE SPECIE E VARIABILI CLIMATICHE

Abbiamo raccolto un minimo di 30 punti di presenza per ogni taxon e, in seguito alla procedura di filtraggio spaziale, abbiamo calibrato ogni SDMs con un minimo di 21 (*Lissotriton italicus* taxon meridionale) e un massimo di 407 presenza (*Pelophylax lessonae*) (Tabella 1). Mediamente, dopo il filtraggio, abbiamo calibrato i modelli con il 56% delle presenze iniziali e li abbiamo validati con il 44% delle presenze iniziali. Per i punti di background TG, abbiamo raccolto i dati per 33 specie: 13 di anfibi e rettili (per un totale di 8214 punti, Figura S2a) e 20 di mammiferi (per un totale di 2005 punti, Figura S2b) (vedi Appendice per la lista completa delle specie TG).

Abbiamo calibrato i modelli con sei o sette variabili per taxon, a seconda delle differenti combinazioni di aree di calibrazione e punti di calibrazione (Tabella S1).

3.3.2 CALIBRAZIONE E VALIDAZIONE DEI MODELLI

Abbiamo calibrato 25 modelli per ciascun taxon (5 set di calibrazione per 5 algoritmi) con una buona performance, considerando che tutti i modelli hanno ottenuto un valore di AUC uguale o maggiore di 0.7, ad eccezione dei GLMs del *Lissotriton italicus* taxon settentrionale (Tabella S2). Il valore di AUC medio andava da 0.96 (AUC s.d. $\pm$ 0.01) per *Salamandrina terdigitata* a 0.73 (AUC s.d. $\pm$ 0.05) per *Lissotriton vulgaris meridionalis*.

La distribuzione attuale di ogni taxon ricostruita con i nostri modelli combacia con la distribuzione riportata dalla IUCN e dagli studi filogeografici dove i taxon sono stati identificati.

3.3.3 PALEODISTRIBUZIONI E RIFUGI GLACIALI

Per tutti i GCMs la maggior parte delle regioni con valori al di fuori del range considerato nella calibrazione si trovano nella porzione nord-est dell'area di proiezione (Figura S3). Il GCM CCSM4 presenta valori fuori dal range anche sulle coste occidentali dell'area di proiezione. In media, la regione all'LGM che risulta più simile al clima attuale è la porzione meridionale dell'Italia peninsulare. Per gran parte delle linee, le mappe di presenza/assenza ottenute dalla proiezione dei tre GCMs sono simili (Figura S4-25 pannelli c, d, e). Delle 22 linee studiate, 14

hanno prodotto aree che sono risultate idonee per tutti e tre i GCMs e sei linee hanno ottenuto aree classificate come idonee da due GCMs su tre. Solo due linee, *Salamandra salamandra gigliolii* e *Sciurus meridionalis*, non hanno ottenuto aree idonee concordanti tra nessuno dei tre GCMs.

A prescindere dal taxon, la gran parte dei rifugi ricostruiti sono multipli, di estensione moderata, frammentati e principalmente localizzati sulle coste meridionali ed occidentali dell'area di proiezione (Figure S4-25 pannello f). Gli unici taxa con rifugi più ampi e diffusi sono *Bufo bufo* taxon meridionale, *Hyla perrini*, *Lissotriton italicus* taxon settentrionale, *Salamandra salamandra gigliolii* e *Talpa romana*. Gli unici due taxa a presentare rifugi nella porzione settentrionale dell'area di proiezione sono *Triturus carnifex* taxon settentrionale and *Hyla perrini*. Gli unici taxon con rifugi non costieri sono *Hyla perrini*, *Triturus carnifex* taxon settentrionale, *Myodes glareolus* e *Sciurus meridionalis*.

La maggior parte dei rifugi multi-taxon condivide gli stessi pattern spaziali dei rifugi dei singoli taxon. Difatti, anche queste aree sono multiple, frammentate e principalmente localizzate sulle coste meridionali ed occidentali (Figura 1). La ricchezza di taxa presente all'interno dei rifugi multi-taxon va da 0 a 8, sebbene la percentuale di area di proiezione occupata da 8 taxa contemporaneamente corrisponda solo allo 0.01%. In generale le aree di rifugio multi-taxon risultano concentrate nel 10% circa dell'area di proiezione, mentre il restante 60% non risulta area idonea come rifugio per nessun taxon (Tabella 2). I rifugi con la maggior ricchezza di taxa sono localizzati sulle coste della penisola calabra e salentina e gli altri meno ricchi principalmente sulle coste occidentali (Figura 1). Mediamente, la distribuzione della presenza dei rifugi multi-taxon aumenta dalle aree interne verso le aree costiere, e aumenta dalla porzione settentrionale a quella meridionale della penisola Italiana. Questi due pattern spaziali risultano stabili, dal momento che sono stati ottenuti anche calcolando i rifugi con le due metodologie alternative proposte, entrambe meno conservative di quella infine selezionata (Figura S27).

3.4. DISCUSSIONE

I progressi degli ultimi anni nelle tecniche di modellizzazione della distribuzione delle specie, e la loro integrazione con informazioni filogeografiche, hanno portato a numerosi studi che stimano la posizione dei rifugi glaciali (ad es. Vega et al., 2010; Forester et al., 2013; Bidegaray-Batista et al., 2016; Drees et al., 2016). Sebbene questi studi siano un ottimo esempio di come l'integrazione di approcci e dati diversi rappresentino un notevole vantaggio, essi presentano limiti importanti. In primo luogo, considerano come unità di analisi l'intera specie, non considerando la diversità intraspecifica nella costruzione dei modelli, ed ignorando dunque come linee diverse possano aver risposto diversamente ai cambiamenti climatici del passato. In secondo luogo, si tratta per lo più di studi basati su singole specie (ma vedi Waltari et al., 2007), e le conclusioni che vengono fatte sul ruolo evolutivo dei rifugi glaciali nella formazione dei pattern di diversità o sull'impatto che i cambiamenti climatici del passato possono aver avuto sulle specie hanno dunque valenza limitata. Questo studio, al contrario, rappresenta il primo studio multi-taxon che ricostruisce le aree di rifugio glaciale considerando i pattern geografici di diversità intraspecifica.

L'ipotesi che la penisola italiana fosse un unico rifugio non è supportata dai nostri dati. Al contrario, uno scenario decisamente più complesso emerge sia a livello di singole linee evolutive, sia a livello globale. Infatti, il primo pattern che emerge dal nostro studio è la presenza di rifugi multipli, ciascuno di ridotta estensione. Questo pattern concorda con lo scenario conosciuto con il nome di "refugia-within-refugia" evidenziato dall'approccio filogeografico in molte specie di vertebrati, invertebrati e piante all'interno delle penisole Europee meridionali, inclusa l'Italia (Canestrelli et al., 2006a, 2007, 2010, 2012a; Gómez & Lunt, 2006; Magri et al., 2006). Tuttavia, è la prima volta che emerge in maniera così marcata utilizzando strumenti appartenenti alla modellistica delle specie. La concordanza tra i nostri risultati e quelli ottenuti da studi filogeografici conferma e rafforza l'idea che utilizzare un approccio modellistico per ricostruire la localizzazione dei rifugi glaciali possa essere una metodologia valida.

Un secondo pattern emergente consiste nell'aumento del numero delle aree di rifugio dal nord verso il sud della penisola. La porzione meridionale della penisola è risultata essere il rifugio più ampio per alcuni taxa (*Lissotriton italicus* taxon settentrionale, *Bufo bufo* taxon meridionale, *Talpa romana*), e l'unico per altre (*Rana italica*, *Rana lessonae*, *Testudo hermanni hermanni*). Uno studio svolto sulle condizioni climatiche del LGM nella regione del Mediterraneo ha suggerito la presenza di inverni più freddi di quelli attuali di 12°C, ma anche la

presenza di estati più fredde fino a c. -5°C (Wu et al., 2007). Inoltre, sempre lo stesso studio ha suggerito come, nonostante la regione del Mediterraneo risultasse più stabile climaticamente rispetto ad aree a latitudini maggiori, anche all'interno della regione stessa fossero presenti differenze climatiche alle diverse latitudini. La nostra identificazione della gran parte dei rifugi nella porzione meridionale della penisola confermerebbe la presenza in questa area di condizioni climatiche più favorevoli ai taxa temperati. Come anche le analisi MESS confermano, le latitudini più basse della penisola italiana risultavano essere le più simili climaticamente alle condizioni odierne, il che fornisce una prova a supporto di una maggiore idoneità della regione meridionale alla formazione di aree rifugio. A conferma di quanto discusso, è bene notare come gli unici taxa con rifugi nella porzione settentrionale della penisola siano quelli che attualmente hanno una distribuzione limitata a quell'area (*Triturus carnifex* taxon settentrionale and *Hyla perrini*) e che di conseguenza sembrerebbero aver evoluto una nicchia climatica differente rispetto ai taxa distribuite nella porzione centro-meridionale.

Di particolare interesse risulta l'identificazione della maggior parte dei rifugi lungo le coste della penisola, fatta eccezione per due taxa di anfibi con distribuzione esclusivamente settentrionale, e due taxa di mammiferi legati prevalentemente agli habitat montuosi (*Myodes glareolus* e *Sciurus meridionalis*). Va sottolineato che rifugi pleistocenici in area costiera sono stati identificati anche in specie attualmente legate ad habitat montani o semi-montani come *Bombina pachypus*, *Salamandra salamandra gigliolii*, *Salamandrina perspicillata* e *Salamandrina terdigitata*. Rifugi in aree a basse altitudini, in siti localmente umidi e riscaldati come le coste, erano stati descritti per alcune specie vegetali (Médail & Diadema, 2009), ma per specie di vertebrati Europei non è frequente (ma vedi Bisconti et al, 2011). Tuttavia, Shafer e colleghi (2010) in una revisione esaustiva della letteratura sui rifugi glaciali del Nord America, hanno riportato la descrizione di rifugi costieri per varie piante, invertebrati e vertebrati, supportati da dati fossili e genetici. Al contrario, un supporto da dati fossili manca per la nostra area di studio, e non potrebbe essere altrimenti considerato che i presunti rifugi si trovano attualmente sotto il livello del mare, innalzatosi a seguito dello scioglimento dei ghiacci. Manca dunque la possibilità di ritrovare e analizzare DNA antico proveniente da materiali fossili, ma possiamo supporre che le popolazioni più simili a queste ancestrali siano le popolazioni che vivono sulle coste, incluse quelle delle piccole isole costiere. Tuttavia, per la maggior parte delle specie, gli schemi di campionamento per studi filogeografici si sono concentrati nell'area centrale della loro distribuzione, la quale si trova spesso nelle aree più interne della penisola italiana e non lungo la costa. Questo potrebbe aver portato ad una sottorappresentazione generale delle

popolazioni costiere negli studi filogeografici, e dunque all'impossibilità di verificare l'esistenza di tracce genetiche di paleodistribuzioni costiere.

Infine, applicando un approccio integrato e multi-taxon siamo stati in grado di identificare una parziale sovrapposizione tra i rifugi di al massimo 8 linee evolutive in due aree specifiche: la penisola calabra e quella salentina. Entrambi i rifugi multi-taxon condividono i pattern spaziali descritti precedentemente. L'area calabra era già stata identificata come area di rifugi glaciali da precedenti studi filogeografici sulle stesse specie studiate (ad es. Canestrelli et al., 2010). Tuttavia, il dettaglio geografico raggiunto in questo studio risulta maggiore. Il rifugio salentino al contrario non era stato precedentemente individuato, probabilmente per via della scarsità di campioni genetici provenienti da questa zona. Purtroppo, non possiamo quindi confermare la presenza del rifugio con dati filogeografici, e i nostri risultati vanno dunque considerati con cautela. Le popolazioni del rifugio salentino potrebbero essersi ridotte a relitti isolati ed essersi estinte durante l'Olocene. Questo scenario potrebbe spiegare l'assenza attuale in Salento di alcuni dei taxa il cui rifugio è stato identificato in quell'area. Si rendono dunque necessari ulteriori studi per ottenere un disegno più realistico sulla storia evolutiva dei diversi taxa nell'area del Salento.

Nonostante le diverse precauzioni che abbiamo preso riguardo l'errore sistematico di campionamento (de Oliveira et al., 2014), l'utilizzo di algoritmi singoli (Heikkinen et al., 2012) e l'uso di un singolo GCM per le proiezioni nel passato (Buisson et al., 2010), nelle analisi rimangono alcuni problemi metodologici aperti. Il più importante riguarda il fatto che i modelli si basano esclusivamente su variabili bioclimatiche, mentre le interazioni biotiche quali ad esempio la competizione e la predazione, non vengono considerate. Sebbene esistano studi che dimostrano come l'integrazione di variabili biotiche migliorino la performance dei modelli (Zimmermann et al., 2010) ed alterano i risultati sulle proiezioni future (Bateman et al., 2012; Hof et al., 2012), per le proiezioni passate non esistono attualmente applicazioni.

Per concludere, i pattern spaziali qui descritti potrebbero aiutare ad interpretare meglio il ruolo evolutivo dei rifugi glaciali nella formazione dei pattern spaziali di diversità genetica e di diversità di specie. La stabilità a lungo termine delle popolazioni è da sempre considerata come il processo evolutivo che giustifica maggiormente la coincidenza tra i rifugi glaciali e alti livelli di diversità genetica (Petit et al., 2003; Carnaval et al., 2009; Abellán & Svenning, 2014). I nostri dati chiaramente non supportano questa ipotesi, dal momento che le coste del passato non possono essere considerate delle aree di stabilità a causa delle ripetute inondazioni avvenute durante il Pleistocene, e della loro scomparsa in seguito all'innalzamento del mare dopo il LGM. Tuttavia, i pattern spaziali osservati potrebbero essere giustificati se consideriamo il flusso

genico come promotore principale della diversità intraspecifica, a seguito dei ripetuti contatti secondari tra i taxa divergenti rimasti isolati nei rifugi durante i periodi inter e post-glaciali (Gonçalves et al., 2009; Canestrelli et al., 2010, 2012a). I nostri risultati supportano fortemente questa seconda ipotesi, facendo coincidere i rifugi multi-taxon con le aree maggiormente affette da continui cambiamenti geografici, proprio come le passate linee di costa.

Il nostro studio fornisce un solido framework per la ricostruzione dei rifugi glaciali, sottolineando l'efficacia di combinare i modelli di distribuzione delle specie con dati di diversità genetica intraspecifica al fine di ricostruire la corretta posizione dei rifugi glaciali durante il LGM. Alla luce dei risultati ottenuti, i quali offrono nuovi scenari e nuove ipotesi sia sulla reale distribuzione dei rifugi, ma anche sul loro ruolo evolutivo per la formazione dei pattern di diversità genetica, sarebbe auspicabile l'applicazione del framework proposto anche su aree di studio che, così come la penisola italiana, hanno avuto ruoli di rifugio in Europa durante le oscillazioni climatiche del Quaternario.

Inoltre, suggeriamo che la ricostruzione dei rifugi glaciali tramite dati filogeografici debba sempre essere combinata con quella tramite gli SDMs, poiché il nostro studio dimostra come un campionamento più completo dell'areale di una specie possa fornire risultati differenti. Inoltre, le mappe prodotte dagli SDMs potrebbero fornire un ottimo supporto alla pianificazione di campionamenti genetici focalizzati nel capire i processi evolutivi alla base della nascita della distribuzione della diversità genetica e di specie. Tutto questo risulta di particolare rilevanza poiché i continui cambiamenti climatici stanno alterando rapidamente le condizioni ambientali, con notevole impatto sulla distribuzione delle specie e della loro diversità genetica. Capire come le linee evolutive abbiano risposto e si siano adattate ai cambiamenti climatici del passato, può dunque fornire un punto di partenza per prevedere come i cambiamenti climatici attuali possano influire sulle linee evolutive nel futuro.

3.5 TABELLE E FIGURE

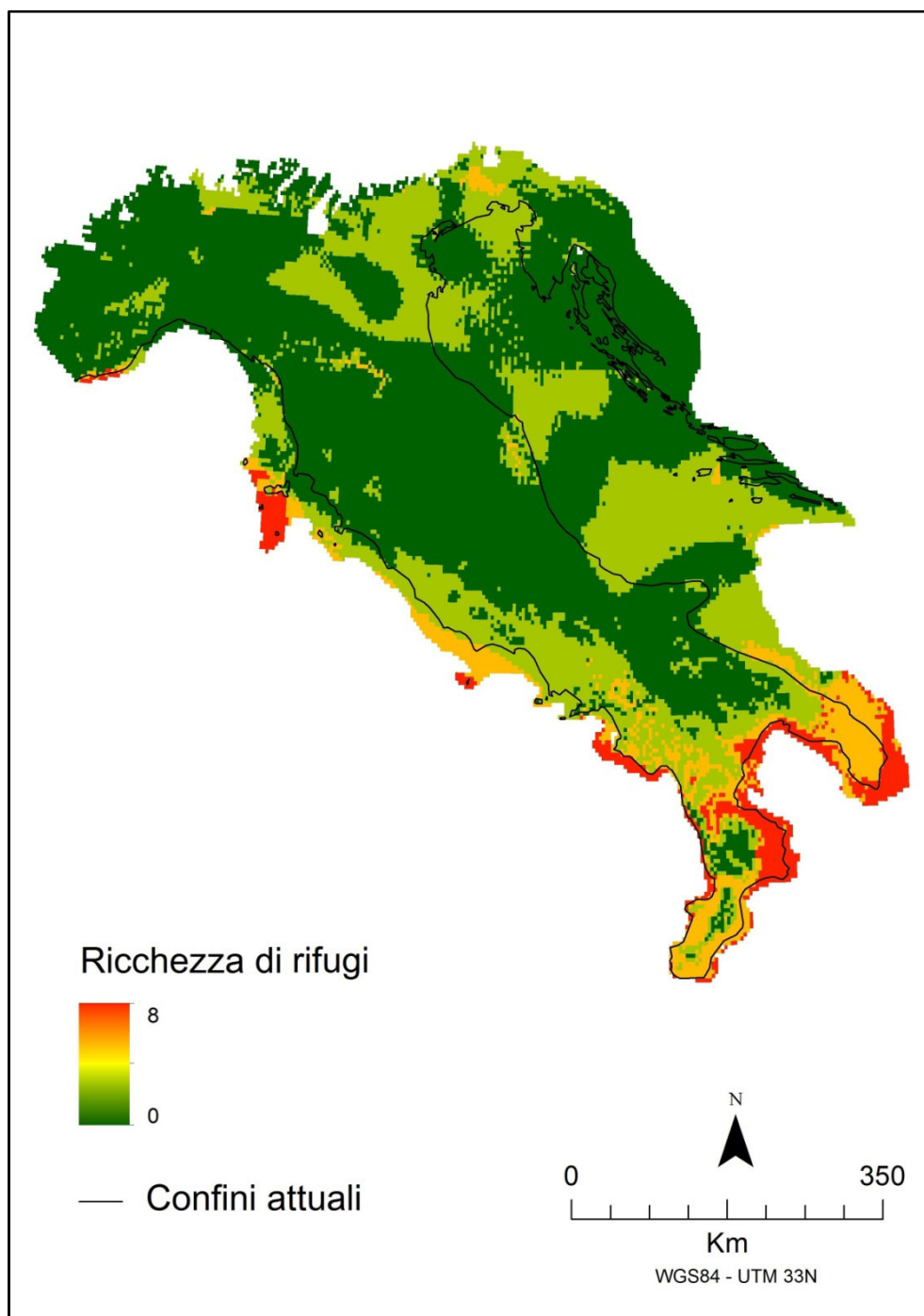
Tabella 1. Numero dei punti di presenza totali che sono stati raccolti, la distanza di filtraggio MMND (Mean Minimum Near Distance), numero di punti filtrati usati per la calibrazione e numero di punti usati per la validazione per ognuno dei taxa coinvolti nel nostro studio. La letteratura di riferimento riporta lo studio filogeografico tramite il quale sono stati identificati i taxa. N = settentrionale; S = meridionale.

	Classe	Taxon	Letteratura di riferimento	Punti totali	MMND (m)	Punti di calibrazione	Punti di validazione
1	Amphibia	<i>Salamandra salamandra gigliolii</i>	Steinfartz et al. (2000)	258	13.186	111	147
2		<i>Salamandrina perspicillata</i>	Canestrelli et al. (2006b)	222	9.621	132	90
3		<i>Salamandrina terdigitata</i>	Canestrelli et al. (2006b)	89	8.076	42	47
4		<i>Lissotriton italicus</i> N	Canestrelli et al. (2012a)	83	17.167	49	34
5		<i>Lissotriton italicus</i> S	Canestrelli et al. (2012a)	36	10.739	21	15
6		<i>Lissotriton vulgaris meridionalis</i>	Maura et al. (2014)	374	10.874	250	124
7		<i>Triturus carnifex</i> N	Canestrelli et al. (2012b)	245	10.97	166	79
8		<i>Triturus carnifex</i> S	Canestrelli et al. (2012b)	299	10.958	184	115
9		<i>Bombina pachypus</i>	Canestrelli et al. (2006b)	352	11.277	182	170
10		<i>Bufo bufo</i> N	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	540	5.97	369	171
		<i>Bufo bufo</i> S peninsulare	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	210	9.589	135	75
11		<i>Bufo bufo</i> S in Sicilia	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	35	15.064	19	16
12		<i>Hyla perrini</i>	Dufresnes et al. (2018)	364	7.961	250	114
13		<i>Hyla intermedia</i> peninsulare	Canestrelli et al. (2007)	313	10.954	213	100
		<i>Hyla intermedia</i> in Sicilia	Canestrelli et al. (2007)	18	20.003	8	10
14		<i>Pelophylax lessonae</i>	Canestrelli et al. (2008a)	576	8.347	407	169
15		<i>Rana dalmatina</i> S	Canestrelli et al. (2014)	146	10.106	71	75
16		<i>Rana italica</i>	Canestrelli et al. (2008b)	442	9.311	257	185
17	Reptilia	<i>Testudo hermanni hermanni</i>	Zampiglia et al. (<i>in prep</i>)	173	14.037	91	82
18		<i>Podarcis muralis</i> S	Salvi et al. (2013)	64	14.62	34	30
19		<i>Podarcis siculus</i> S peninsulare	Senczuk et al. (2017)	594	8.099	371	223
		<i>Podarcis siculus</i> S in Sicilia	Senczuk et al. (2017)	92	8.926	61	31
20	Mammalia	<i>Talpa romana</i>	Canestrelli et al. (2010)	116	17.72	53	63
21		<i>Sciurus meridionalis</i>	Wauters et al. (2017)	154	7.261	43	111
22		<i>Myodes glareolus</i> S	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	61	8.173	24	37

Tabella 2. Percentuale dell'area di proiezione occupata (APO) da ognuna delle classi presente nella mappa di ricchezza di rifugi. La ricchezza corrisponde al numero di taxa presenti in quell'area.

Taxon (N)	APO (%)
0	59.81
1	29.46
2	6.77
3	2.33
4	0.96
5	0.46
6	0.16
7	0.03
8	0.01

Figura1. Distribuzione dei rifugi multi-taxon durante il LGM in Italia peninsulare. La ricchezza dei rifugi è stata calcolata come la somma dei rifugi delle singole linee. Il rosso delinea i rifugi con il più alto numero di taxa, mentre il verde scuro le aree di non rifugio. L'area di proiezione corrisponde all'Italia peninsulare del passato, definita dal ghiacciaio alpino a Nord, dal Mar Mediterraneo ad Ovest e a Sud, e dalle montagne Balcaniche a Est.



MATERIALE SUPPLEMENTARE

Tabella S1. Variabili climatiche utilizzate per la calibrazione dei modelli. Le differenti combinazioni di aree di calibrazione e punti di calibrazione hanno prodotto quattro set differenti di variabili climatiche. Un set è per i taxa di anfibi e rettili che hanno come area di calibrazione o l'Italia peninsulare o l'Italia peninsulare e la Sicilia e che hanno come punti di background le presenze TG (A); un set è per *Bufo bufo* taxon meridionale per la quale abbiamo escluso la porzione settentrionale della penisola dall'area di calibrazione e che ha come punti di background le presenze TG (B); un set è per i taxa che hanno l'area di calibrazione ristretta all'Italia meridionale e che hanno come punti di background 4000 punti distribuiti casualmente (C); e un set è per i taxa di mammiferi che hanno l'Italia peninsulare come area di calibrazione e che hanno come punti di background le presenze TG (D).

Variabile	A	B	C	D
Temperatura media annua	X			X
Range della temperatura medio diurno	X	X	X	
Isotermalità				X
Stagionalità della temperatura	X	X	X	X
Temperatura media del quarto più umido	X	X	X	X
Temperatura media del quarto più secco	X	X		
Precipitazione del mese più umido	X		X	X
Precipitazione del mese più secco			X	
Stagionalità della precipitazione	X			X
Precipitazione del quarto più umido		X	X	
Precipitazione del quarto più freddo		X		X

Tabella S2. Media e deviazione standard (d.s.) dei valori di AUC calcolati durante la validazione dei modelli per ognuno degli algoritmi modellistici considerati.: generalized linear model (GLM), generalized additive model (GAM), generalized boosted model (GBM), multivariate adaptive regression spline (MARS), e maximum entropy (MAXENT). N = settentrionale; S = meridionale.

Taxon	Algoritmo modellistico									
	GLM		GBM		GAM		MARS		MAXENT	
	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.
<i>Salamandra salamandra gigliolii</i>	0.83	0.01	0.91	0.00	0.87	0.01	0.85	0.01	0.87	0.01
<i>Salamandrina perspicillata</i>	0.81	0.00	0.89	0.00	0.88	0.00	0.84	0.01	0.86	0.00
<i>Salamandrina terdigitata</i>	0.95	0.00	0.98	0.00	0.98	0.00	0.96	0.00	0.96	0.00
<i>Lissotriton italicus</i> N	0.77	0.05	0.96	0.00	0.90	0.00	0.72	0.05	0.84	0.00
<i>Lissotriton italicus</i> S	0.89	0.01	0.99	0.00	0.98	0.01	0.91	0.07	0.91	0.01
<i>Lissotriton vulgaris meridionalis</i>	0.67	0.00	0.81	0.00	0.74	0.00	0.71	0.00	0.74	0.00
<i>Triturus carnifex</i> N	0.82	0.00	0.89	0.00	0.86	0.00	0.82	0.05	0.86	0.01
<i>Triturus carnifex</i> S	0.77	0.00	0.87	0.00	0.83	0.00	0.80	0.00	0.83	0.00
<i>Bombina pachypus</i>	0.76	0.00	0.86	0.00	0.81	0.00	0.79	0.00	0.80	0.00
<i>Bufo bufo</i> N	0.75	0.00	0.83	0.00	0.80	0.00	0.77	0.00	0.80	0.00
<i>Bufo bufo</i> S	0.76	0.00	0.89	0.00	0.80	0.00	0.78	0.00	0.81	0.00
<i>Hyla perrini</i>	0.88	0.00	0.91	0.00	0.90	0.00	0.89	0.00	0.90	0.00
<i>Hyla intermedia</i>	0.72	0.00	0.85	0.00	0.79	0.01	0.77	0.01	0.79	0.00
<i>Pelophylax lessonae</i>	0.76	0.00	0.83	0.00	0.80	0.00	0.78	0.00	0.80	0.00
<i>Rana dalmatina</i> S	0.91	0.00	0.96	0.00	0.94	0.00	0.92	0.00	0.91	0.00
<i>Rana italica</i>	0.74	0.00	0.83	0.00	0.78	0.00	0.75	0.01	0.78	0.00
<i>Testudo hermanni hermanni</i>	0.88	0.00	0.93	0.00	0.91	0.00	0.89	0.01	0.90	0.00
<i>Podarcis muralis</i> S	0.89	0.01	0.98	0.00	0.96	0.00	0.88	0.02	0.93	0.00
<i>Podarcis siculus</i> S	0.77	0.00	0.84	0.00	0.80	0.00	0.79	0.00	0.80	0.00
<i>Talpa romana</i>	0.89	0.00	0.97	0.00	0.95	0.01	0.91	0.01	0.89	0.00
<i>Sciurus meridionalis</i>	0.94	0.00	0.98	0.00	0.97	0.00	0.96	0.01	0.95	0.00
<i>Myodes glareolus</i> S	0.92	0.02	0.99	0.00	0.98	0.00	0.90	0.03	0.94	0.00

Figura S1. Aree di calibrazione considerate per i modelli di distribuzione. L'Italia peninsulare è stata considerata come aria di calibrazione per la maggior parte dei taxa (a). Per i taxa la cui distribuzione attuale si estende anche in Sicilia, questa è stata aggiunta all'area di calibrazione (b). Per *Bufo bufo* taxon meridionale abbiamo escluso la porzione nord della penisola (c). Per i taxa la cui attuale distribuzione era limitata alla sola penisola della Calabria, abbiamo ristretto l'area di calibrazione utilizzando i fiumi Sangro e Volturno come confini settentrionali (d).

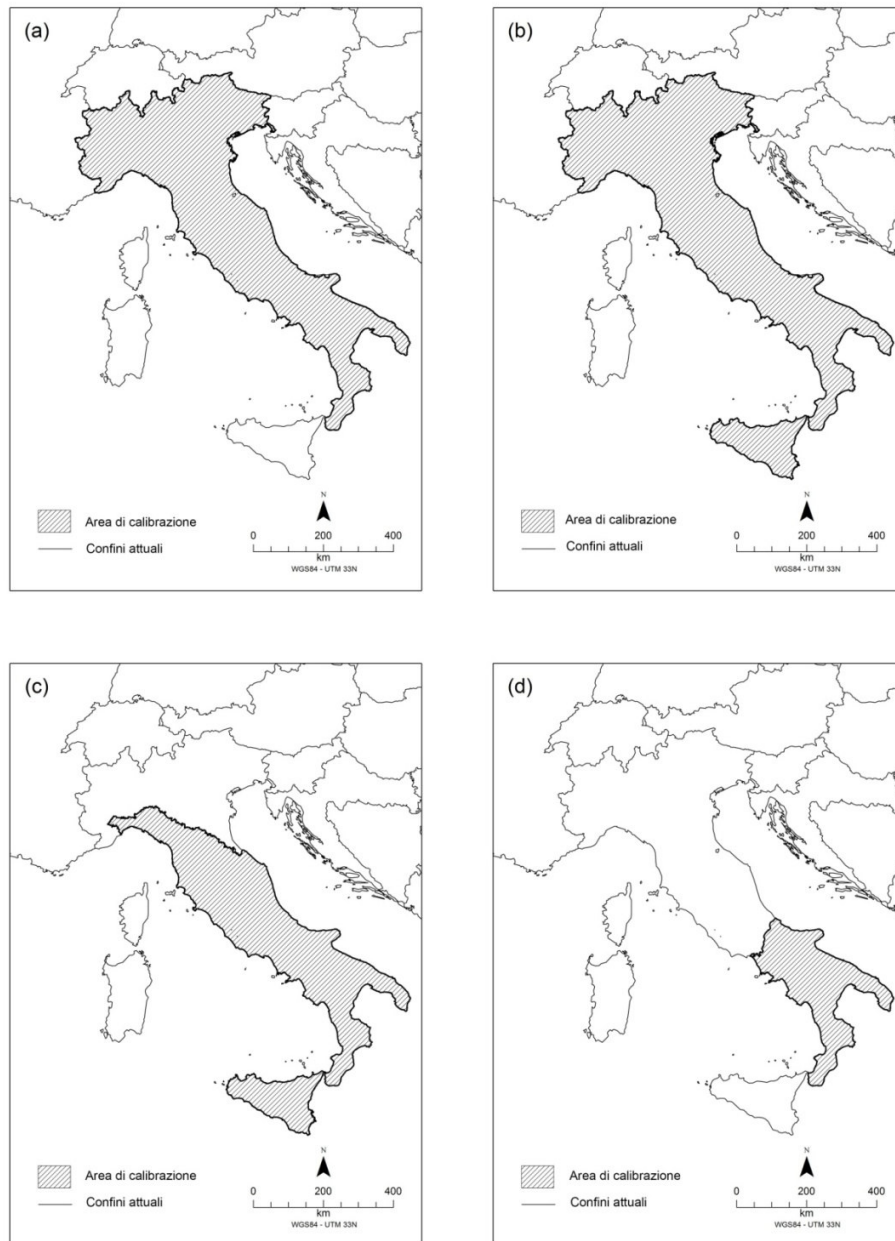


Figura S2. Punti di background ottenuti applicando l'approccio del Target Group (TG), che prevede l'utilizzo delle presenze di specie affini a quella oggetto dello studio come punti di background per la calibrazione di uno SDM. L'assunto alla base di questo approccio è che specie affini condividano simili errori sistematici di campionamento in quanto campionate spesso dagli stessi osservatori. Abbiamo collezionato punti di background per specie appartenenti alle stesse famiglie dei nostri taxa di anfibi e rettili (a) e dei nostri taxa di mammiferi (b).

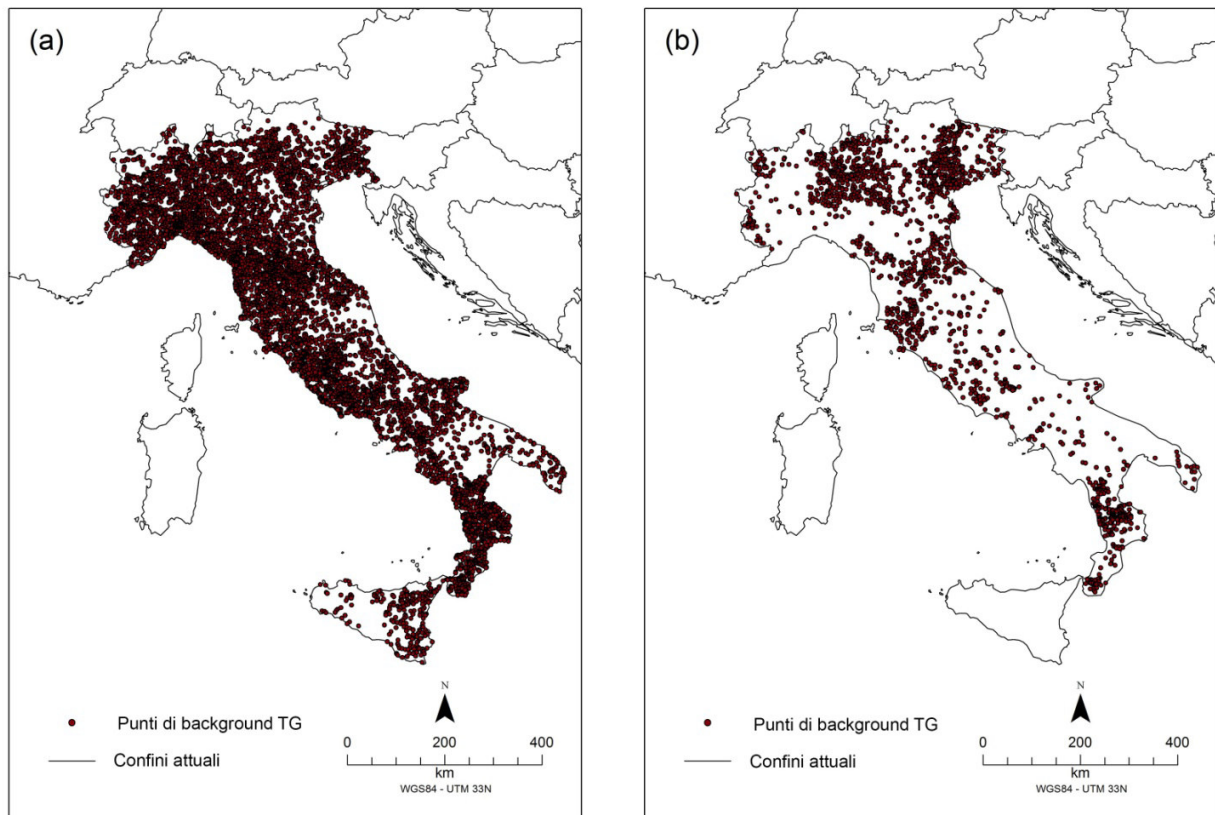


Figure S3. Confronto del clima presente e passato effettuato attraverso l'analisi multivariata della similarità ambientale di superficie (Multivariate Environmental Similarity Surface, MESS), metodo programmato in MaxEnt (per i dettagli del metodo vedi Elith et al., 2010). La similarità è stata analizzata tra i dati climatici utilizzati durante la calibrazione dei modelli e: i dati climatici del GCM CCSM4 (a, d, g, l), i dati climatici del GCM MIROC-ESM (b, e, h, m), i dati climatici del GCM MPI-ESM-P (c, f, i, n) con cui i modelli sono stati proiettati all'LGM. Le aree in rosso presentano una o più variabili climatiche con valori al di fuori del range considerato durante la calibrazione del modello, e vanno quindi considerate con precauzione. I risultati dell'analisi MESS sono presentati per i quattro diversi set di variabili risultati a seconda della combinazione di area e punti di calibrazione, ovvero: per le linee di anfibi e rettili con area e punti di calibrazione che includevano l'Italia peninsulare ma anche la Sicilia (a, b, c); per il *Bufo bufo* taxon meridionale con area e punti di calibrazione che escludono la Pianura Padana e le Alpi (d, e, f); per le linee di mammiferi con area e punti di calibrazione che includevano l'Italia peninsulare (g, h, i); e per le linee con area e punti di calibrazione ristretti all'Italia meridionale (l, m, n).

Figura S3 *continua*

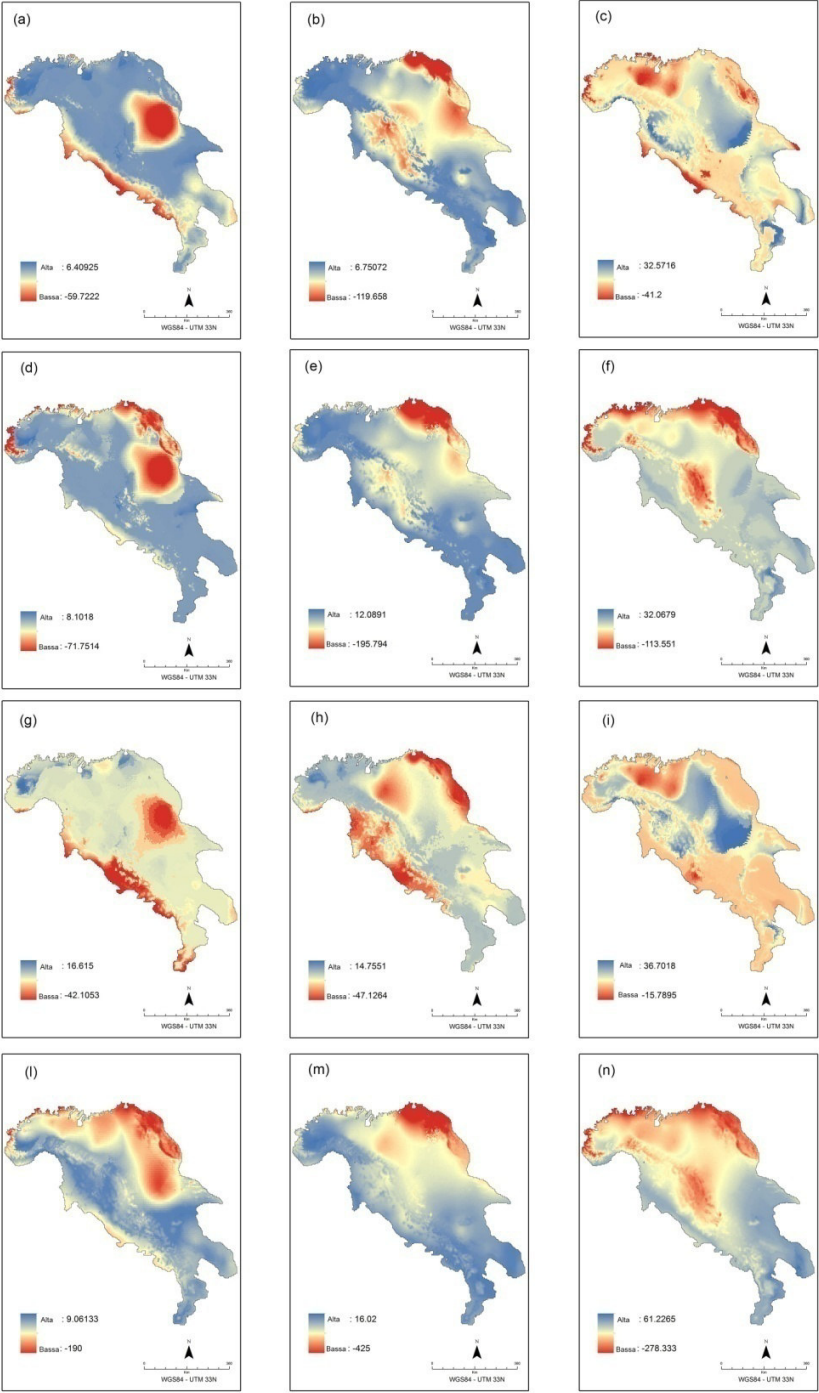


Figura S4. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Salamandra salamandra giglioli*.

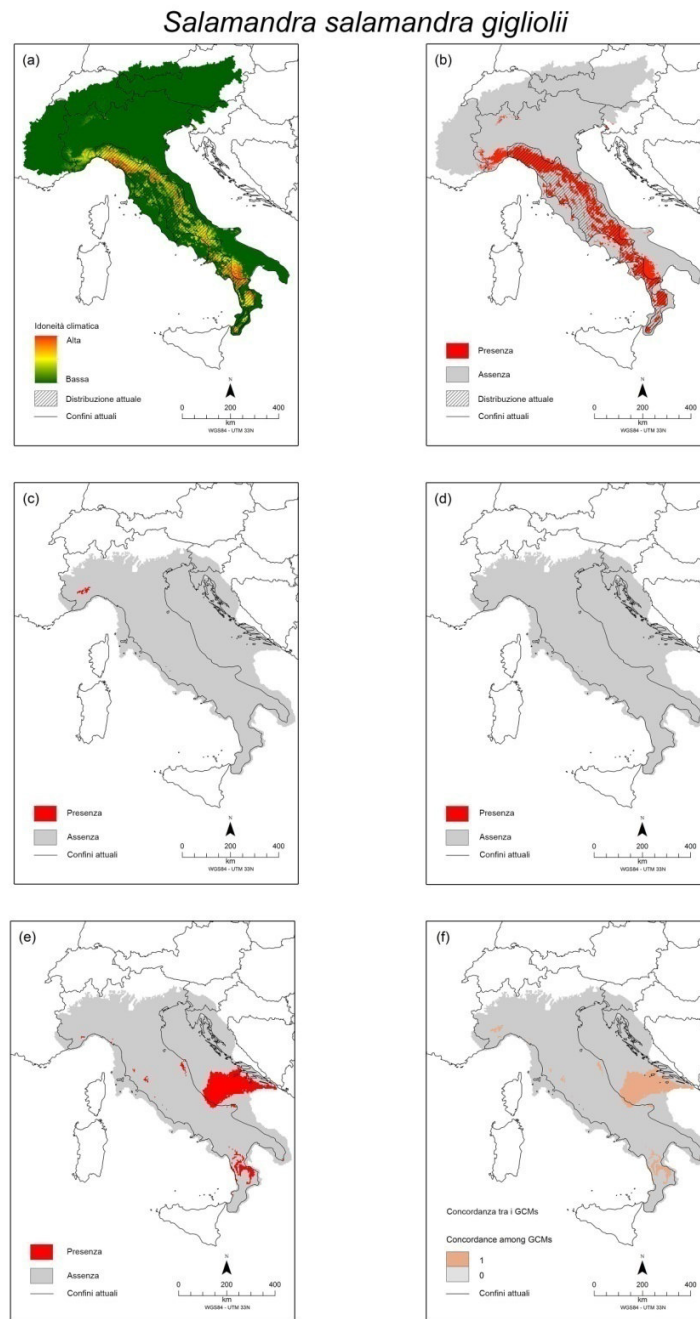


Figura S5. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Salamandrina perspicillata*.

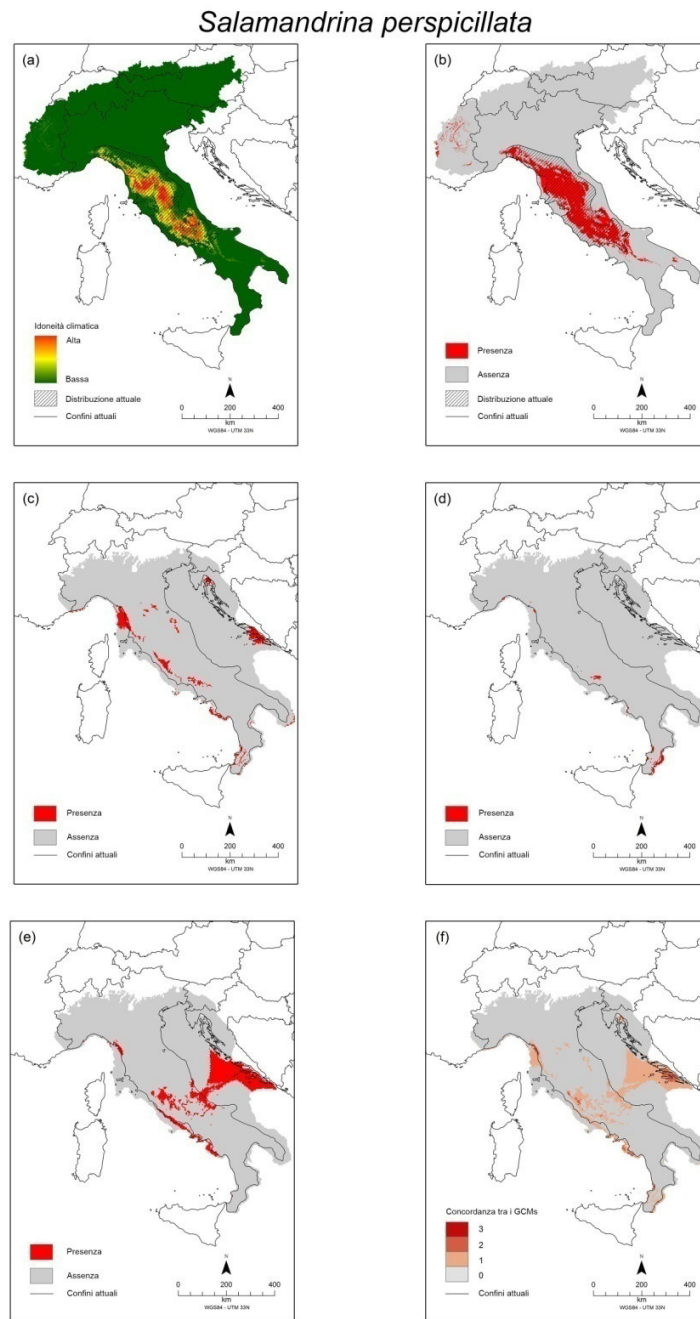


Figura S6. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Salamandrina terdigitata*.

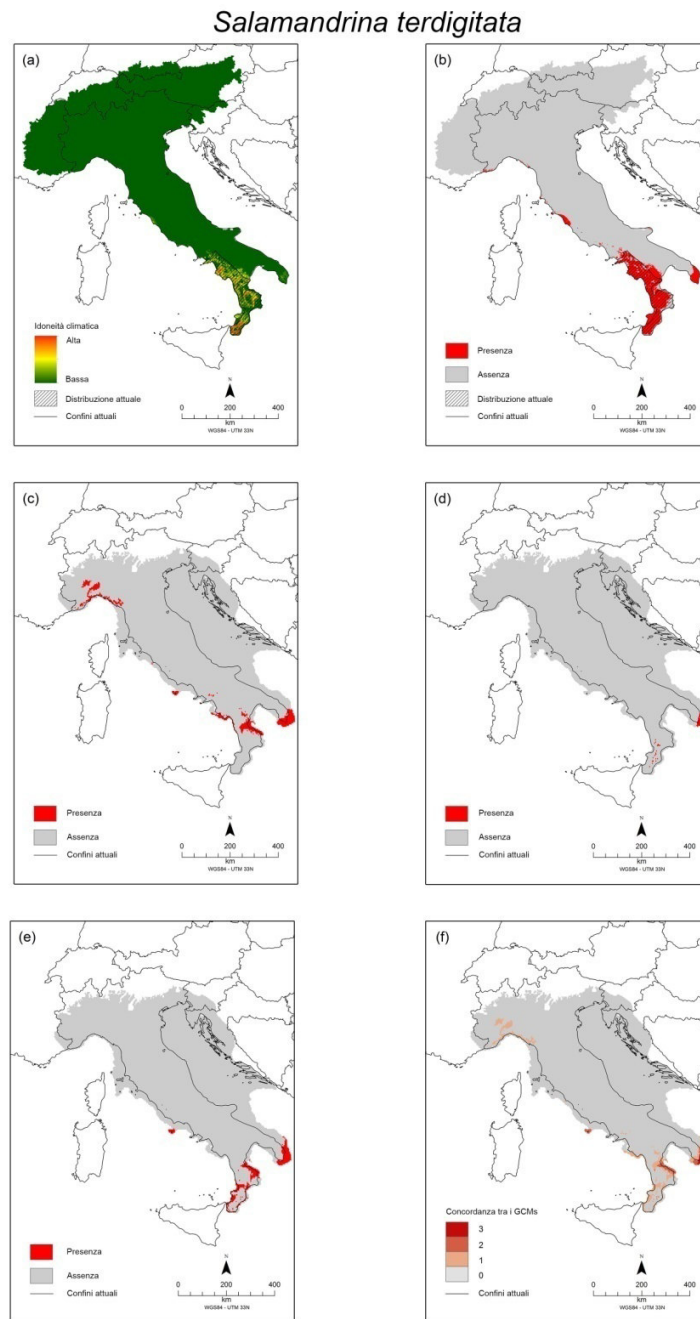


Figura S7. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Lissotriton italicus* taxon settentrionale.

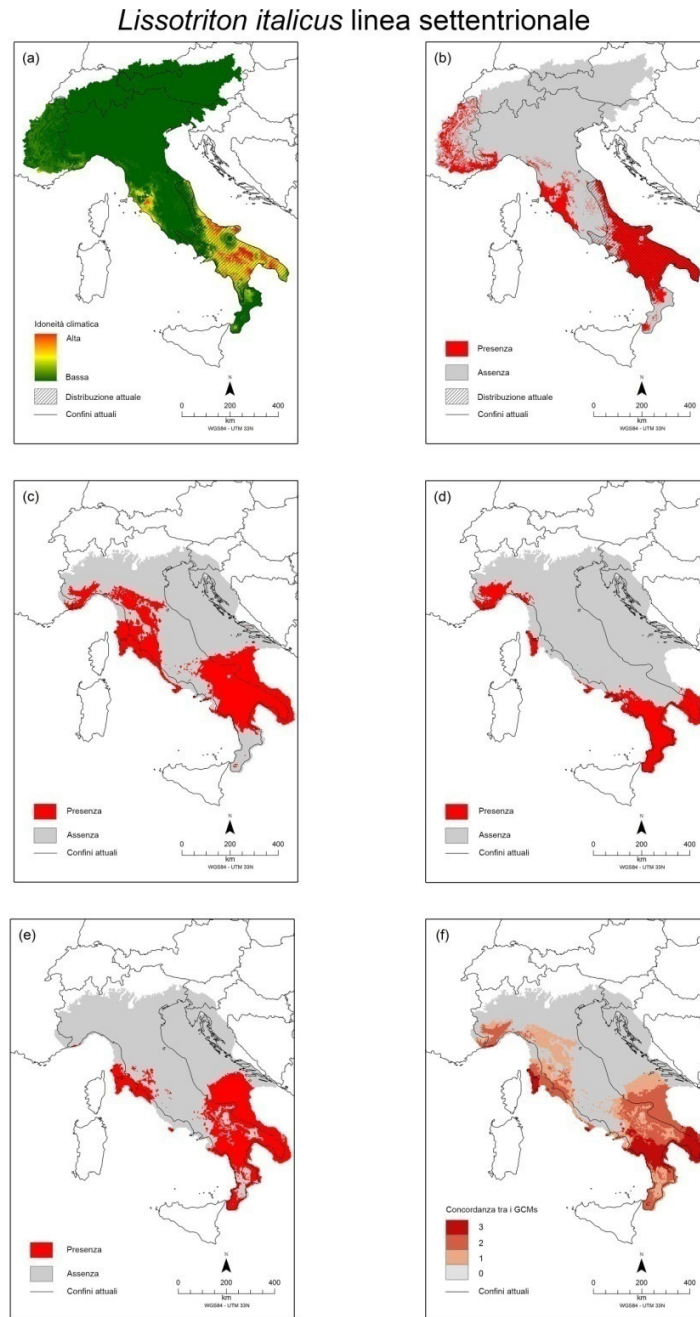


Figura S8. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Lissotriton italicus* taxon meridionale.

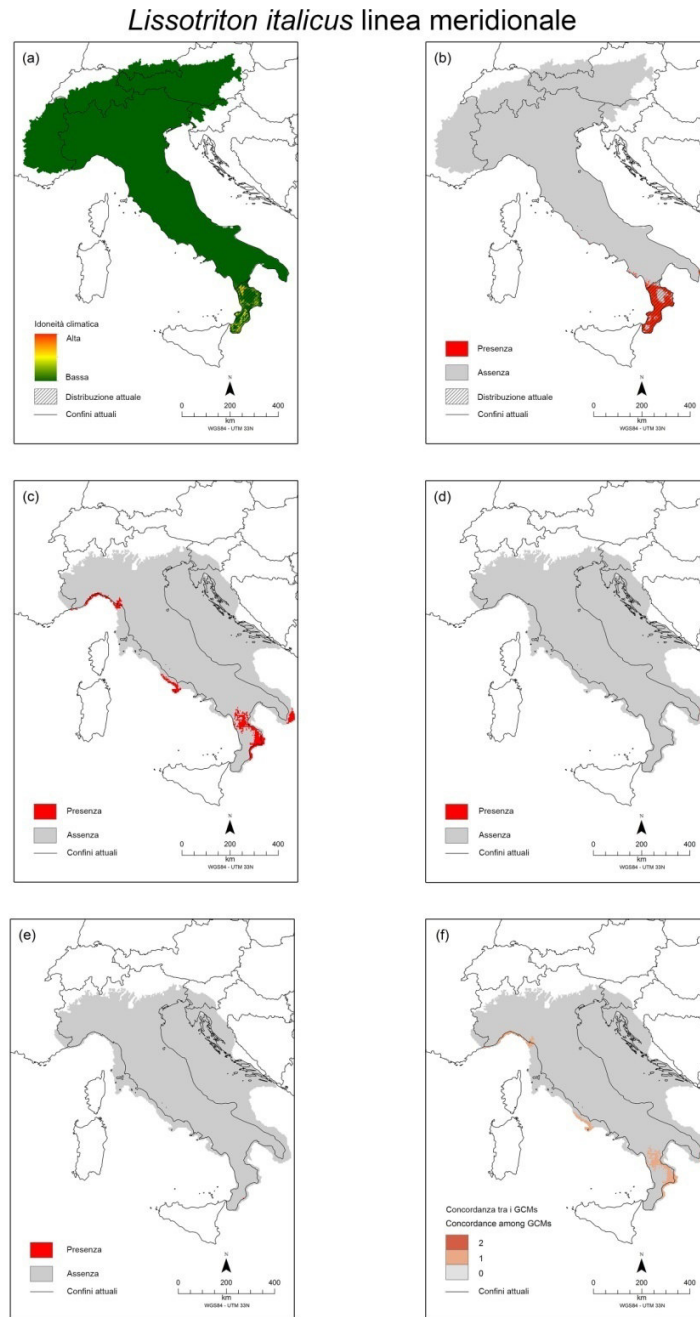


Figura S9. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Lissotriton vulgaris meridionalis*.

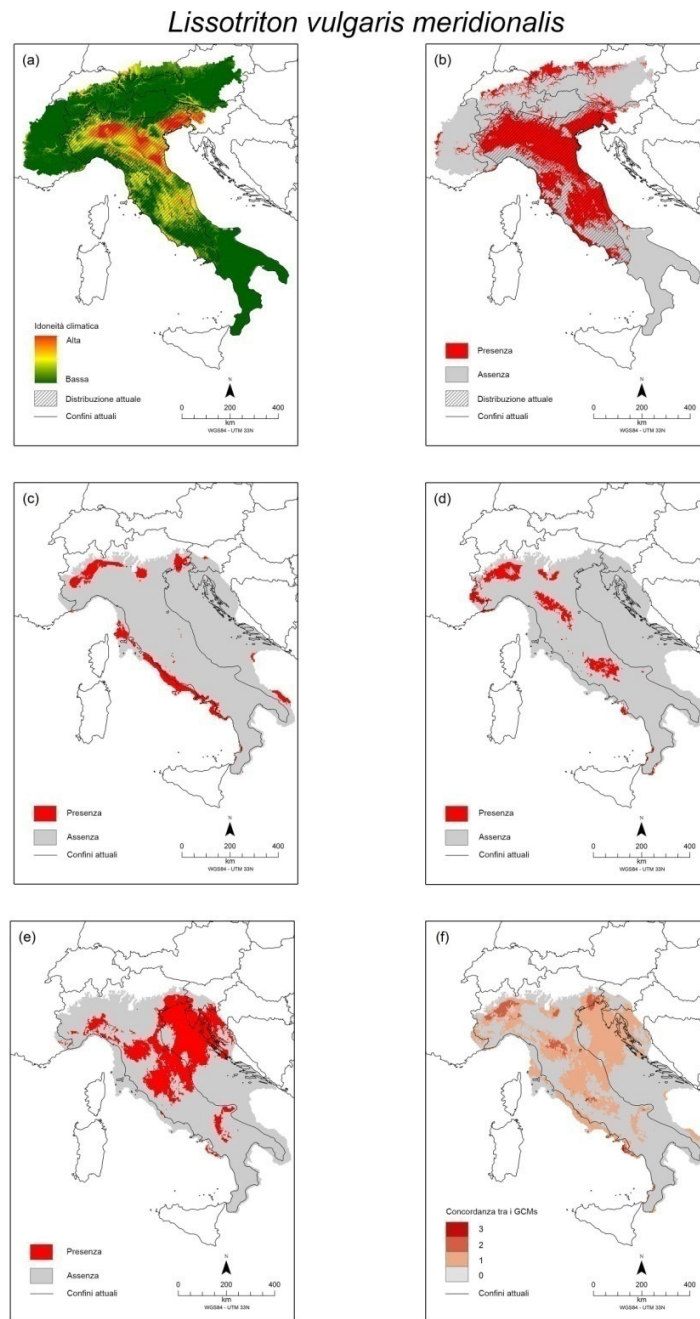


Figura S10. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Triturus carnifex* taxon settentrionale.

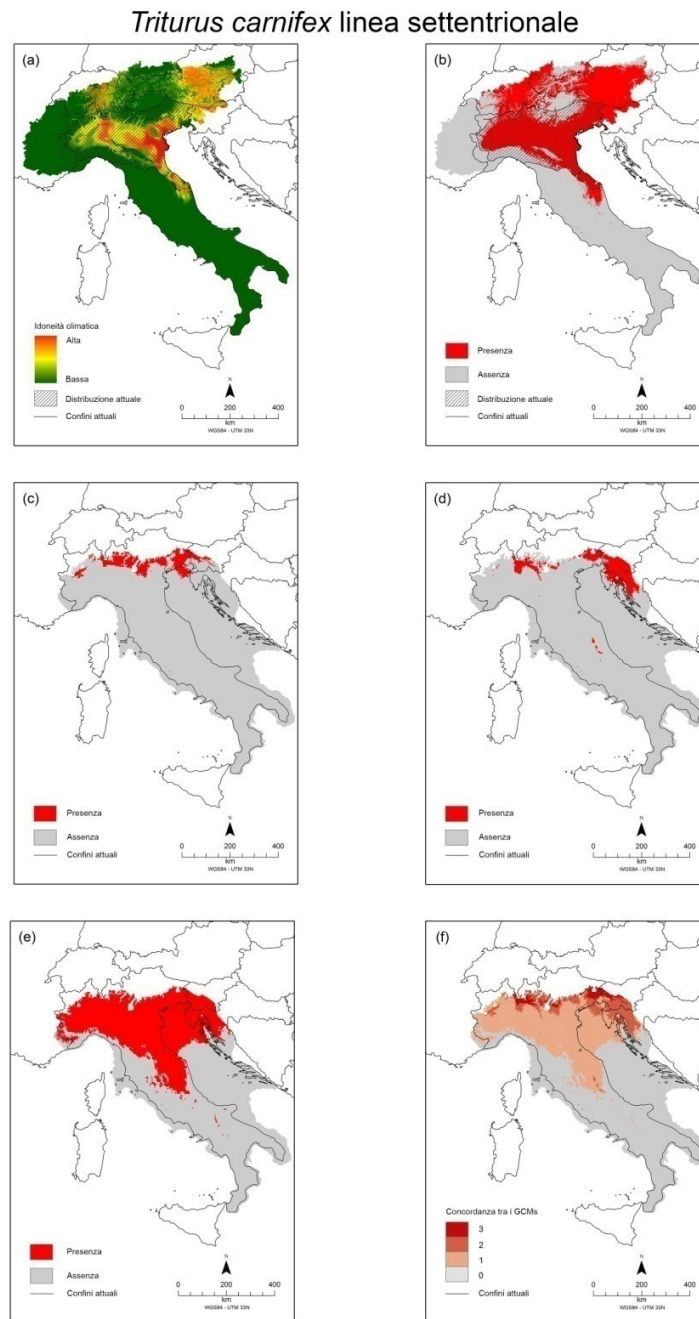


Figura S11. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Triturus carnifex* taxon meridionale.

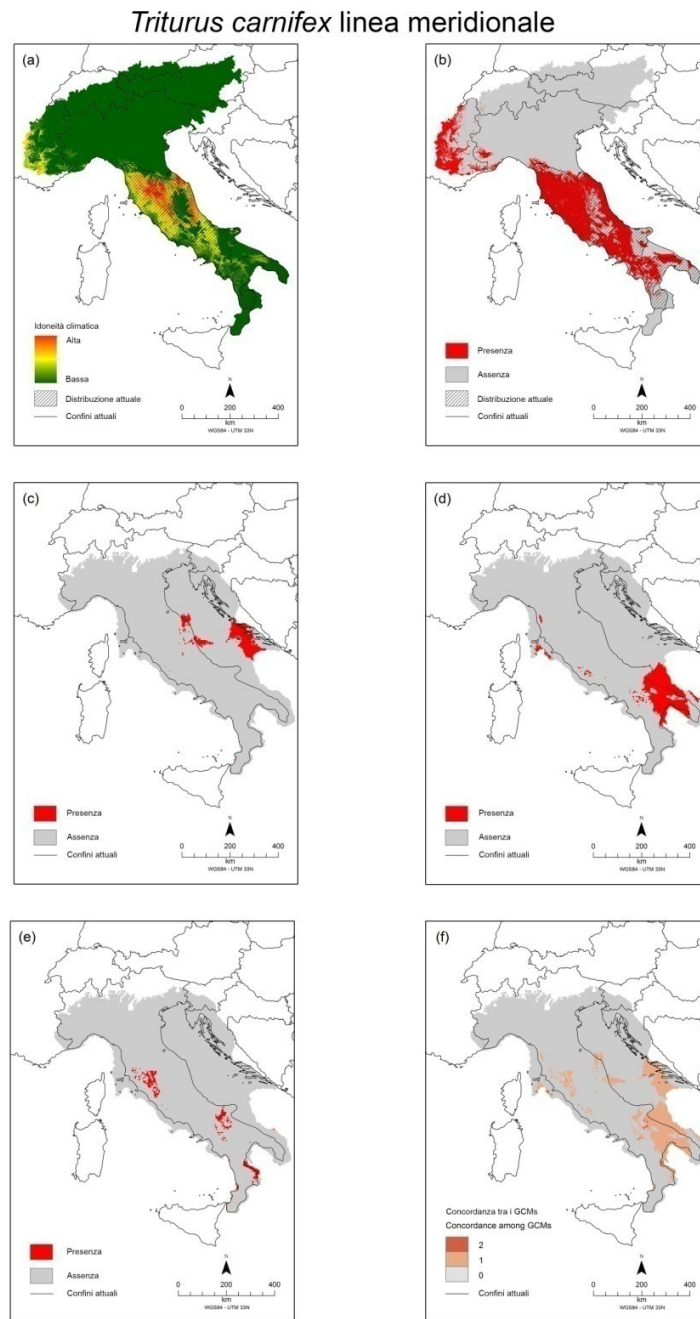


Figura S12. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Bombina pachypus*.

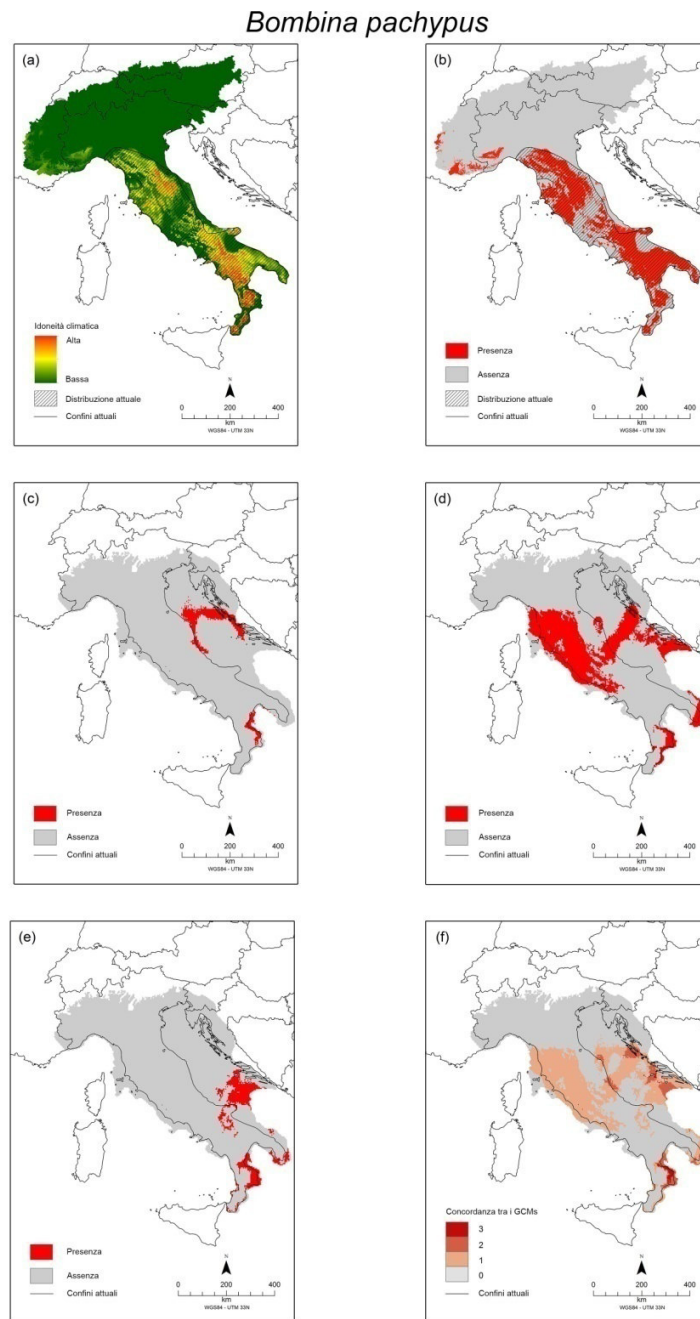


Figura S13. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Bufo bufo* taxon settentrionale.

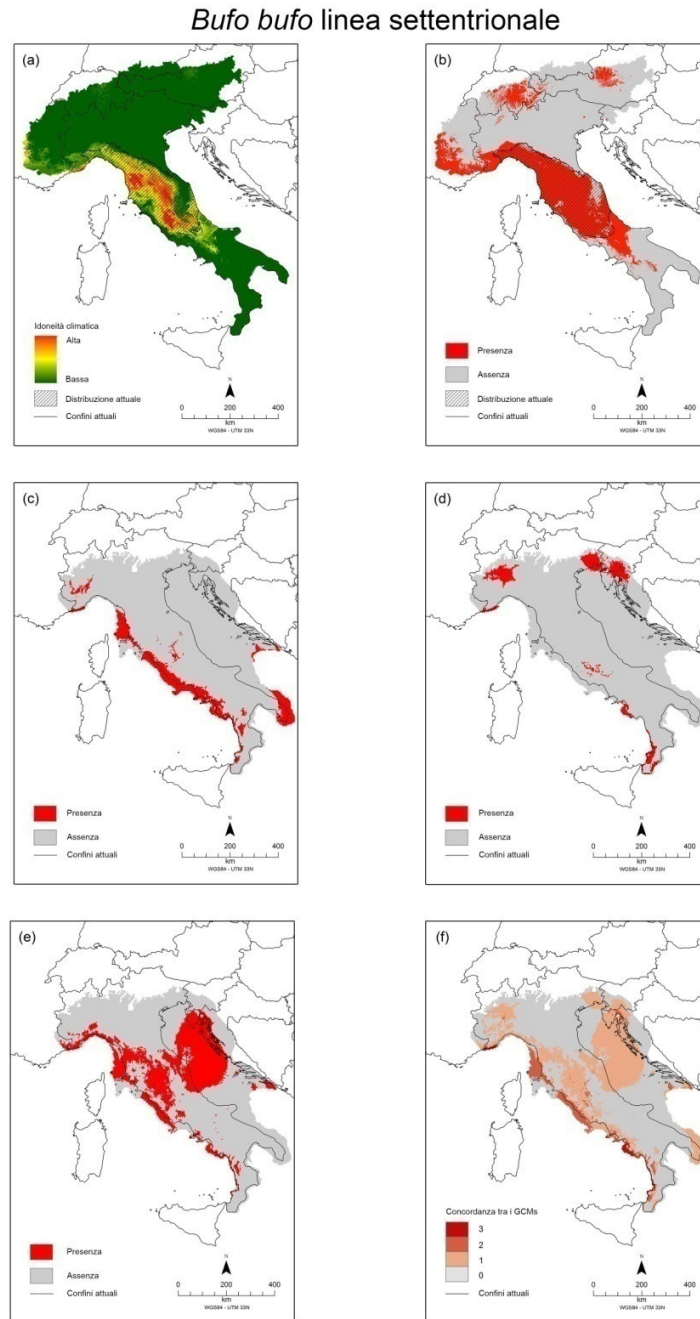


Figura S14. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Bufo bufo* taxon meridionale.

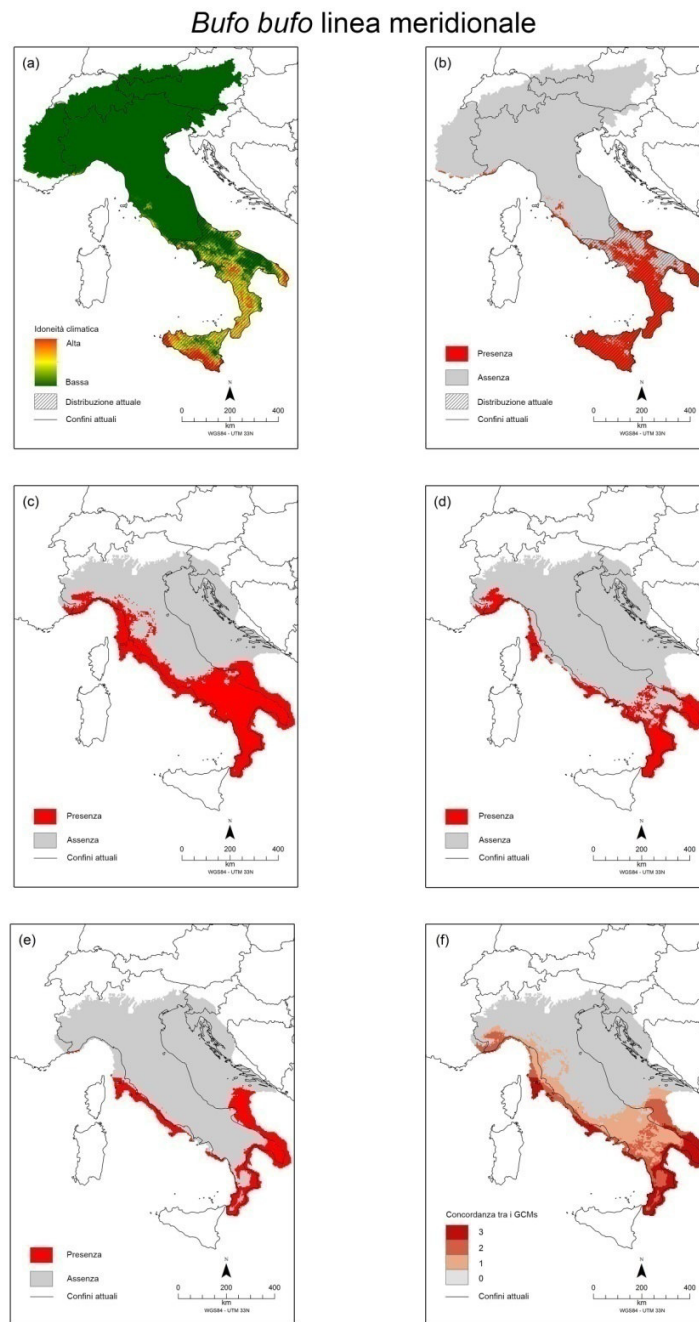


Figura S15. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Hyla perrini*.

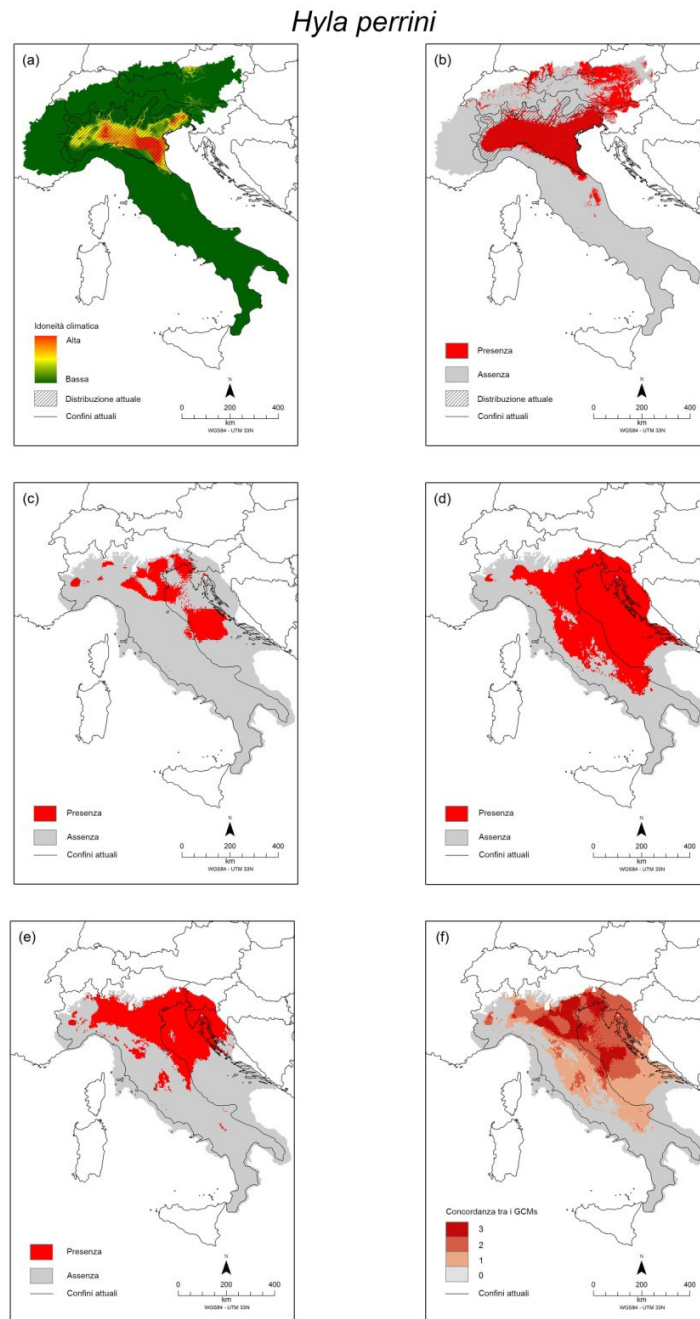


Figura S16. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Hyla intermedia*.

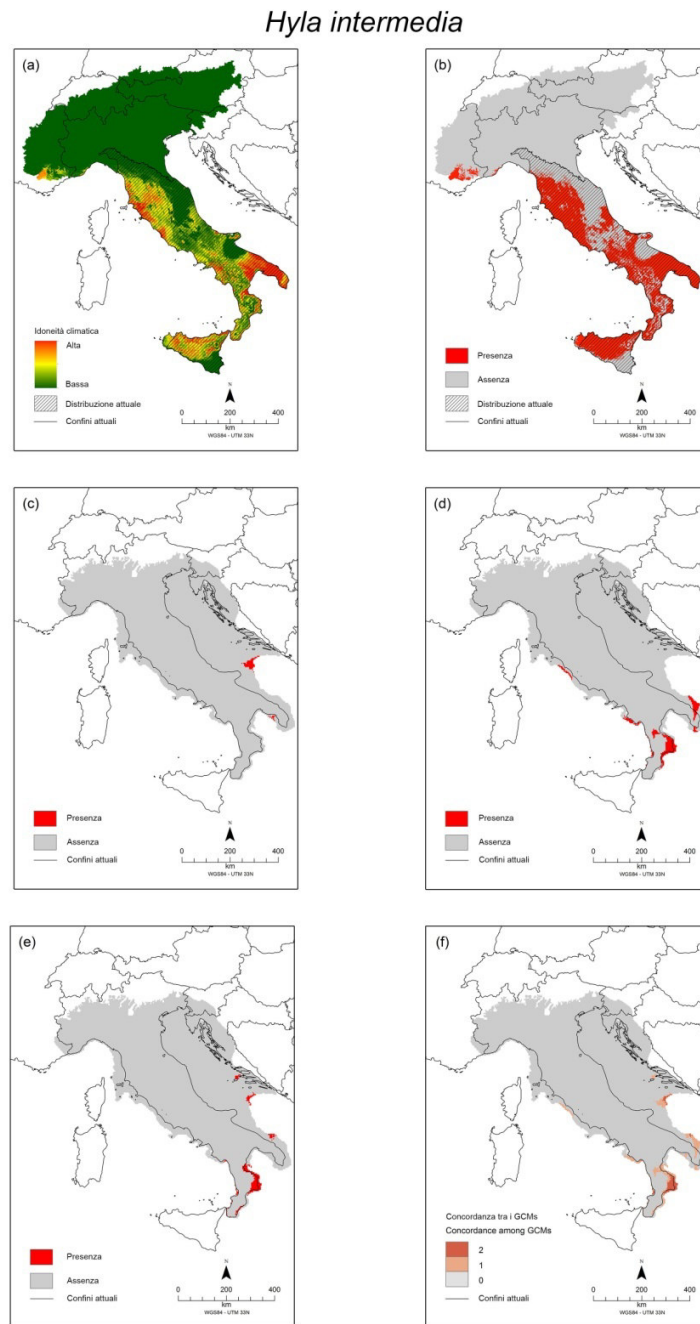


Figura S17. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Pelophylax lessonae*.

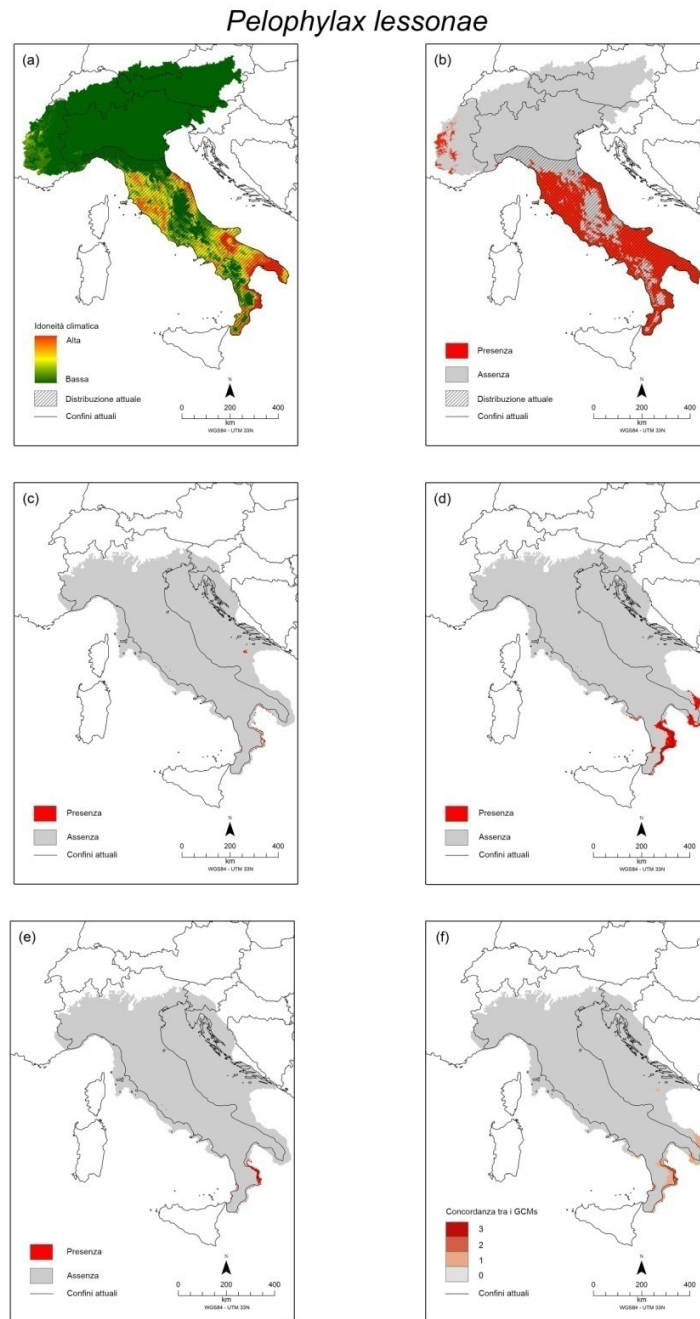


Figura S18. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Rana dalmatina* taxon meridionale.

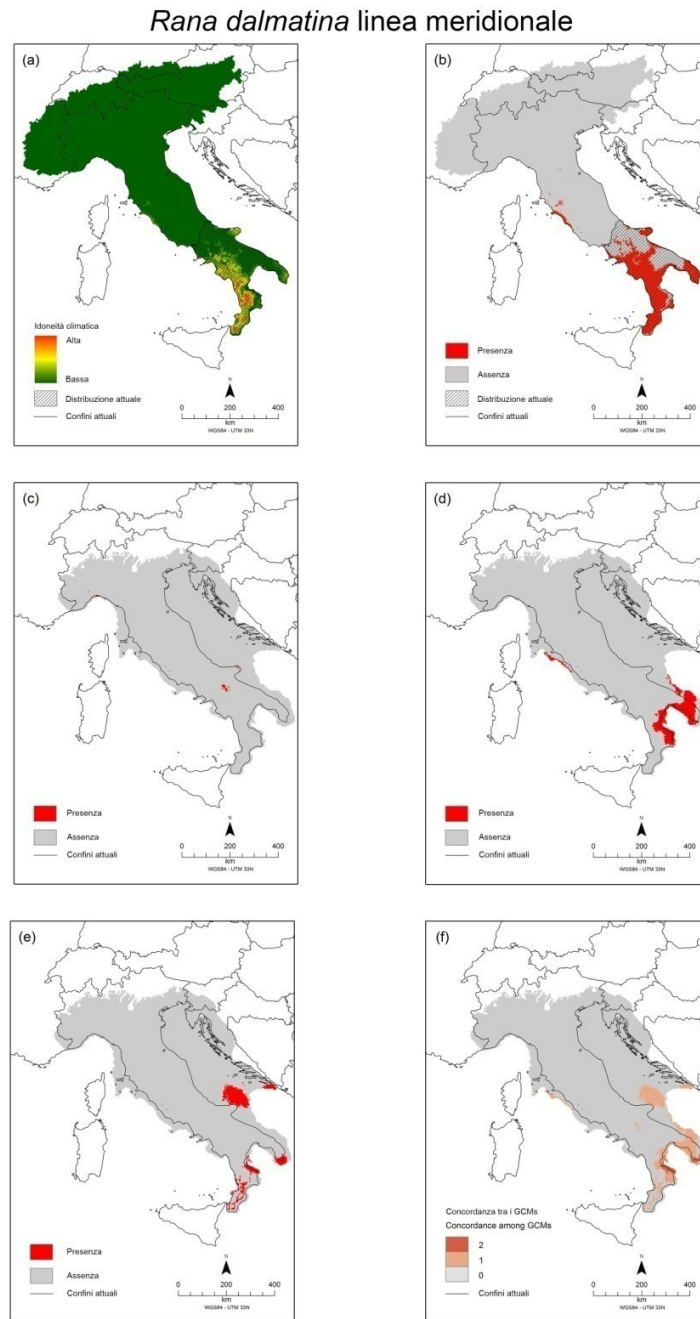


Figura S19. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Rana italica*.

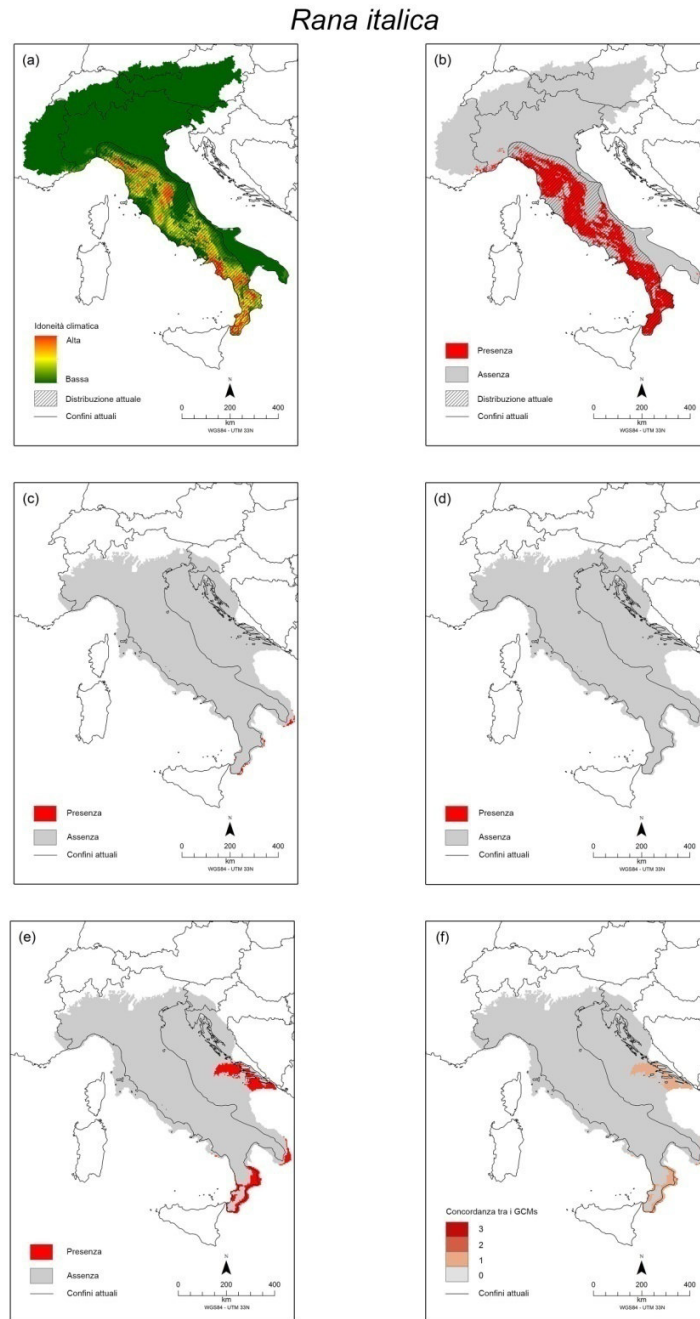


Figura S20. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Testudo hermanni hermanni*.

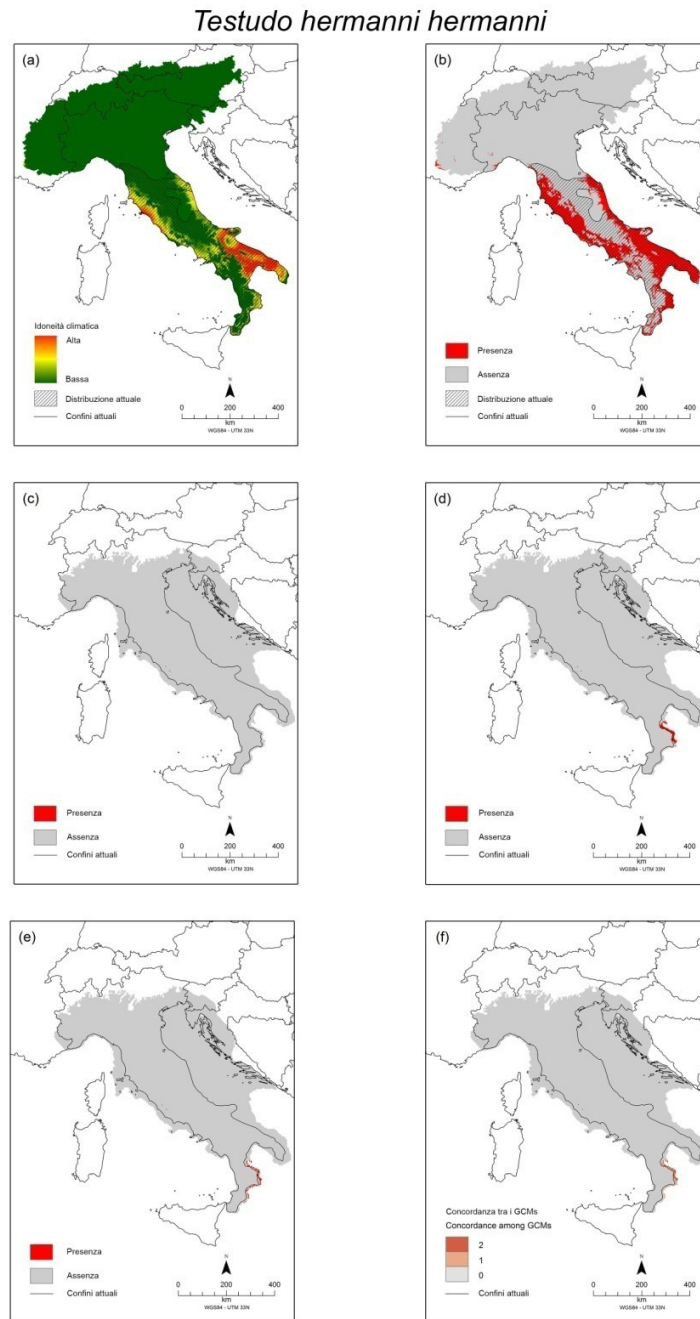


Figura S21. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Podarcis muralis* taxon meridionale.

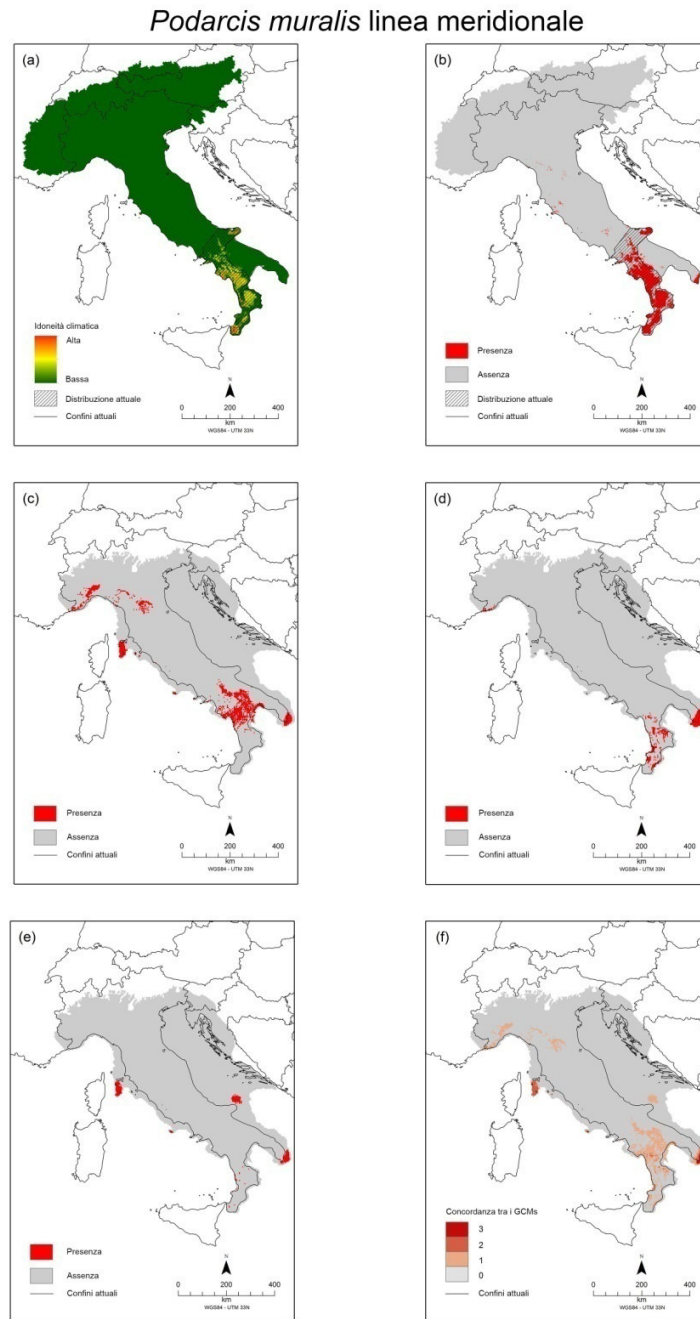


Figura S22. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Podarcis siculus* taxon meridionale.

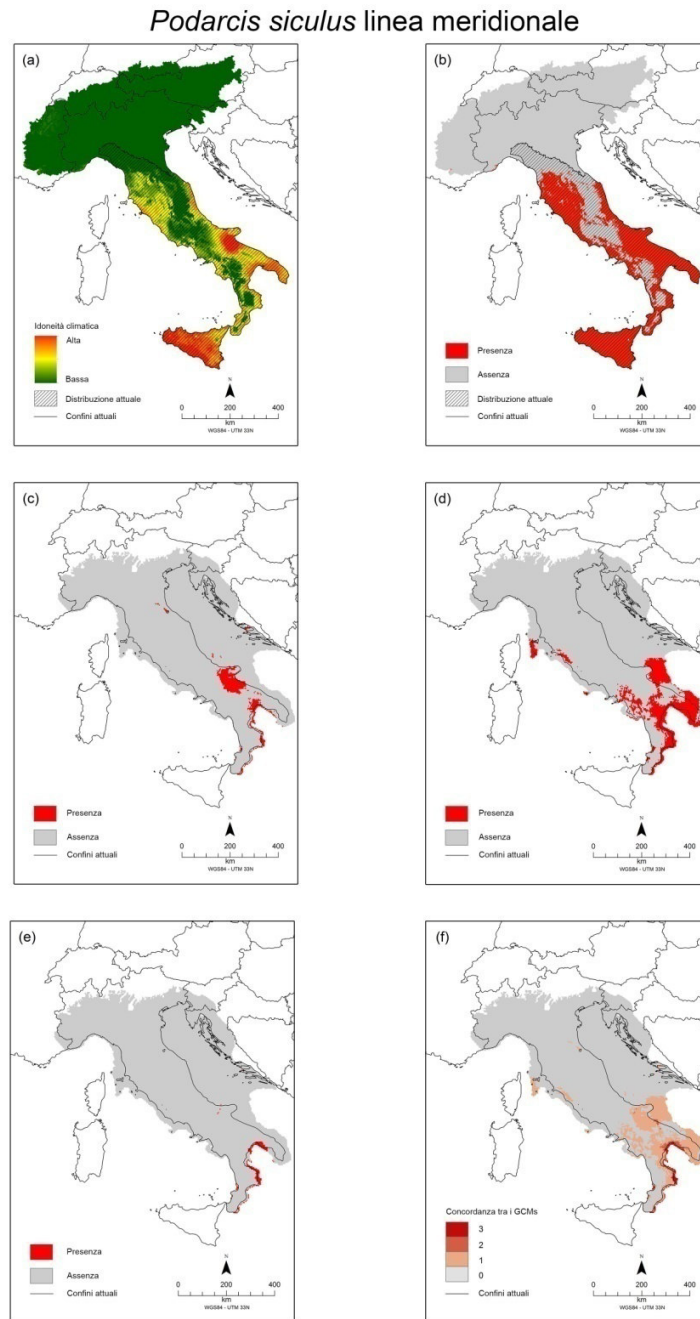


Figura S23. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per la *Talpa romana*.

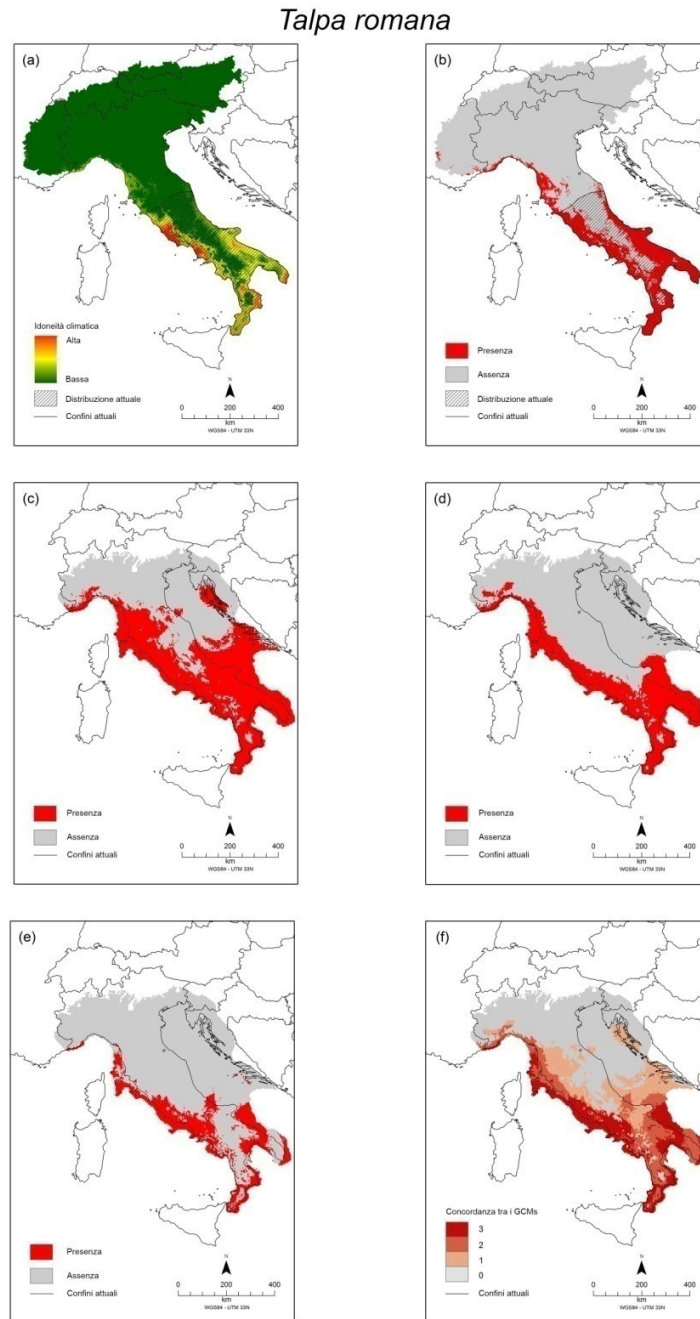


Figura S24. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per lo *Sciurus meridionalis*.

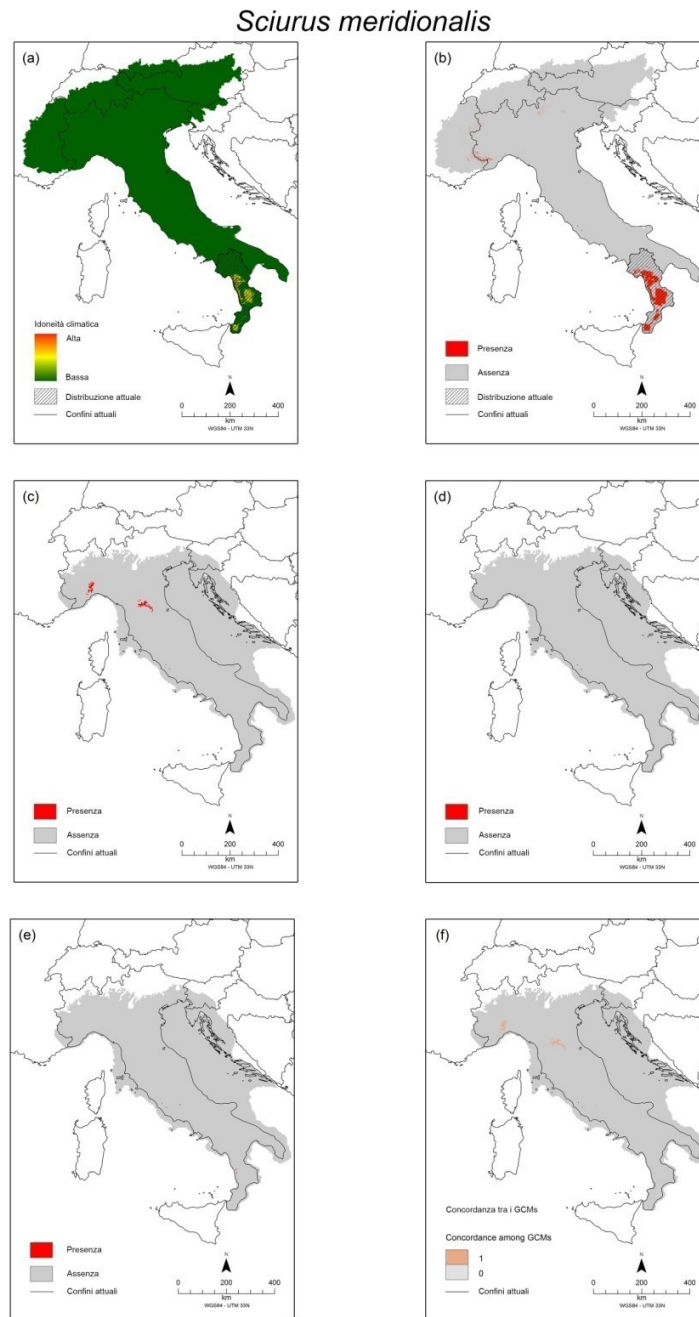


Figura S25. Modello di distribuzione continuo (a) e binario (b) secondo le attuali condizioni climatiche, modello di distribuzione binaria secondo le condizioni climatiche dell'LGM (per il GCM CCSMA (c), per il GCM MIROC-ESM (d) e per il GCM MPI-ESM (e)), e ricostruzione dei rifugi glaciali risultante dalla massima concordanza tra i tre GCM (f), per il *Myodes glareolus* taxon meridionale.

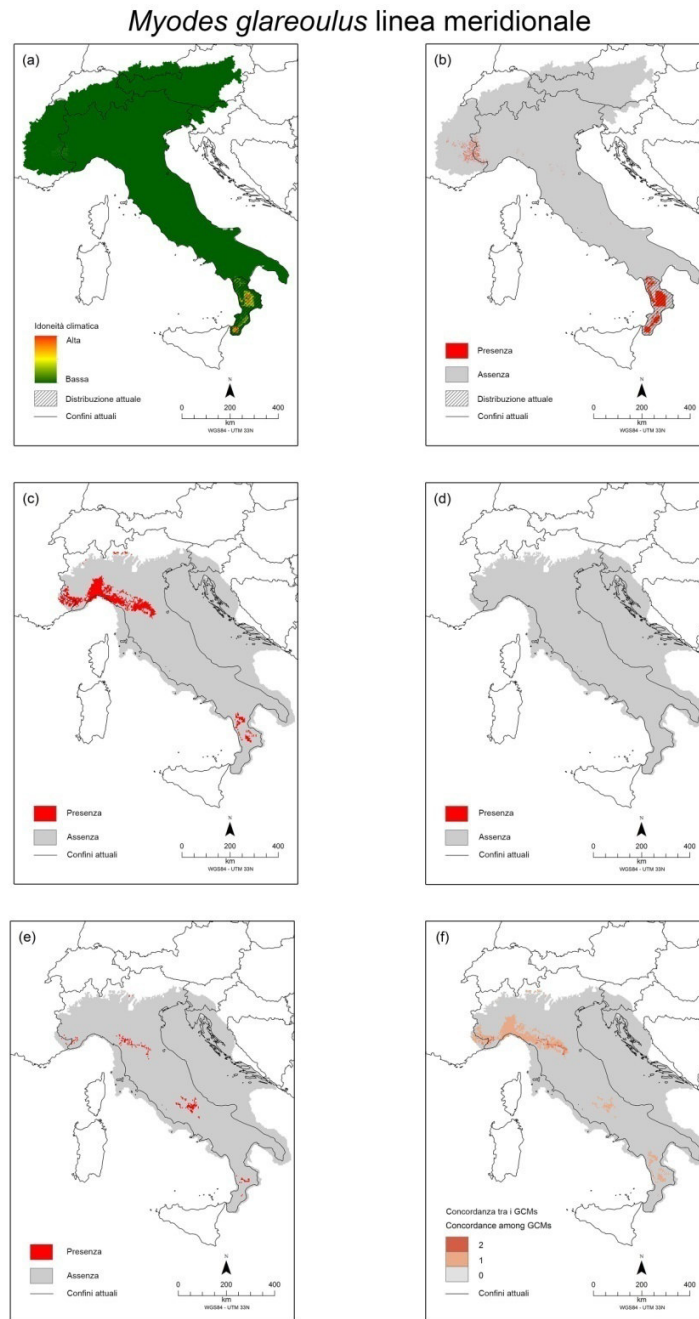
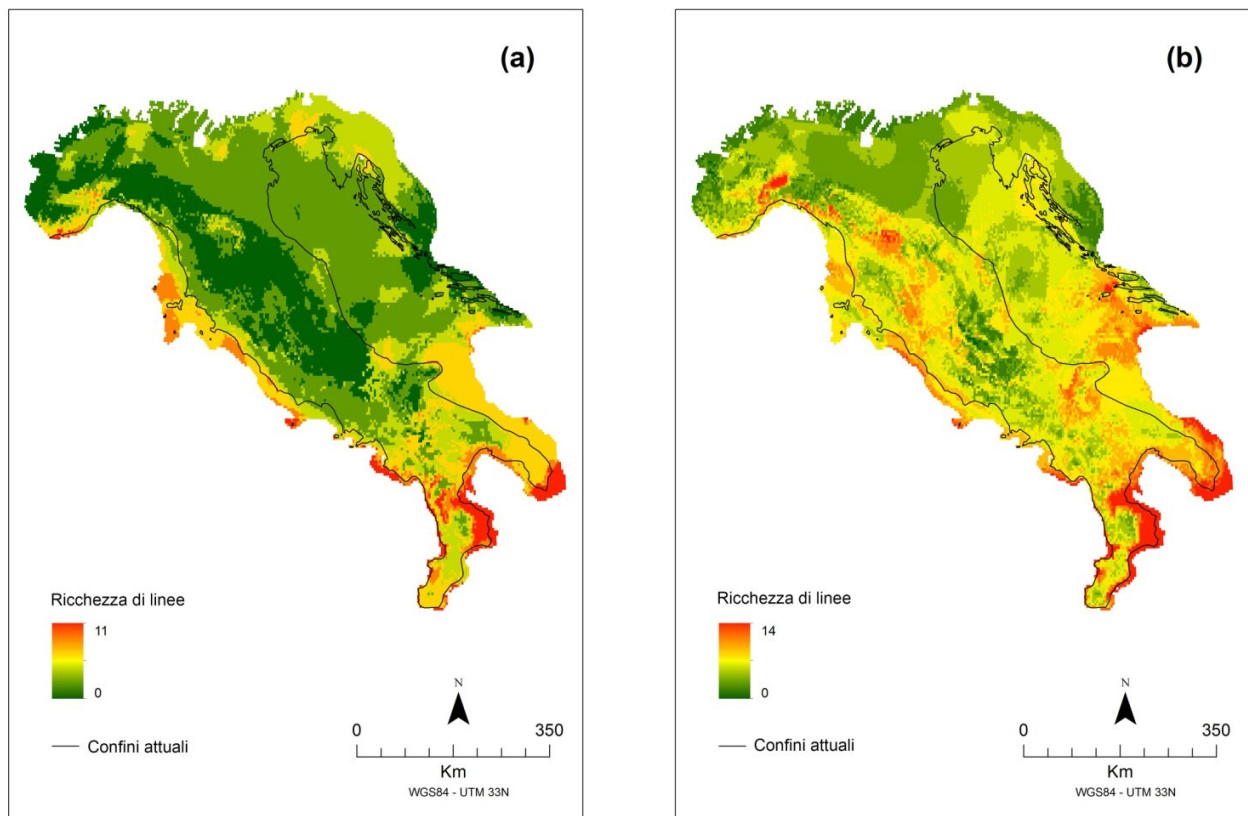


Figura S26. Distribuzione della ricchezza dei rifugi multi-taxon ottenuta sommando i rifugi dei singoli taxa. I rifugi dei singoli taxa sono stati calcolati selezionando: i) tutte le aree classificate come idonee da massimo due GCMs su tre (a); ii) tutte le aree classificate come idonee da ciascuno dei GCMs (b).



APPENDICE

Specie incluse nei punti di background secondo l'approccio del Target Group in quanto appartenenti alle stesse famiglie dei taxa studiati.

Anfibi e rettili:

Salamandra atra, *Salamandra salamandra*, *Ichthyosaura alpestris*, *Bombina variegata*, *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Rana dalmatina*, *Rana temporaria*, *Testudo hermanni*, *Lacerta bilineata*, *Podarcis muralis*, *Podarcis siculus*, *Zootoca vivipara*.

Mammiferi:

Apodemus agrarius, *Apodemus alpicola*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus amphibius*, *Chionomys nivalis*, *Erinaceus europaeus*, *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis*, *Microtus multiplex*, *Microtus subterraneus*, *Microtus savii*, *Mus musculus*, *Sciurus vulgaris*, *Sorex alpinus*, *Sorex antinorii*, *Sorex minutus*, *Sorex samniticus*, *Talpa caeca*, *Talpa europea*. Abbiamo escluso il genere *Neomys* data la sua esclusiva attitudine acquatica, che lo rende troppo differente dall'attitudine strettamente terrestre dell'arvicola *Myodes glareolus* considerata nel nostro studio.

4. IDENTIFICAZIONE E CONFRONTO DI HOTSPOT DI DIVERSITA' GENETICA MITOCONDRIALE E NUCLEARE MULTI-TAXON

La diversità genetica intraspecifica è la principale risorsa su cui si basa la capacità delle specie di adattarsi ai cambiamenti ambientali e di sopravvivere alle profonde trasformazioni che il nostro pianeta sta subendo in seguito alle pressanti azioni antropiche. Storicamente però, i piani di conservazione si sono concentrati sulla diversità di specie come unità chiave della biodiversità, proponendo piani di conservazione che ne massimizzassero la rappresentazione per unità di area protetta. Tuttavia, recentemente l'identificazione di hotspot di diversità genetica e la loro integrazione nei sistemi di aree protette sono state proposte, ai fini della conservazione della biodiversità, come obiettivi parimenti prioritari.

Una delle sfide maggiori dell'integrazione dei processi evolutivi nei piani per la conservazione deriva dalla caratteristica dei piani stessi di essere spazialmente espliciti, il che rende necessario rendere spazialmente espliciti anche le componenti della diversità genetica per poterle integrare. Diversi studi hanno fornito soluzioni sia in termini di metodi, che in termini di metriche utilizzate per rappresentare la diversità genetica (vedi Carvalho et al., 2011 e i lavori citati). Tuttavia, è importante fare una serie di considerazioni sugli studi svolti fino ad oggi. Innanzitutto questi si concentrano su un numero limitato di specie in quanto i dati molecolari idonei a questo genere di studi sono limitati e spesso sono ottenuti con metodi statistici differenti, il che rende difficile combinarli e confrontarli. Infine, la maggior parte di questi lavori utilizza esclusivamente dati di variazione mitocondriale. Questa scelta non è priva di motivazioni, essendo i dati mitocondriali più facilmente reperibili ed integrabili in confronto a quelli nucleari, il che favorisce l'inclusione di un numero maggiore di specie. L'assunto su cui si basa questa scelta inoltre, è che i risultati ottenuti con dati di variabilità mitocondriale siano rappresentativi del potenziale evolutivo delle popolazioni, è che possano quindi essere un buon proxy anche per la variabilità nucleare (Vandergaast et al., 2008). Tuttavia, non esistono ad oggi studi che abbiano tentato di confermare o smentire sperimentalmente questo assunto.

Gli obiettivi principali di questo lavoro sono quelli di: i) proporre un framework multidisciplinare per il calcolo degli hotspot che vede l'integrazione di strumenti e metodi tipici della filogeografia e

dei modelli di distribuzione delle specie; ii) confrontare la distribuzione geografica degli hotspot di diversità genetica intraspecifica mitocondriale e nucleare al fine di compararli; iii) analizzare il loro stato di protezione da parte dell'attuale rete di aree protette in Italia peninsulare. Per il raggiungimento di tale obiettivo ci siamo focalizzati sui vertebrati terrestri (anfibi, rettili e mammiferi) endemici della penisola italiana, includendo non solo specie e sottospecie ma anche a linee evolutive che grazie a studi filogeografici sono stati identificati come divergenti dal resto della specie, ed endemiche della penisola italiana.

Il framework si sviluppa in cinque step. Nel primo abbiamo calibrato un modello di distribuzione delle specie (SDM) per identificare la distribuzione attuale di ogni taxon. Abbiamo quindi collezionato dati di presenza e variabili climatiche per ogni taxon e modellizzato la loro distribuzione applicando l'approccio dell'ensemble forecasting. Le distribuzioni della probabilità di presenza continue dei vari taxa sono state trasformate in mappe binarie di presenza assenza (per i dettagli metodologici della calibrazione e validazione dei modelli vedi la sezione 3.2.2). Nel secondo step abbiamo definito i livelli di diversità genetica mitocondriale e nucleare per ogni taxon attraverso la produzione di dataset genetici multi-locus, sia per quanto riguarda il genoma mitocondriale che per quanto riguarda quello nucleare. Alcuni dataset multi-locus sono stati collezionati da studi precedenti, svolti sia dal nostro che da altri gruppi di ricerca, mentre altri dataset sono stati integrati o prodotti ex-novo per questo studio. La diversità genetica nucleare delle popolazioni campionate è stata stimata come eterozigosi attesa (H_E) e ricchezza allelica (A_r) usando GENETIX 4.05.2 (Belkhir et al., 1996) e FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001), rispettivamente. La diversità genetica mitocondriale invece è stata stimata come diversità aplo-tipica (h) e diversità nucleotidica (π) usando DNASP 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Queste analisi sono state condotte escludendo i siti dove sono stati campionati meno di tre individui. Nel terzo step, essendo i dati genetici in nostro possesso puntiformi e distribuiti in modo da rispecchiare lo schema di campionamento con cui sono stati raccolti, abbiamo utilizzato un'interpolazione a distanza inversa ponderata (Inverse Distance Weighted, IDW) per ottenere valori continui dei diversi indici su tutta l'area di studio. Questa interpolazione si basa sul principio geostatistico per cui due punti vicini nello spazio sono più simili fra loro di due punti lontani nello spazio. Le interpolazioni sono state modellizzate utilizzando la funzione Geostatistical Wizard IDW in ArcGis 10.1 (ESRI, Redlands, CA, USA). Come parametri ottimali della funzione di interpolazione abbiamo scelto per ogni taxon: una finestra circolare con un raggio pari alla massima distanza minima tra i punti di ogni set divisa in quattro settori ruotati a 45°; utilizzato un minimo di un punto e un massimo pari al numero

massimo di punti per ogni set; ottimizzato il power come consentito dalla funzione. Per ottenere una stima della bontà delle interpolazioni, abbiamo calcolato l'errore quadratico medio. Le interpolazioni sono state tagliate prima con l'areale di distribuzione di ogni linea e infine con la mappa di presenza assenza ottenuta dalla binarizzazione delle distribuzioni di probabilità di presenza (Figure 2-26, pannelli b,c,d,e). Nel quarto step, a partire dai valori di diversità genetica interpolati, abbiamo definito come hotspot di diversità per ogni taxon e per ogni indice il 5% superiore dei valori. Una volta ottenuto un hotspot per ogni indice per ogni marcatore, abbiamo provveduto all'identificazione degli hotspot multi-taxon sommando tra loro i singoli hotspot taxon-specifici e ottenendo delle mappe di ricchezza di hotspot. Nel quinto e ultimo step, abbiamo calcolato il grado di protezione degli hotspot taxon-specifici e multi-taxon predetti attraverso la gap analysis. Abbiamo deciso di testare il livello di protezione sia dell'attuale sistema di aree protette (SAP) nazionali e regionali sia la rete che risulta dall'integrazione della Rete Natura2000 al SAP (Figura 1).

I risultati ottenuti mostrano come nella penisola italiana l'assunto per il quale i risultati ottenuti dalla variazione genetica mitocondriale siano proxy del potenziale evolutivo delle specie, in quanto rappresentativi anche della variazione genetica nucleare non è verificato. Infatti non solo nella maggior parte delle specie non c'è congruenza tra gli hotspot di variabilità mitocondriale e nucleare (vedi *Salamandra salamandra giglioli* Figura 2, *Salamandrina terdigitata* Figura 4, *Rana italica* Figura 19, *Sciurus meridionalis* Figura 25), ma tal volta non esiste congruenza neanche tra indici diversi dello stesso marcatore (vedi indici mitocondriali in *Salamandra salamandra giglioli* Figura 3 f, g e *Hyla perrini* Figura 15 f, g). Questa differenza è ben evidente nelle mappe che riassumono la ricchezza di hotspot multi-taxon, sia per i singoli indici (Figura 27) che per gli hotspot mitocondriali e nucleari (Figura 28). Infatti, sebbene i principali hotspot multi-taxon di diversità genetica siano localizzati nella porzione meridionale della penisola italiana sia per il marcatore nucleare che per quello mitocondriale (Figura 28), tuttavia ad un'analisi più accurata le congruenze risultano al massimo marginali, soprattutto per le aree con una ricchezza maggiore.

A prescindere dal marcatore e dall'indice considerato, la copertura fornita del SAP e della rete Natura 2000 risulta scarsa (Tabella 26). In media il taxon i cui hotspot risultano più protetti, sia dal SAP che dall'integrazione a quest'ultimo della rete Natura 2000, è lo *Sciurus meridionalis* (SAP: 48.8, d.s. 17.6; SAP + Natura 2000 51.66, d.s. 18.73) e quelli meno protetto è il *Triturus carnifex* taxon settentrionale (1.2, d.s. 1.2) per la SAP e il *Lissotriton italicus* linea meridionale per la SAP con l'aggiunta della rete Natura 2000 (1.75, d.s. 1.39). La SAP protegge in media il 18.7 % degli hotspot di diversità aplo-tipica, il 16.2% della diversità nucleotidica, il 18.2% della ricchezza allelica

e il 15.8% dell'eterozigosi attesa (Tabella 26). Con l'integrazione della rete Natura 2000 le percentuali di protezione aumentano sebbene non si superi mai la percentuale media del circa 25%. La situazione non sembrerebbe variare se si considerano gli hotspot totali di diversità mitocondriale e nucleare. Per gli hotspot mitocondriali entrambi le classi più ricche non vengono protette ne dal SAP ne dal SAP più la rete Natura 2000 (Figura 30). Diversa la situazione per le classi più ricche degli hotspot nucleari, la cui protezione tuttavia non supera mai il 40%.

In seguito ai risultati ottenuti suggeriamo che i dataset nucleari vengano ampliati e resi disponibili per un numero maggiore di specie, e che qualora fossero a disposizione questi dati, i piani di conservazione si concentrino solo sulla diversità nucleare, in quanto quest'ultima non è risultata ben rappresentata dalla diversità mitocondriale. Essendo il nostro lavoro il primo a presentare un confronto tra gli hotspot di diversità mitocondriale e nucleare suggeriamo che alla luce dei risultati ottenuti sia ragionevole riconsiderare i risultati ottenuti in precedenza da altri studi in diverse aree geografiche (Vandergaast et al., 2010; Miraldo et al., 2016) basati esclusivamente sulla variazione mitocondriale. Infatti, sebbene il nostro studio si concentri in un'area limitata del pianeta, e quindi i risultati ottenuti non sono necessariamente rappresentativi della distribuzione globale della diversità genetica, tuttavia essi sono i primi espressamente prodotti al fine di valutare l'integrabilità e la possibile equivalenza per fini conservazionistici di dati nucleari e mitocondriali.

4.1 TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Numero dei punti di presenza totali che sono stati raccolti, la distanza di filtraggio MMND (Mean Minimum NearDistance), numero di punti filtrati usati per la calibrazione e numero di punti usati per la validazione dei modelli di distribuzione dei taxa coinvolti nel nostro studio. La letteratura di riferimento riporta lo studio filogeografico tramite il quale sono state identificati ciascun taxon e dai quali sono stati collezionati i dati di diversità genetica nucleare e mitocondriale. N = settentrionale; S = meridionale.

	Classe	Taxon	Letteratura di riferimento	Punti totali	MND (m)	Punti di calibrazione	Punti di validazione
1	Amphibia	<i>Salamandra salamandra gigliolii</i>	Steinfartz et al. (2000)	258	13.186	111	147
2		<i>Salamandrina perspicillata</i>	Canestrelli et al. (2006b)	222	9.621	132	90
3		<i>Salamandrina terdigitata</i>	Canestrelli et al. (2006b)	89	8.076	42	47
4		<i>Lissotriton italicus</i> N	Canestrelli et al. (2012a)	83	17.167	49	34
5		<i>Lisotriton italicus</i> S	Canestrelli et al. (2012a)	36	10.739	21	15
6		<i>Lissotriton vulgaris meridionalis</i>	Maura et al. (2014)	374	10.874	250	124
7		<i>Ichtyosaura alpestris</i> N	Chiocchio et al. (2017)	84	10.068	44	40
8		<i>Ichtyosaura alpestris</i> S	Chiocchio et al. (2017)	126	10.407	67	59
9		<i>Triturus carnifex</i> N	Canestrelli et al. (2012b)	245	10.97	166	79
10		<i>Trituturs carnifex</i> S	Canestrelli et al. (2012b)	299	10.958	184	115
11		<i>Bombina pachypus</i>	Canestrelli et al. (2006a)	352	11.277	182	170
12		<i>Bufo bufo</i> N	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	540	5.97	369	171
13		<i>Bufo bufo</i> S peninsulare	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	210	9.589	135	75
		<i>Bufo bufo</i> S in Sicilia	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	35	15.064	19	16
14		<i>Hyla perrini</i>	Dufresnes et al. (2018)	364	7.961	250	114
15		<i>Hyla intermedia</i> peninsulare	Canestrelli et al. (2007)	313	10.954	213	100
		<i>Hyla intermedia</i> in Sicilia	Canestrelli et al. (2007)	18	20.003	8	10
16		<i>Pelophylax lessonae</i>	Canestrelli et al. (2008a)	576	8.347	407	169
17		<i>Rana dalmatina</i> S	Canestrelli et al. (2014)	146	10.106	71	75
18		<i>Rana italica</i>	Canestrelli et al. (2008b)	442	9.311	257	185
19		<i>Rana temporaria</i>	Stefani et al. (2012)	132	8.342	71	61
20	Reptilia	<i>Testudo hermanni hermanni</i>	Zampiglia et al. (<i>in prep</i>)	173	14.037	91	82
21		<i>Podarcis muralis</i> S	Salvi et al. (2013)	64	14.62	34	30

Tabella 1. *continua*

22	Mammalia	<i>Talpa romana</i>	Canestrelli et al. (2010)	116	17.72	53	63
23		<i>Sciurus vulgaris meridionalis</i>	Wauters et al. (2017)	154	7.261	43	111
24		<i>Myodes glareolus</i> S	Chiocchio et al. (<i>in prep</i>)	61	8.173	24	37

Tabella 2. Posizione geografica, dimensione del campione e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 14 popolazioni di *Salamandra salamandra gigliolii* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Gambarie	38.16	15.83	16	16	0.05	1.05	0.33	0.00
2	Carmelia	38.22	15.92	10	10	0.06	1.06	0.64	0.00
3	Serra San Bruno	38.56	16.32	7	6	0.04	1.04	0.00	0.00
4	Villaggio Mancuso	39.06	16.56	11	11	0.02	1.02	0.47	0.00
5	Fagnano Castello	39.55	16.02	3	3	0.01	1.01	0.67	0.00
6	San Severino Lucano	40.01	16.13	7	11	0.06	1.06	0.56	0.00
7	Giffoni	40.76	15.00	8	8	0.06	1.06	0.71	0.01
8	Cervinara	41.01	14.62	11	7	0.08	1.08	0.00	0.00
9	Val Fondillo	41.70	14.37	-	5	-	-	0.00	0.00
9	Pescolanciano	41.72	14.33	9	6	0.06	1.06	0.00	0.00
10	Volpaia	43.49	11.43	14	-	0.06	1.06	-	-
11	Camaldoli	43.84	11.79	10	10	0.05	1.05	0.00	0.00
12	Cipollaio	44.04	10.27	3	10	0.08	1.08	0.47	0.00
13	Passo del Bracco	44.25	9.57	-	5	-	-	0.00	0.00
13	Vallecalda	44.57	8.90	8	9	0.09	1.09	0.00	0.00
14	Colle San Bartolomeo	43.97	7.96	10	14	0.13	1.13	0.63	0.00

Tabella 3. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 30 popolazioni di *Salamandrina perspicillata* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Rio Riazzu	44.68	9.03	-	18	-	-	0.00	0.00
2	Bologna	44.47	11.28	-	15	-	-	0.13	0.02
3	Molino del Pallone	44.11	10.97	-	8	-	-	0.00	0.00
4	Bagno di Romagna	43.84	11.97	20	-	0.22	1.22	-	-
5	Monte Nerone	43.64	12.72	-	15	-	-	0.28	0.04
6	Montaione	43.55	10.91	-	17	-	-	0.38	0.06
7	Borro al Diavolo	43.51	11.64	-	15	-	-	0.00	0.00
8	Sefro	43.36	12.72	-	16	-	-	0.00	0.00
9	Torrente Rigo	42.87	12.26	-	10	-	-	0.36	0.05
10	Mattere	42.72	13.05	-	18	-	-	0.00	0.00
11	Terni	42.52	12.63	-	21	-	-	0.56	0.10
12	Barbarano Romano	42.24	12.06	9	-	0.12	0.99	-	-
13	tolfa	42.13	11.90	7	-	0.15	1.09	-	-
14	Majella	42.10	14.22	-	12	-	-	0.00	0.00
15	Percile	42.09	12.94	11	-	0.13	0.94	-	-
16	Rosello	41.90	14.35	10	-	0.16	1.14	-	-
17	Monte Livata	41.87	13.19	-	15	-	-	0.13	0.04
18	Belle Facce	41.74	12.69	-	18	-	-	0.52	0.08
19	Casacalenda	41.74	14.85	15	-	0.29	1.25	-	-
20	Collemeluccio	41.71	14.35	19	-	0.20	1.19	-	-
21	Donzella	41.69	12.81	-	23	-	-	0.00	0.00
22	San Michele a Foce	41.65	14.01	16	-	0.17	1.14	-	-
23	Casina Mainarde	41.62	13.95	-	16	-	-	0.40	0.06
24	Bassiano	41.57	13.05	12	-	0.19	1.13	-	-
25	Guardiaregia	41.44	14.54	24	-	0.32	1.36	-	-
26	Ausoni	41.43	13.36	10	-	0.20	1.15	-	-
27	San Gregorio	41.38	14.39	15	-	0.31	1.27	-	-

Tabella 3. *continua*

28	Petraroja	41.35	14.56	7	-	0.39	1.47	-	-
29	Pontelandolfo	41.30	14.69	22	-	0.29	1.36	-	-
30	Sorgente Pero	40.83	14.89	-	16	-	-	0.65	0.11

Tabella 4. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 11 popolazioni di *Salamandrina terdigitata* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Serino	40.83	14.89	18	-	0.03	0.81	-	-
7	Torrente Cerasuolo	40.83	14.89	-	24	-	-	0.24	0.04
2	Amalfi	40.64	14.60	12	-	0.00	0.73	-	-
8	Vallone Cupo	40.32	15.34	-	18	-	-	0.11	0.02
3	Peschiera	40.07	16.10	14	-	0.08	0.90	-	-
4	Viggianello	39.97	16.08	8	-	0.08	0.88	-	-
9	Foresta	39.95	16.38	-	21	-	-	0.00	0.00
10	Torrente Rosa	39.66	16.01	-	18	-	-	0.00	0.00
6	Villaggio Mancuso	39.06	16.56	18	-	0.05	0.84	-	-
5	Stilo	38.50	16.42	10	-	0.09	0.93	-	-
11	Fiumara Samo	38.06	16.06	-	19	-	-	0.00	0.00

Tabella 5. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 31 popolazioni di *Lissotriton italicus* taxon settentrionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Foresta Umbra	41.86	16.02	8	3	0.08	1.15	0.00	0.00
2	Mattinata	41.76	16.06	4	-	0.04	1.09	-	-
3	Pescolanciano	41.67	14.33	14	16	0.12	1.24	0.33	0.00
4	Guardiaregia	41.40	14.57	-	3	-	-	0.67	0.00
5	Roseto Valfortore	41.37	15.08	9	12	0.13	1.23	0.53	0.00
6	Monte Redentore	41.30	13.62	11	14	0.06	1.10	0.14	0.00
7	Lago Castiglione	40.95	17.12	16	12	0.07	1.13	0.00	0.00
8	Conza	40.88	15.31	-	4	-	-	0.50	0.00
9	Alberobello	40.79	17.20	-	6	-	-	0.33	0.00
10	Rifreddo	40.55	15.82	-	6	-	-	0.33	0.03
11	Ottati	40.45	15.32	13	13	0.17	1.33	0.81	0.00
12	Le Cesine	40.34	18.17	-	7	-	-	0.00	0.00
13	Stio	40.30	15.25	7	7	0.19	1.38	0.67	0.00
14	Policoro	40.17	16.70	-	18	-	-	0.73	0.02
15	Conserva	40.02	16.26	7	-	0.18	1.35	-	-
16	Conserva	40.02	16.26	-	7	-	-	0.81	0.00
17	Acqualisparti	39.99	15.88	12	4	0.15	1.30	0.50	0.00
18	LagoFondo	39.97	16.28	11	16	0.21	1.41	0.24	0.00
19	Massadita	39.95	15.83	11	6	0.20	1.40	0.33	0.00
20	Mormanno	39.89	15.94	13	9	0.20	1.41	0.56	0.04
21	Civita	39.86	16.30	16	9	0.15	1.30	0.00	0.00
22	San Domenica Talao	39.83	15.87	16	6	0.19	1.37	0.53	0.00
23	Ficara	39.66	16.12	12	7	0.25	1.48	0.29	0.03
24	Tarsia	39.62	16.31	10	6	0.17	1.32	0.00	0.00
25	San Demetrio	39.61	16.39	10	9	0.16	1.31	0.39	0.00
26	Lago Due Uomini	39.55	16.02	18	8	0.20	1.39	0.89	0.00
27	Sbullano	39.43	16.11	9	8	0.13	1.25	0.22	0.00

Tabella 5. *continua*

28	San Lucido	39.30	16.09	23	6	0.22	1.41	0.73	0.00
29	Cerisano	39.26	16.15	16	9	0.24	1.48	0.00	0.00
30	Fiumefreddo	39.25	16.06	13	6	0.18	1.35	0.33	0.00
31	Belmonte Calabro	39.15	16.07	13	8	0.09	1.17	0.00	0.00

Tabella 6. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 20 popolazioni di *Lissotriton italicus* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Ficara	39.66	16.12	12	7	0.25	1.48	0.29	0.03
2	Tarsia	39.62	16.31	10	9	0.17	1.32	0.00	0.00
3	San Demetrio	39.61	16.39	10	9	0.16	1.31	0.39	0.00
4	Crosia	39.57	16.77	8	8	0.12	1.22	0.00	0.00
5	Lago Due Uomini	39.55	16.02	18	8	0.20	1.39	0.89	0.00
6	San Benedetto Ullano	39.43	16.11	9	8	0.13	1.25	0.22	0.00
7	Umbriatico	39.38	16.92	3	-	0.08	1.15	-	-
8	Verzino	39.32	16.87	10	8	0.11	1.21	0.61	0.00
9	San Lucido	39.30	16.09	23	6	0.22	1.41	0.73	0.00
10	Cerisano	39.26	16.15	16	9	0.24	1.48	0.00	0.00
11	Fiumefreddo	39.25	16.06	13	6	0.18	1.35	0.33	0.00
12	Belmonte Calabro	39.15	16.07	13	8	0.09	1.17	0.00	0.00
13	San Pietro Amantea	39.13	16.11	10	6	0.14	1.26	0.73	0.00
14	Nocera Tirinese	39.03	16.15	15	14	0.08	1.15	0.44	0.00
15	Polia	38.74	16.34	13	12	0.13	1.24	0.00	0.00
16	Angitola	38.74	16.22	15	11	0.09	1.18	0.75	0.00
17	Zungri	38.67	15.99	7	6	0.12	1.23	0.73	0.00
18	Serra San Bruno	38.56	16.31	14	9	0.15	1.29	0.50	0.00
19	San Ilario Jonio	38.22	16.18	11	18	0.12	1.21	0.71	0.00
20	Madonna Leandro	38.02	15.73	14	12	0.02	1.04	0.00	0.00

Tabella 7. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 20 popolazioni di *Lissotriton vulgaris meridionalis* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

				Dimensione del campione		H _E	A _r	h	π
Sito	Lat. N	Long. E	nDNA	mtDNA					
1	Porto Caleri	45.10	12.33	-	3	-	-	0.67	0.14
2	Castelleone	45.28	9.76	-	4	-	-	1.00	0.68
3	Cesano Maderno	45.62	9.12	-	3	-	-	0.67	1.00
4a	Donega	44.94	9.24	-	8	-	-	0.89	0.16
4b	Canavera	44.92	9.24	-		-	-	0.89	0.16
5	Terra del sole	44.19	11.96	-	4	-	-	0.50	0.50
6	Pisa	43.70	10.48	-	3	-	-	1.00	0.90
7	Greve in Chianti	43.60	11.31	-	4	-	-	0.50	0.11
8	Roccalbegna	42.79	11.51	-	5	-	-	0.70	0.14
9	Orbetello	42.44	11.22	-	4	-	-	0.50	0.11
10	Alviano	42.59	12.30	-	3	-	-	1.00	0.62
11a	Palo laziale	41.94	12.10	-	6	-	-	0.73	0.09
11b	Canale Monterano	42.13	12.05	-		-	-	0.73	0.09
12a	Navegna	42.20	12.96	-	2	-	-	0.83	0.29
12b	Lucretili	42.10	12.79	-		-	-	0.83	0.29
13	Rocca di mezzo	42.16	13.64	-	3	-	-	0.67	0.76
14	Dogna	46.45	13.32	-	6	-	-	0.33	0.02
15	Doganella	41.78	12.70	-	6	-	-	0.80	0.31
16	Sepino	41.41	14.62	-	5	-	-	0.00	0.00
17	San Geminiano	44.72	10.44	-	3	-	-	1.00	0.71
18a	Mulino di Pianoro	44.36	11.33	-	7	-	-	0.60	0.04
18b	Pianoro	44.39	11.34	-		-	-	0.60	0.04
19	Tarvisio	46.51	13.58	-	8	-	-	0.25	0.02
20a	Arcade	45.78	12.21	-	5	-	-	1.00	0.63
20b	Bò dei Pavei	45.82	12.17	-		-	-	1.00	0.63
20c	Collesel San Rocco	45.83	12.15	-		-	-	1.00	0.63
20d	Crocetta del Montello	45.83	12.04	-		-	-	1.00	0.63

Tabella 8. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 7 popolazioni di *Ichthyosaura alpestris* taxon settentrionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Stagno Bargone	44.32	9.49	16	14	0.41	2.51	0.14	0.00
2	Monte Penna	44.48	9.49	14	14	0.40	2.44	0.26	0.00
3	Capanne di Marcarolo	44.55	8.78	14	9	0.38	2.47	0.22	0.00
4	Rossiglione	44.55	8.64	10	9	0.28	2.05	0.00	0.00
5	Piampalauo	44.45	8.60	13	12	0.33	2.50	0.71	0.00
6	Madonna del Lago	44.12	8.00	13	10	0.22	1.75	0.00	0.00
7	Pecetto Torinese	45.04	7.76	10	10	0.16	1.43	0.00	0.00

Tabella 9. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 10 popolazioni di *Ichthyosaura alpestris* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Montalto Uffugo	39.54	16.02	14	11	0.23	1.99	0.00	0.00
2	Monti della Laga	42.70	13.32	14	10	0.26	2.13	0.00	0.00
3	Iesa	43.09	11.24	7	4	0.31	2.17	0.50	0.00
4	Torsoli	43.56	11.39	12	9	0.20	1.97	0.00	0.00
5	Camaldoli	43.81	11.82	13	11	0.31	2.38	0.51	0.00
6	Monghidoro	44.22	11.31	10	7	0.29	2.27	0.00	0.00
7	Lago del Greppo	44.12	10.67	12	9	0.25	2.36	0.22	0.00
8	Minucciano	44.15	10.23	13	10	0.24	1.87	0.00	0.00
9	Stagno Bargone	44.32	9.49	16	14	0.41	2.51	0.14	0.00
10	Monte Penna	44.48	9.49	14	14	0.40	2.44	0.26	0.00

Tabella 10. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 11 popolazioni di *Triturus carnifex* taxon settentrionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Busa de San Piero	45.80	12.14	3	3	0.18	1.20	0.00	0.00
2	Arcade	45.78	12.21	3	-	0.24	1.29	-	-
3	Montevecchia	45.71	9.38	-	5	-	-	0.00	0.00
4	Le Poscole	45.60	11.39	3	5	0.22	1.23	0.00	0.00
5	Porto Caleri	45.09	12.33	3	4	0.20	1.25	0.50	0.00
6	Donega	44.94	9.24	3	5	0.20	1.21	0.60	0.00
7	Mulino di Pianoro	44.35	11.32	3	5	0.16	1.16	0.60	0.00
8	Stagno Bargone	44.32	9.49	3	5	0.11	1.05	0.60	0.00
9	Terra del sole	44.19	11.96	3	5	0.24	1.30	0.00	0.00
10	Senigallia	43.69	13.20	-	5	-	-	0.40	0.00
11	San Severino Marche	43.30	13.07	3	-	0.17	1.17	-	-

Tabella 11. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 24 popolazioni di *Triturus carnifex* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Firenze	43.77	11.26	-	6	-	-	0.73	0.00
2	Pisa	43.72	10.40	3	-	0.15	1.14	-	-
3	Greve in Chianti	43.59	11.30	3	8	0.13	1.10	0.46	0.00
4	San Severino Marche	43.30	13.07	3	8	0.17	1.17	0.43	0.01
5	Roccalbegna	42.76	11.52	-	8	-	-	0.61	0.00
6	Alviano	42.62	12.24	3	7	0.16	1.13	0.81	0.00
7	Campo Imperatore	42.44	13.58	-	7	-	-	0.00	0.00
8	San Quirico	42.44	13.84	3	7	0.14	1.12	0.29	0.00
9	Navegna	42.19	12.97	-	11	-	-	0.18	0.00
10	Rocca di Mezzo	42.16	13.64	-	5	-	-	0.60	0.00
11	Jenne	41.89	13.17	-	7	-	-	0.67	0.00
12	Torre Palermo	41.83	16.04	3	15	0.09	0.99	0.00	0.00
13	Doganella	41.77	12.72	-	7	-	-	0.29	0.00
14	Sessano	41.63	14.34	3	9	0.10	1.02	0.56	0.00
15	Campo di Mele	41.38	13.53	-	7	-	-	0.29	0.00
16	Circeo	41.34	13.04	3	5	0.10	1.04	0.60	0.00
17	Conza	40.86	15.30	3	7	0.13	1.09	0.00	0.00
18	Alberobello	40.82	17.23	3	3	0.07	0.99	0.00	0.00
19	Taverna Magnano	40.05	16.12	3	6	0.10	1.05	0.33	0.00
20	Due Uomini	39.55	16.02	-	15	-	-	0.51	0.00
21	Fuscaldo	39.42	16.03	3	-	0.11	1.06	-	-
22	Laghicello	39.41	16.16	-	6	-	-	0.00	0.00
23	Cecita	39.38	16.51	3	6	0.09	1.04	0.33	0.00
24	San Pietro in Guarano	39.34	16.31	-	9	-	-	0.00	0.00

Tabella 12. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 29 popolazioni di *Bombina pachypus* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Rio a Buti	43.94	11.10	5	11	0.45	2.26	0.00	0.00
2	Bagno di Romagna	43.84	11.97	6	13	0.32	1.78	0.00	0.00
3	Firenze	43.78	11.23	5	8	0.40	2.26	0.00	0.00
4	Stipes	42.25	12.97	4	6	0.53	2.73	0.00	0.00
5	Rocca Caramanico	42.15	14.02	5	6	0.38	1.94	0.00	0.00
6	San Biagio	41.62	13.90	4	5	0.33	1.87	0.00	0.00
7	San Lupo	41.27	14.65	4	11	0.29	1.64	0.00	0.00
8	Carife	41.02	15.20	-	4	-	-	0.00	0.00
9	Sorgente Auso	40.45	15.32	7	-	0.48	2.31	-	-
10	Sant'Angelo a Fasanella	40.45	15.33	-	9	-	-	0.00	0.00
11	San Severino Lucano	40.08	16.07	7	8	0.62	2.67	0.00	0.00
12	Macchia Longa	39.37	16.60	9	12	0.62	3.23	0.53	0.19
13	Monte Cocuzzo 2	39.23	16.12	4	-	0.57	2.94	-	-
14	Monte Cocuzzo 1	39.23	16.17	9	9	0.62	3.20	0.42	0.07
15	Taverna	39.03	16.58	-	5	-	-	0.90	0.23
16	Catanzaro	38.82	16.48	9	-	0.68	3.42	-	-
17	Girifalco	38.82	16.48	-	10	-	-	0.20	0.10
18	Cardinale	38.73	16.40	4	5	0.78	3.61	0.70	0.20
19	Piani di Lacina	38.58	16.39	5	-	0.63	3.04	-	-
20	Stilo	38.50	16.42	7	11	0.77	3.66	0.00	0.00
21	Zomaro	38.30	16.10	8	-	0.65	3.22	-	-
22	Melia	38.23	15.72	8	-	0.53	2.64	-	-
23	Gambarie	38.17	15.83	9	15	0.67	3.38	0.00	0.00
24	Rifugio Giardini	38.15	15.93	5	-	0.61	3.02	-	-
25	Rifugio Canovai	38.13	15.95	5	-	0.56	2.67	-	-
26	Samo	38.10	16.02	8	-	0.45	2.33	-	-
27	Mosorrofa	38.09	15.73	7	-	0.50	2.52	-	-

Tabella 12. *continua*

28	Cardeto	38.08	15.75	6	-	0.50	2.42	-	-
29	Condofuri	37.99	15.87	9	-	0.56	2.80	-	-

Tabella 13. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 28 popolazioni di *Bufo bufo* taxon settentrionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Lerma	44.62	8.71	10	4	0.57	3.78	0.50	0.00
2	Varese Ligure	44.48	9.61	10	3	0.41	2.97	0.00	0.00
3	San Giorgio a Bavari	44.43	9.01	9	-	0.46	3.14	-	-
4	Monte San Pietro	44.36	11.11	10	-	0.57	3.99	-	-
5	Albisola Superiore	44.34	8.50	10	5	0.41	2.52	0.90	0.01
6	Cerreto Laghi	44.30	10.24	10	-	0.48	3.33	-	-
7	Campo Tizzoro	44.04	10.86	-	3	-	-	0.67	0.00
8	Ciola	43.98	12.13	10	-	0.51	3.62	-	-
9	Terranuova Bracciolini	43.56	11.57	10	6	0.55	3.51	1.00	0.00
10	Serra San Quirico	43.43	13.04	9	-	0.49	3.52	-	-
11	Teramo	42.69	13.72	10	-	0.48	3.09	-	-
12	San Gemini	42.61	12.56	10	5	0.48	3.29	1.00	0.00
13	Scoppito	42.36	13.27	10	-	0.56	3.86	-	-
14	Rocca Sinibalda	42.28	12.93	-	3	-	-	0.00	0.00
15	Fara Filorum Petri	42.25	14.19	10	3	0.50	3.49	1.00	0.01
16	Canale Monterano	42.14	12.10	-	6	-	-	0.73	0.00
17	Jenne	41.89	13.17	-	5	-	-	0.90	0.00
18	Opi	41.79	13.81	9	3	0.46	3.16	1.00	0.00
19	Doganella	41.75	12.76	9	4	0.58	3.85	0.00	0.00
20	San marco la Catola	41.54	15.04	-	3	-	-	0.00	0.00
21	Bosco del Foglino	41.47	12.72	-	3	-	-	1.00	0.00
22	San Pietro Infine	41.44	13.97	-	3	-	-	0.67	0.00
23	Lago Matese	41.41	14.41	-	5	-	-	1.00	0.01
24	Grata	41.28	13.71	-	3	-	-	0.67	0.01
25	Molella	41.27	13.05	-	4	-	-	0.50	0.00
26	Camposauro	41.17	14.58	-	5	-	-	0.80	0.00
27	Tufara	41.06	14.71	-	3	-	-	0.67	0.00
28	Monticchio	40.93	15.60	-	5	-	-	0.00	0.00

Tabella 14. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 24 popolazioni di *Bufo bufo* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Fara Filorum Petri	42.25	14.19	10	3	0.50	3.49	1.00	0.01
2	Opi	41.79	13.81	9	-	0.46	3.16	-	-
3	Doganella	41.75	12.76	9	-	0.58	3.85	-	-
4	San marco la Catola	41.54	15.04	8	-	0.37	2.24	-	-
5	Lago Matese	41.41	14.41	10	5	0.61	4.09	1.00	0.01
6	Biccari	41.37	15.17	10	3	0.53	3.35	0.67	0.00
7	Grata	41.28	13.71	10	3	0.49	3.32	0.67	0.01
8	Tufara	41.06	14.71	9	-	0.55	3.50	-	-
9	Spinazzola	41.00	16.06	7	-	0.57	3.95	-	-
10	Monticchio	40.93	15.60	10	-	0.49	2.39	-	-
11	Lago Laceno	40.81	15.10	8	8	0.50	3.22	0.61	0.00
12	Tricarico	40.62	16.15	9	3	0.50	3.16	0.67	0.00
13	Lecce	40.35	18.17	8	5	0.42	2.61	0.40	0.00
14	Campora	40.29	15.33	10	3	0.54	3.63	0.00	0.00
15	Lago Cessuta	40.25	15.78	9	5	0.54	3.87	0.40	0.00
16	Contrada Massadita	39.94	15.81	-	4	-	-	0.83	0.00
17	Orsomarso	39.80	15.91	10	3	0.43	2.63	0.00	0.00
18	Lago Farneto	39.66	16.16	10	5	0.35	2.79	0.40	0.00
19	Fagnano Castello	39.56	16.02	8	-	0.48	3.23	-	-
20	Macchialonga	39.34	16.58	9	-	0.43	2.79	-	-
21	Fiumefreddo Bruzio	39.23	16.07	8	5	0.41	3.16	0.00	0.00
22	Lago dell'Angitola	38.74	16.24	10	3	0.47	2.77	0.67	0.00
23	Oppido Mamertino	38.29	15.99	-	5	-	-	0.00	0.00
24	Gambarie	38.18	15.85	10	7	0.53	3.72	0.29	0.00

Tabella 15. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 16 popolazioni di *Hyla perrini* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	San Daniele	46.16	13.04	-	5	-	-	0.73	0.00
2	Udine	46.15	13.15	10	-	0.10	1.21	-	-
3	Malina	46.10	13.31	11	-	0.14	1.25	-	-
4	Preval	46.03	12.42	15	-	0.13	1.28	-	-
5	Pordenone	45.95	12.64	16	-	0.09	1.18	-	-
6	Turriaco	45.87	13.47	41	-	0.13	1.25	-	-
7	Schiavetti	45.82	13.56	21	-	0.14	1.24	-	-
8	Bavaria	45.81	12.19	17	5	0.11	1.21	1.00	0.01
9	Cona	45.75	13.53	12	-	0.13	1.21	-	-
10	Punta Sabbioni	45.45	12.41	6	-	0.10	1.17	-	-
11	Novara	45.43	8.68	22	5	0.09	1.15	0.40	0.00
12	Cavarzere	45.13	12.07	7	-	0.11	1.21	-	-
13	Cremona	45.12	10.03	15	4	0.08	1.14	0.00	0.00
14	Torino	44.87	7.69	8	4	0.13	1.22	0.50	0.00
15	Langhirano	44.63	10.28	-	4	-	-	0.50	0.00
16	Punta Alberete	44.50	12.25	17	8	0.11	1.26	0.64	0.00

Tabella 16. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 14 popolazioni di *Hyla intermedia* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Verucchio	44.07	12.26	-	6	-	-	0.73	0.00
2	Magliano	44.00	12.08	24	8	0.10	1.21	0.75	0.07
3	Bagno Di Romagna	43.84	11.97	9	7	0.05	1.14	0.29	0.03
4	Firenze	43.76	11.23	16	5	0.07	1.18	0.70	0.00
5	San Lorenzo	43.60	12.95	19	5	0.06	1.14	0.70	0.00
6	Roseto	42.67	13.98	-	5	-	-	0.00	0.00
7	San Giovanni Rotondo	41.75	15.88	20	19	0.02	1.05	0.05	0.01
8	Ostia	41.72	12.33	11	5	0.04	1.12	0.40	0.00
9	Latina	41.48	12.95	10	4	0.02	1.05	0.83	0.00
10	Lago Remmo	40.14	15.84	21	9	0.05	1.14	0.78	0.01
11	Macchia Longa	39.37	16.60	15	5	0.06	1.16	0.80	0.00
12	Fiumefreddo	39.24	16.06	8	5	0.06	1.12	0.40	0.00
13	Pizzo Calabro	38.71	16.16	23	17	0.06	1.13	0.80	0.00
14	Gambarie	38.17	15.84	36	10	0.05	1.12	0.47	0.00

Tabella 17. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 17 popolazioni di *Phelophylax lessonae* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h : diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Torino	45.10384	7.48078	-	14	-	-	0.6590	0.0017
2	Dosolo	44.95387	10.64078	-	8	-	-	0.6430	0.0018
3	Punta Alberete	44.52019	12.22358	-	9	-	-	0.2220	0.0007
4	Firenze	43.78196	11.09523	-	5	-	-	0.8000	0.0016
5	Macerata	43.32622	13.42449	-	6	-	-	0.3330	0.0005
6	Castelluccio	42.82453	13.21386	-	4	-	-	0.0000	0.0000
7	Fiume Tavo	42.46062	14.07208	-	4	-	-	0.5000	0.0016
8	Piani di Paterno	42.38305	13.01415	-	4	-	-	0.0000	0.0000
9	Vieste	41.88176	16.17273	-	3	-	-	0.6670	0.0011
10	Macchia Longa	41.70477	13.73190	-	5	-	-	0.4000	0.0013
11	Fondi	41.36862	13.43775	-	3	-	-	0.6670	0.0022
12	Sala Consilina	40.39482	15.59180	-	9	-	-	0.7780	0.0016
13	Lago dei Due Uomini	39.55276	16.02209	-	6	-	-	0.6000	0.0016
14	Lago Angitola	38.74218	16.24152	-	5	-	-	0.8000	0.0026
15	Monasterace	38.44674	16.56467	-	5	-	-	0.7000	0.0019
16	Zomaro	38.30933	16.10520	-	5	-	-	0.4000	0.0007
17	Fiumara La Verde	38.06241	16.05388	-	5	-	-	0.8000	0.0016

Tabella 18. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 28 popolazioni di *Rana dalmatina* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Foresta Umbra	41.85	16.02	8	8	0.63	2.88	0.46	0.00
2	Pescolanciano	41.67	14.33	1	-	0.79	3.77	-	-
3	Civitanova del Sannio	41.63	14.38	9	-	0.79	3.77	-	-
4	Guardiaregia	41.46	14.56	9	-	0.59	2.39	-	-
5	Monticchio	40.93	15.60	10	-	0.72	3.39	-	-
6	Piani di Verteglia	40.83	14.98	10	-	0.76	3.81	-	-
7	Contursi Terme	40.63	15.23	8	-	0.70	3.26	-	-
8	Marsico Nuovo	40.47	15.76	10	-	0.83	4.12	-	-
9	Piaggine	40.33	15.40	9	-	0.82	4.08	-	-
10	Castelsaraceno	40.13	15.99	4	-	0.78	4.13	-	-
11	Acqualisalti	39.98	15.87	5	6	0.66	2.97	0.53	0.00
12	Lagofondo	39.92	16.23	5	8	0.82	4.08	0.61	0.00
13	Massadita	39.85	16.30	5	6	0.54	2.45	0.00	0.00
14	Santa Domenica in Talao	39.82	15.87	6	8	0.71	3.19	0.25	0.00
15	Ficara	39.65	16.12	4	4	0.67	3.13	0.83	0.00
16	Lago Trifoglietti	39.55	16.02	9	9	0.84	4.36	0.92	0.00
17	Macchialonga	39.37	16.53	4	12	0.80	3.95	0.17	0.00
18	San Pietro in Guarano	39.33	16.30	5	7	0.77	3.63	0.86	0.00
19	Campo San Lorenzo	39.33	16.48	6	11	0.87	4.45	0.67	0.00
20	San Lucido	39.28	16.08	5	19	0.81	4.30	0.82	0.00
21	Cerisano	39.25	16.15	8	8	0.66	3.12	0.75	0.00
22	Bel Monte Calabro	39.17	16.08	5	13	0.84	4.20	0.74	0.00
23	Lago di Angitola	39.12	16.10	6	6	0.87	4.50	0.87	0.00
24	Zomaro	38.67	15.98	3	3	0.94	5.17	0.00	0.00
25	Capo Vaticano	38.65	16.02	7	-	0.67	3.13	-	-
26	Capo Vaticano	38.65	16.02	-	10	-	-	0.64	0.00
27	Serra San Bruno	38.60	16.33	8	18	0.80	3.87	0.82	0.00
28	Gambarie	38.17	15.83	9	10	0.85	4.19	0.20	0.00

Tabella 19. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 27 popolazioni di *Rana italica* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Borgo San Lorenzo	43.91	11.37	-	3	-	-	0.00	0.00
2	Bagno di Romagna	43.83	11.95	7	6	0.00	1.00	0.00	0.00
3	Verghereto	43.79	12.00	9	9	0.03	1.05	0.00	0.00
4	Impruneta	43.69	11.24	12	10	0.00	1.00	0.00	0.00
5	Ceselli	42.87	13.06	10	10	0.02	1.05	0.00	0.00
6	Blera	42.30	12.05	6	-	0.03	1.08	-	-
7	Percile	42.06	12.90	6	4	0.02	1.05	0.67	0.00
8	Guardiaregia	41.43	14.54	10	8	0.08	1.20	0.54	0.00
9	Serino	40.84	15.84	8	4	0.11	1.29	0.00	0.00
10	Sorgente ausofasanella	40.46	15.34	14	14	0.10	1.28	0.39	0.00
11	Vesalo	40.28	15.36	12	-	0.11	1.28	-	-
12	Rofrano	40.21	15.42	-	10	-	-	0.51	0.00
13	Peschiera	40.07	16.10	7	7	0.08	1.19	0.29	0.00
14	Viggianello	39.97	16.08	27	9	0.09	1.24	0.00	0.00
15	San Lorenzo Bellizzi	39.88	16.33	6	6	0.11	1.27	0.00	0.00
16	Parantoro	39.40	16.13	6	5	0.09	1.21	0.70	0.00
17	Campora San Giovanni	39.10	16.13	9	-	0.05	1.17	-	-
18	Campone	39.10	16.13	-	4	-	-	0.83	0.00
19	Taverna	39.02	16.58	23	9	0.03	1.08	0.22	0.00
20	Cardinale	38.64	16.39	11	5	0.07	1.20	0.70	0.00
21	Serra San Bruno	38.58	16.34	10	11	0.11	1.26	0.35	0.00
22	Stilo	38.50	16.44	12	12	0.11	1.26	0.32	0.00
23	Galatro	38.43	16.16	10	10	0.12	1.28	0.67	0.00
24	Zomaro	38.34	16.15	11	11	0.07	1.17	0.71	0.01
25	Carmelia	38.23	15.92	8	9	0.10	1.25	0.22	0.00
26	Gambarie	38.17	15.83	9	11	0.09	1.24	0.33	0.00
27	Cardeto	38.09	15.76	14	6	0.08	1.21	0.00	0.00

Tabella 20. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 8 popolazioni di *Rana temporaria* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Pellice	44.80	7.66	-	10	-	-	0.00	0.00
2	F.Lame	44.49	9.42	-	8	-	-	0.25	0.00
3	L.Tina	44.44	8.69	-	9	-	-	0.00	0.00
4	C.Maddalena	44.42	6.90	-	10	-	-	0.60	0.00
5	Bardineto	44.19	8.15	-	10	-	-	0.36	0.00
6	Scaffaiolo	44.14	10.81	-	8	-	-	0.00	0.00
7	Monesi	44.12	7.81	-	9	-	-	0.75	0.00
8	Laga	42.70	13.13	-	10	-	-	0.73	0.00

Tabella 21. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 23 popolazioni di *Testudo hermanni hermanni* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Camaioere	43.950618	10.293745	4	-	0.7015	2.072	-	-
2a	Pian di Rocca	42.812566	10.829679	9	-	0.5614	1.633	-	-
2b	Uccellina	42.63975	11.098837	2	-	0.5614	1.633	-	-
3	Tolfa	42.106865	12.104528	8	-	0.6085	1.754	-	-
4	Macchiagrande	41.83269	12.218647	11	9	0.6649	1.938	0.556	0.00507
5	Castelporziano	41.688274	12.391721	9	8	0.5809	1.73	0.464	0.00169
6	Sabaudia	41.352562	13.05253	5	-	0.6569	1.975	-	-
7	Baia Domizia	41.221997	13.771167	6	-	0.4282	1.495	-	-
8	Torino di Sangro	42.226762	14.539415	22	13	0.594	1.829	0.41	0.00338
9	Larino	41.800646	14.915603	4	-	0.5274	1.522	-	-
10	Campomarino	41.954435	15.04424	4	-	0.5491	1.693	-	-
11	Lesina	41.893975	15.357155	17	7	0.573	1.716	0.524	0.0029
12	Laterza	40.624959	16.818727	3	-	0.3714	1.425	-	-
13	Tarsia	39.615556	16.27159	3	-	0.6833	1.917	-	-
14	Roggiano Gravina	39.580722	16.167879	3	-	0.5583	1.85	-	-
15	San Marco Argentano	39.553622	16.11326	9	-	0.5663	1.675	-	-
16a	Campana	39.403042	16.831201	1	-	0.5997	1.781	-	-
16b	Strongoli	39.25948	17.030742	1	-	0.5997	1.781	-	-
16c	Verzino	39.31444	16.858294	2	-	0.5997	1.781	-	-
17a	San Giovanni in Fiore	39.216993	16.760846	2	-	0.5727	1.845	-	-
17b	Santa Rita	39.194518	16.792786	13	-	0.5727	1.845	-	-
18a	Rocca Bernarda	39.133052	16.879437	4	-	0.6597	1.96	-	-
18b	Santa Severina	39.130216	16.90515	2	-	0.6597	1.96	-	-
19	San Mauro Marchesato	39.104084	16.917893	3	-	0.3917	1.533	-	-
20a	Botricello	38.939306	16.833361	2	-	0.5042	1.742	-	-
20b	Calabricata	38.923784	16.74102	1	-	0.5042	1.742	-	-
21	Simeri Cricchi	38.952861	16.650333	8	-	0.5028	1.639	-	-

Tabella 21. *continua*

22	Vibo Curinga	38.823312	16.305956	8	-	0.4679	1.604	-	-
23	San Luca	38.225773	16.03799	3	-	0.4292	1.367	-	-

Tabella 22. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 12 popolazioni di *Podarcis muralis* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h: diversità nucleotidica.

				Dimensione del campione					
Sito		Lat. N	Long. E	nDNA	mtDNA	H _E	A _r	h	π
1a	Peschiera del Garda	45.42	10.99	-	3	-	-	0.50	0.01
1b	Verona	45.44	10.67	-	1	-	-	0.50	0.01
2a	Bereguardo	45.26	9.04	-	2	-	-	0.90	0.01
2c	Pavia	45.17	9.18	-	3	-	-	0.90	0.01
3a	Ravenna	44.40	12.21	-	1	-	-	1.00	0.02
3b	Cesena	44.14	12.26	-	2	-	-	1.00	0.02
4a	Firenze	43.77	11.25	-	1	-	-	0.67	0.00
4b	Calci	43.71	10.52	-	1	-	-	0.67	0.00
4c	Pisa	43.72	10.41	-	1	-	-	0.67	0.00
5a	Genga	43.43	12.94	-	2	-	-	1.00	0.02
5b	Monte San Vicino	43.33	13.05	-	1	-	-	1.00	0.02
5c	Ancona	43.61	13.52	-	1	-	-	1.00	0.02
5d	Visso	42.93	13.08	-	1	-	-	1.00	0.02
6a	Ostia Antica	41.75	12.31	-	1	-	-	0.84	0.01
6b	Borgo Montello	41.51	12.78	-	3	-	-	0.84	0.01
6c	Latina	41.48	12.99	-	2	-	-	0.84	0.01
6d	Bassiano	41.55	13.05	-	2	-	-	0.84	0.01
6e	Fondi	41.37	13.33	-	2	-	-	0.84	0.01
7a	Gargano	41.72	15.75	-	3	-	-	0.83	0.00
7b	Foresta Umbra	41.77	16.00	-	1	-	-	0.83	0.00
8	Monti Alburni	40.54	15.35	-	3	-	-	1.00	0.01
9a	Pollino1	39.79	16.26	-	3	-	-	0.93	0.00
9b	Pollino2	39.90	16.19	-	2	-	-	0.93	0.00
9c	Pollino3	39.93	16.17	-	1	-	-	0.93	0.00
10	Fago del Soldato	39.35	16.55	-	3	-	-	0.67	0.02
11a	Caramanico	42.16	14.01	-	1	-	-	1.00	0.01
11b	Majelletta	42.16	14.13	-	2	-	-	1.00	0.01
12a	Paganico	42.19	13.00	-	1	-	-	1.00	0.03

Tabella 22. *continua*

12b	L'Aquila	42.34	13.40	-	1	-	-	1.00	0.03
12c	Gran Sasso	42.49	13.59	-	1	-	-	1.00	0.03

Tabella 23. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 24 popolazioni di *Talpa romana* campionate per le analisi della variazione genetica. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Assisi	43.07	12.62	4	-	0	1	-	-
2	Prati di Tivo	42.50	13.55	11	5	0.0209	1.03727	0.7	0.00211
3	Tarquinia	42.25	11.77	9	4	0.0416	1.0746	0.833	0.00234
4	Paliano	41.80	13.05	50	6	0.0065	1.01263	0.6	0.00117
5	Gargano	41.80	16.10	11	-	0.0104	1.01887	-	-
6	Policoro	40.25	16.65	6	-	0.0267	1.04713	-	-
7	Lecce	40.17	18.30	3	4	0	1	0.5	0.00088
8	Lagonegro	40.08	15.80	-	26	-	-	0.969	0.01525
9	Pollino	40.02	16.12	-	6	-	-	0.867	0.00561
10	Mormanno	39.90	15.95	4	4	0.0262	1.0442	0.833	0.00614
11	Malvito	39.60	16.03	9	10	0.0732	1.13107	0.822	0.01053
12	Acri	39.50	16.37	9	8	0.0858	1.15817	0.929	0.00113
13	Torretta	39.45	17.02	4	-	0.0742	1.12687	-	-
14	Arcavata	39.35	16.20	-	4	-	-	1	0.01316
15	Camigliatello	39.33	16.43	5	5	0.0763	1.13217	0.4	0.00561
16	Fiumefreddo	39.23	16.07	21	32	0.0848	1.15973	0.615	0.00268
17	Decollatura	39.05	16.35	31	16	0.0726	1.13443	0.692	0.00641
18	Girifalco	38.82	16.43	30	22	0.1136	1.2148	0.965	0.00961
19	Borgia	38.82	16.50	18	3	0.1091	1.20527	1	0.01053
20	Roccelletta	38.82	16.58	19	18	0.107	1.19397	0.967	0.0066
21	Mongiana	38.50	16.30	19	17	0.1375	1.25227	0.868	0.00181
22	Melia	38.22	15.75	11	10	0.1153	1.1996	0.844	0.00253
23	Gambarie	38.15	15.82	12	13	0.1158	1.21053	0.949	0.01329
24	Bova	37.98	15.93	16	13	0.0959	1.16997	0.769	0.0072

Tabella 24. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 3 popolazioni di *Sciurus meridionalis* campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplo-tipica; h : diversità nucleotidica.

	Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
				nDNA	mtDNA				
1	Pollino	39.95	16.04	5	4	0.35	2.40	0.50	0.00
2	Sila	39.10	16.53	23	20	0.34	2.23	-	-
3	Aspromonte	38.16	15.83	8	7	0.09	1.35	0.67	0.00

Tabella 25. Posizione geografica, dimensione del campione (N), e stima della diversità genetica nucleare e mitocondriale per le 3 popolazioni di *Myodes glareolus* taxon meridionale campionate per le analisi della variazione genetica e utilizzate per le interpolazioni. H_E : eterozigosi attesa calcolata senza bias (Nei's, 1978) ; A_r : ricchezza allelica; π : diversità aplotipica; h: diversità nucleotidica.

Sito	Lat. N	Long. E	Dimensione del campione		H_E	A_r	h	π
			nDNA	mtDNA				
Sila	39.2	16.4	14	7	0.7526	2.687	0.952	0.00546
Cosenza	39.3	16.1	3	3	0.7667	2.687	0.667	0.00068
Aspromonte	38.17	15.84	8	5	0.6465	2.357	0.9	0.00453

Tabella 26. Percentuali di copertura del SAP e del SAP e della rete Natura 2000 per ciascun hotspot di diversità alplotica (h), di diversità nucleotidica (π), di ricchezza allelica (A_r) e di eterozigosi attesa (H_E) per ognuno dei taxa studiati.

Taxon	Aree Protette				Aree Protette + Natura2000			
	h	π	A_r	H_E	h	π	A_r	H_E
<i>Salamandra salamandra gigliolii</i>	74.6	39.9	8.3	8.5	75.58	52.82	25.76	26.00
<i>Salamandrina perspicillata</i>	4.5	3.3	10.7	10.7	10.90	9.92	25.17	23.93
<i>Salamandrina terdigitata</i>	38.3	38.2	21.0	20.8	42.36	42.26	22.72	22.67
<i>Lissotriton italicus</i> N	49.3	14.5	34.2	40.3	51.56	18.97	34.23	41.01
<i>Lisotriton italicus</i> S	1.9	1.2	0.9	1.1	3.84	1.19	0.93	1.06
<i>Lissotriton vulgaris meridionalis</i>	5.3	19.1	-	-	10.62	20.68	-	-
<i>Ichtyosaura alpestris</i> N	16.7	0.7	7.0	0.1	36.31	15.20	21.27	9.50
<i>Ichtyosaura alpestris</i> S	37.6	3.0	3.9	3.7	49.39	22.53	26.62	27.11
<i>Triturus carnifex</i> N	0.4	0.4	3.0	0.8	2.67	2.67	11.60	7.97
<i>Trituturs carnifex</i> S	3.6	4.7	5.3	5.8	11.93	9.78	10.39	11.80
<i>Bombina pachypus</i>	25.5	27.9	22.0	16.7	26.67	28.74	22.68	17.69
<i>Bufo bufo</i> N	6.9	16.6	9.4	10.6	17.10	22.10	15.90	18.95
<i>Bufo bufo</i> S	13.2	13.3	29.5	23.2	28.78	27.06	46.81	43.54
<i>Hyla perrini</i>	1.5	1.5	4.2	1.4	7.79	8.10	13.00	4.91
<i>Hyla intermedia</i>	6.0	9.2	3.4	4.6	7.90	13.21	7.89	8.88
<i>Pelophylax lessonae</i>	7.8	1.4	-	-	12.37	2.06	-	-
<i>Rana dalmatina</i> S	3.9	2.9	32.9	33.0	4.70	3.79	35.43	35.58
<i>Rana italica</i>	11.5	28.5	51.7	51.6	14.73	30.60	55.37	57.27
<i>Rana temporaria</i>	10.9	3.7	-	-	33.34	14.71	-	-
<i>Testudo hermanni hermanni</i>	7.6	2.6	11.5	11.1	18.07	17.04	18.96	14.80
<i>Podarcis muralis</i> S	49.0	20.8	-	-	58.98	22.48	-	-
<i>Talpa romana</i>	20.7	48.8	13.3	14.6	25.73	55.11	14.47	15.98
<i>Sciurus vulgaris meridionalis</i>	22.4	57.3	57.3	58.1	23.67	58.70	61.72	62.56
<i>Myodes glareoulus</i> S	29.8	29.8	34.1	0.0	30.49	30.52	35.04	1.38

Figura 1. Rete dell'attuale Sistema di Aree Protette nazionali e regionali (a) e la Rete Natura 2000 (b).

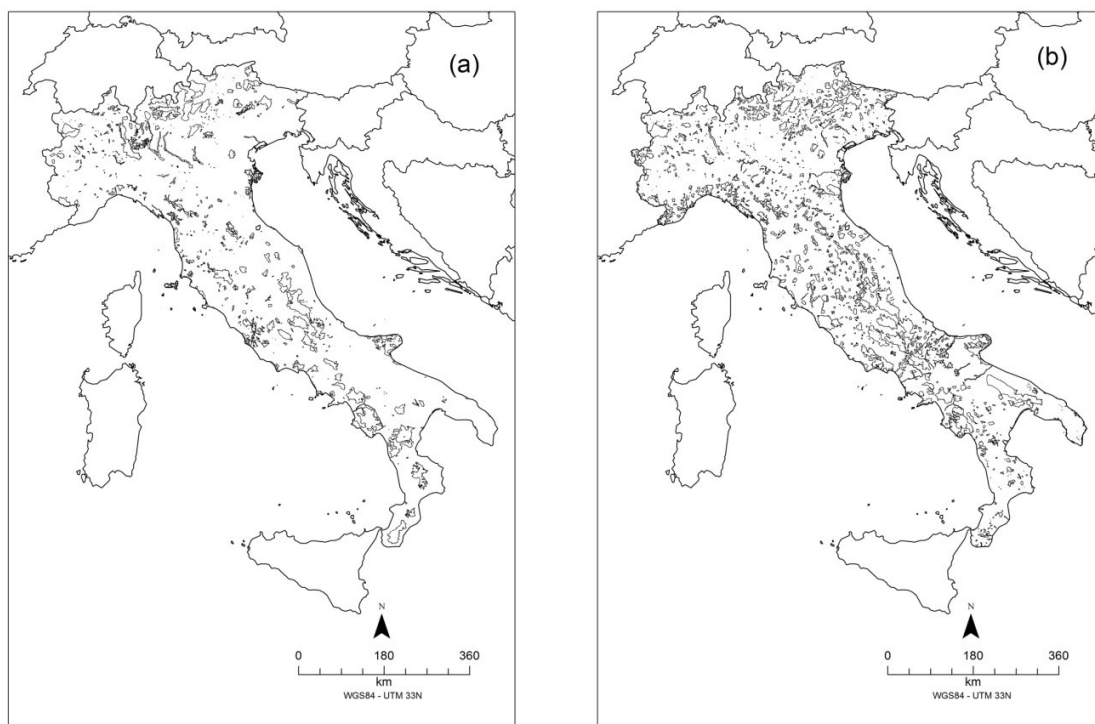


Figura 2. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Salamandra salamandra gigliolii*.

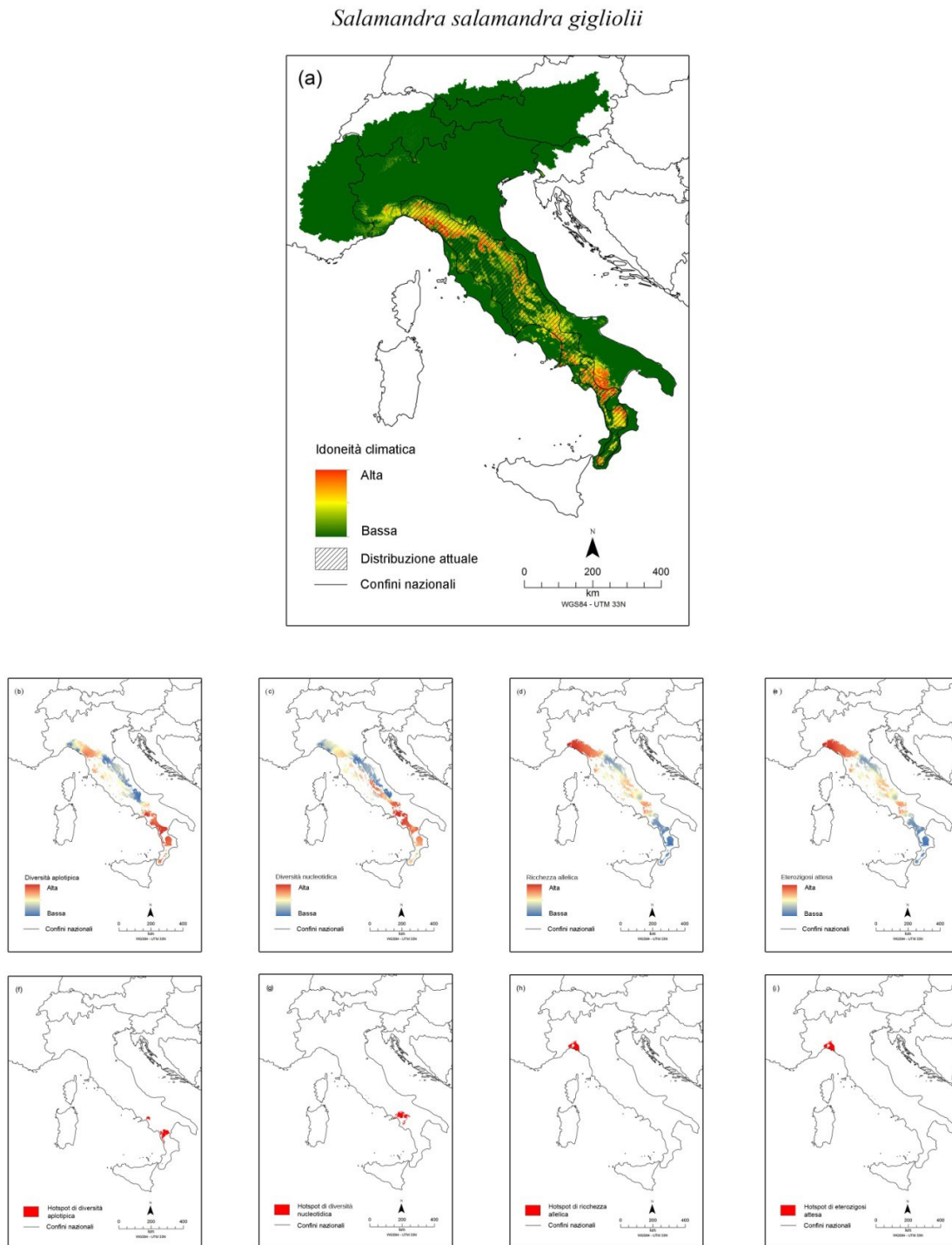


Figura 3. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Salamandrina perspicillata*

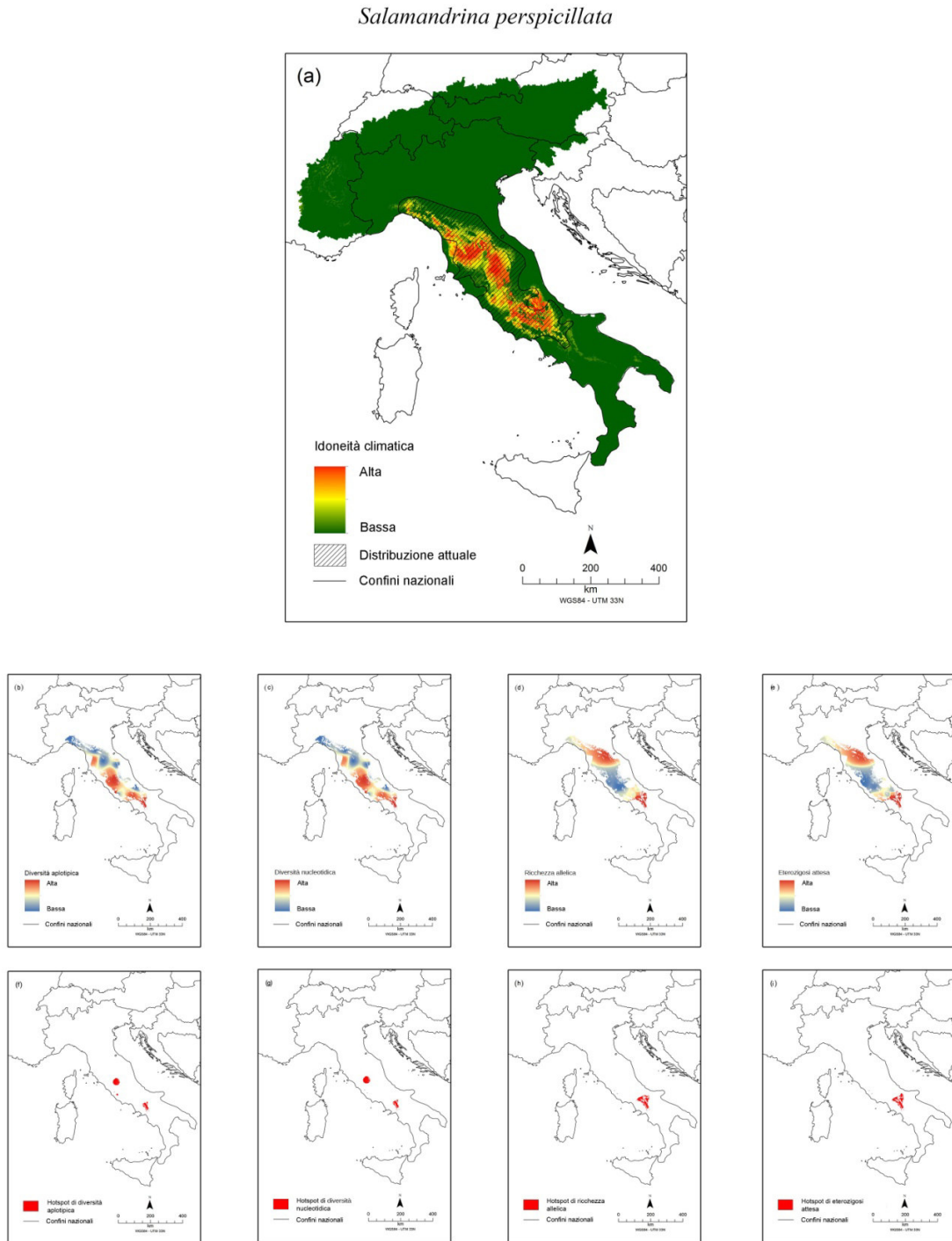


Figura 4. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Salamandrina terdigitata*.

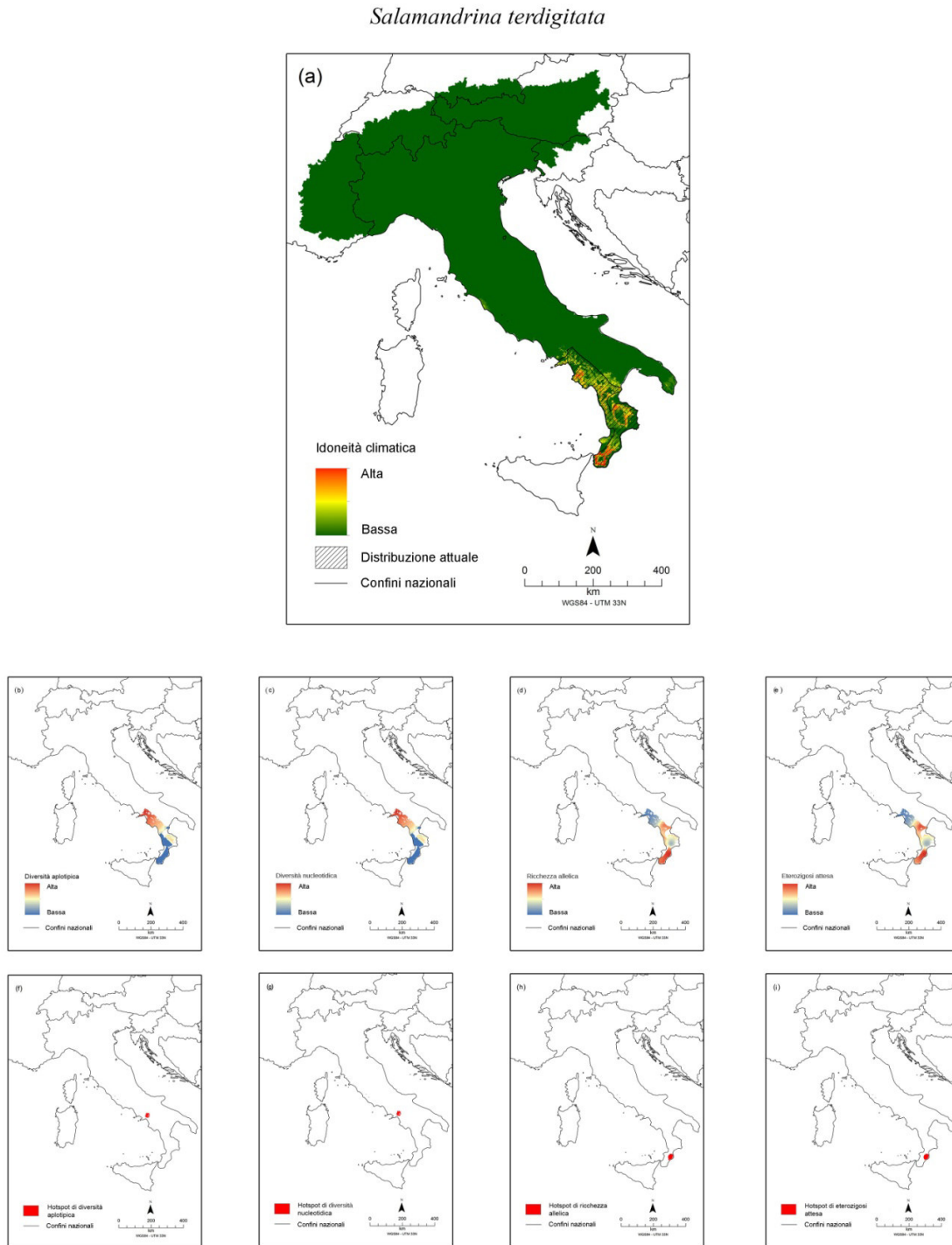


Figura 5. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Lissotriton italicus* taxon settentrionale.

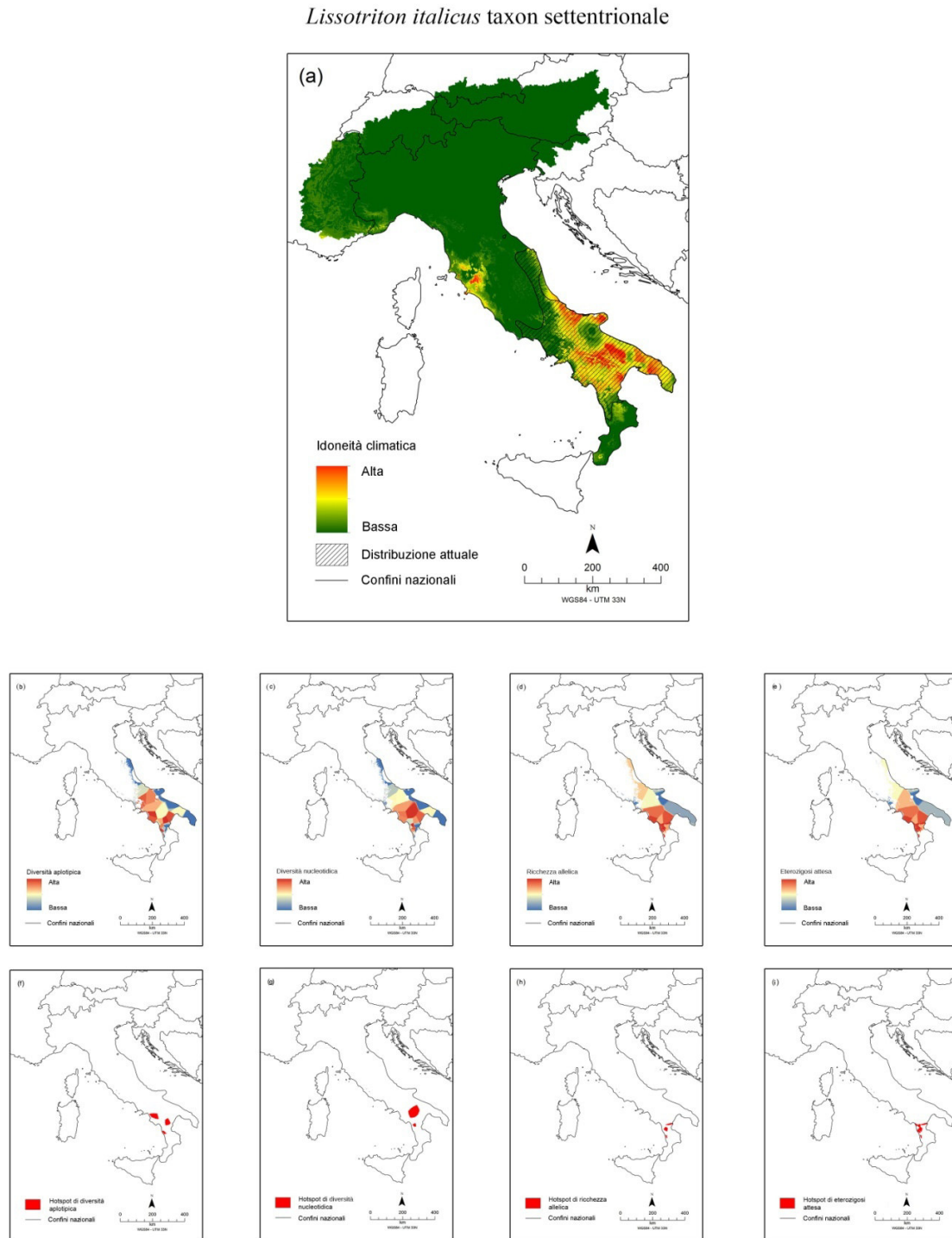


Figura 6. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Lissotriton italicus* taxon meridionale.

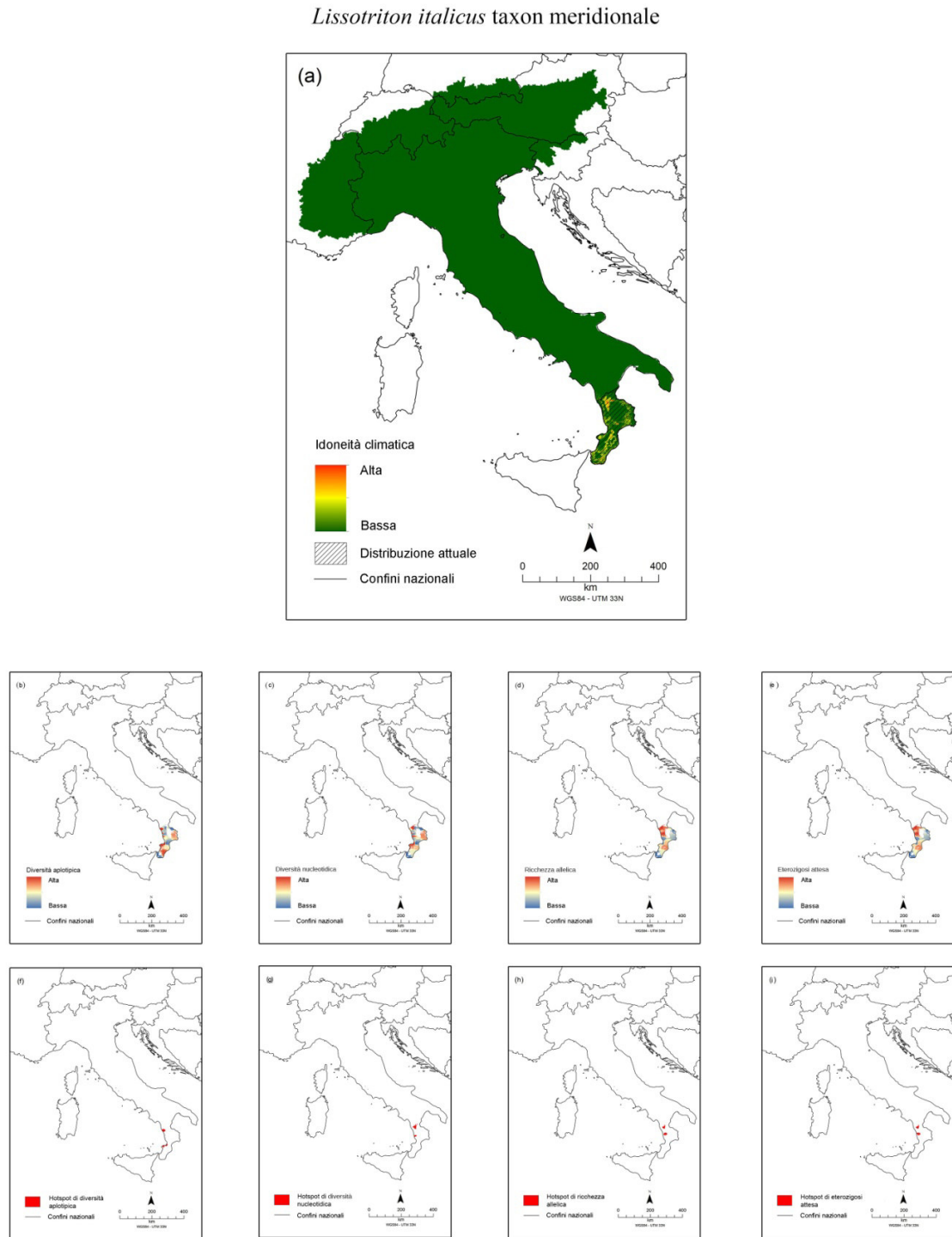


Figura 7. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Lissotriton vulgaris meridionalis*.

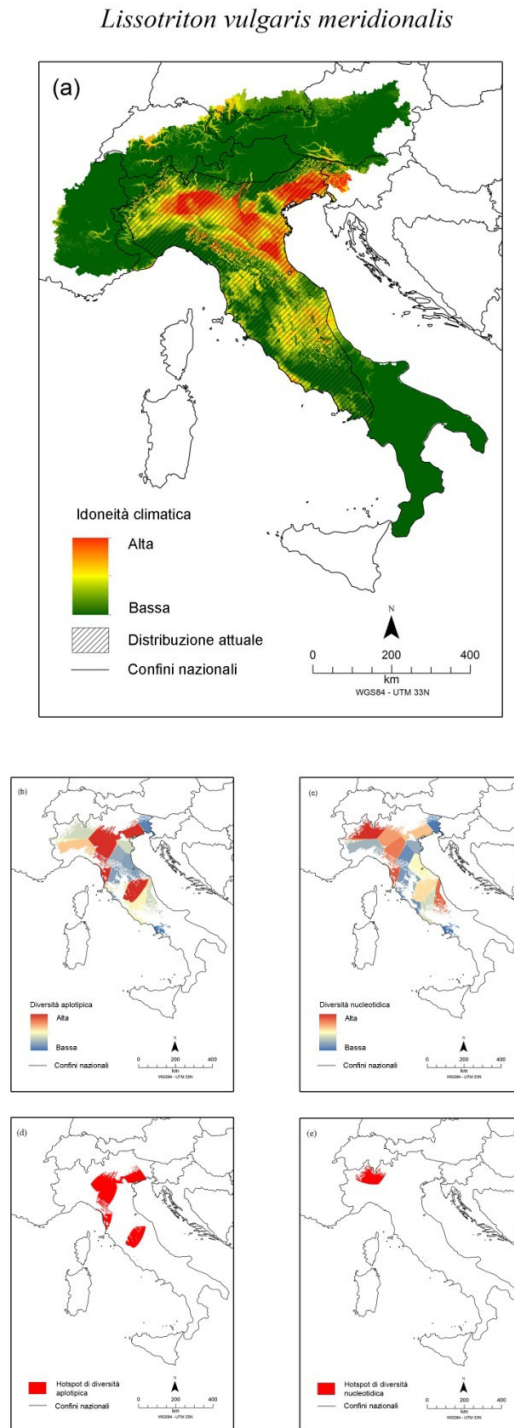


Figura 8. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per l'*Ichthyosaura alpestris* taxon settentrionale.

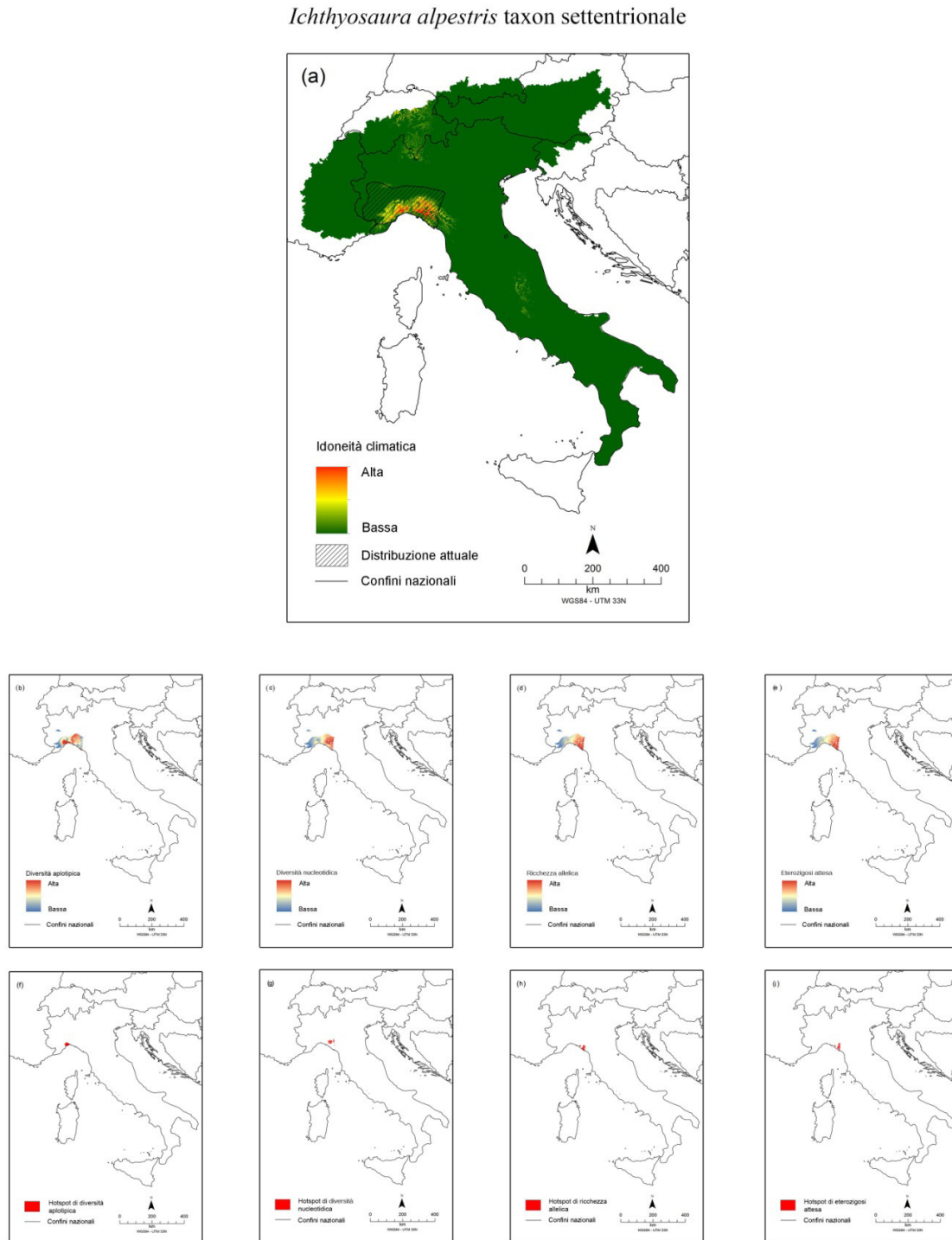


Figura 9. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per l'*Ichthyosaura alpestris* taxon meridionale.

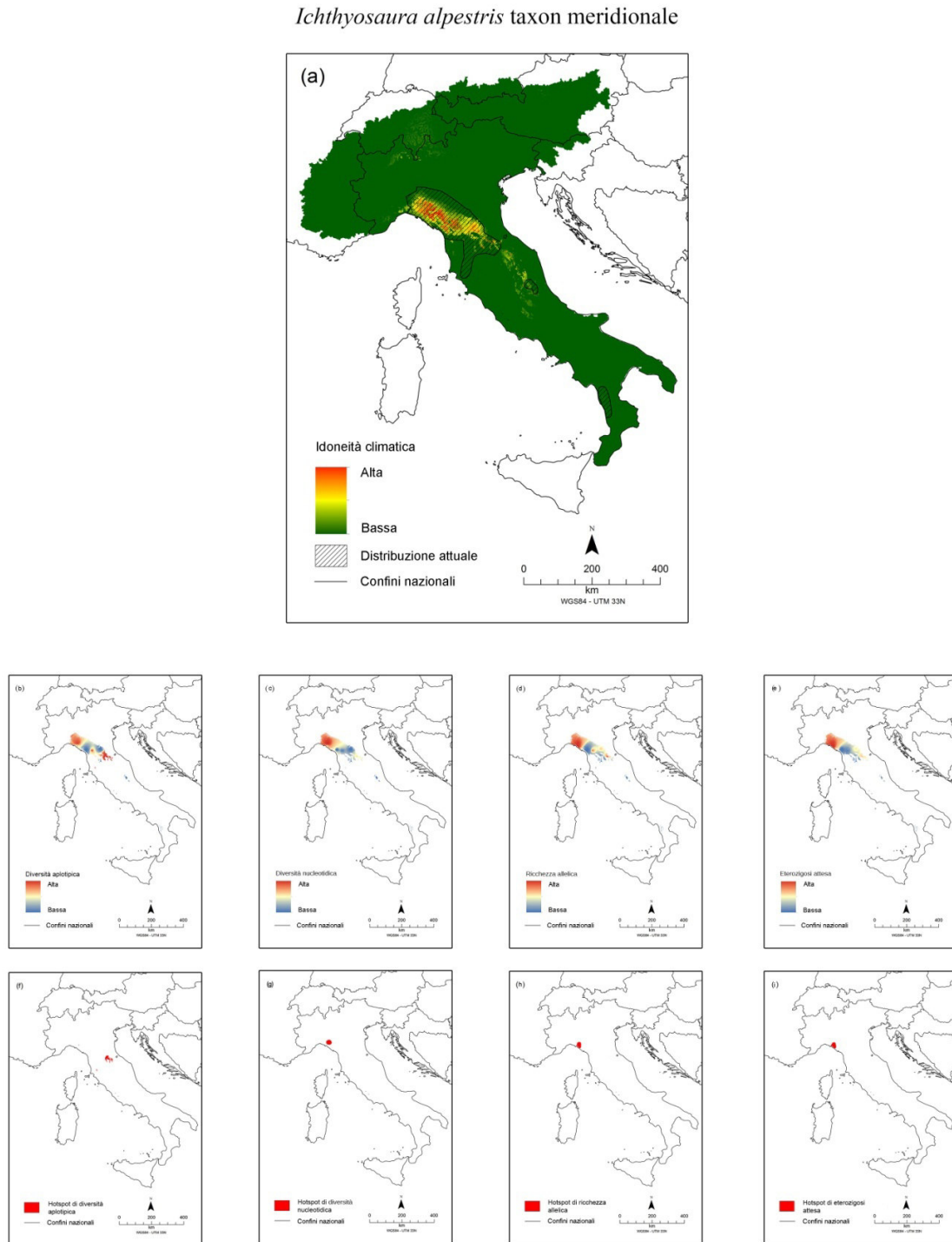


Figura 10. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Triturus carnifex* taxon settentrionale.

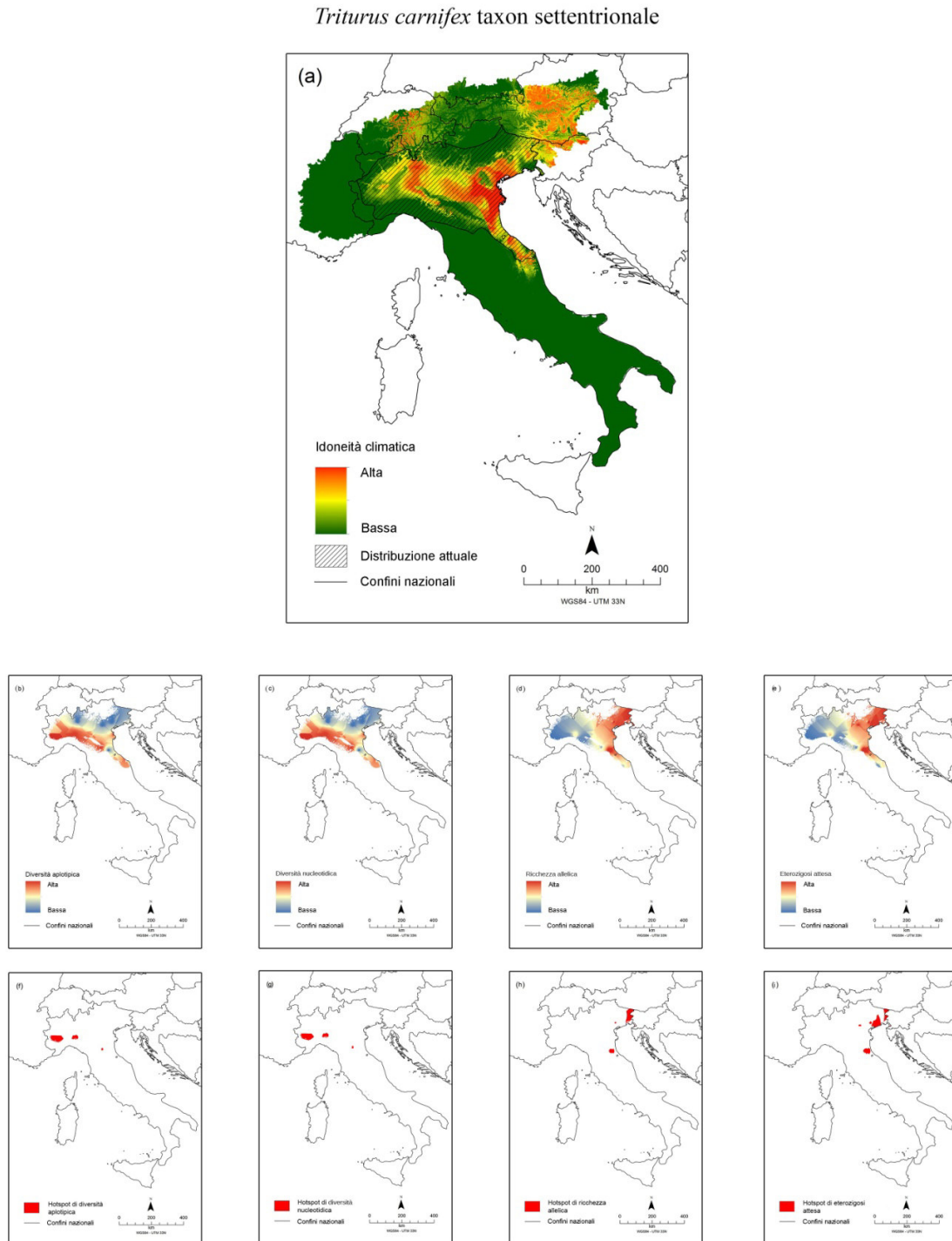


Figura 11. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplotipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Triturus carnifex* taxon meridionale.

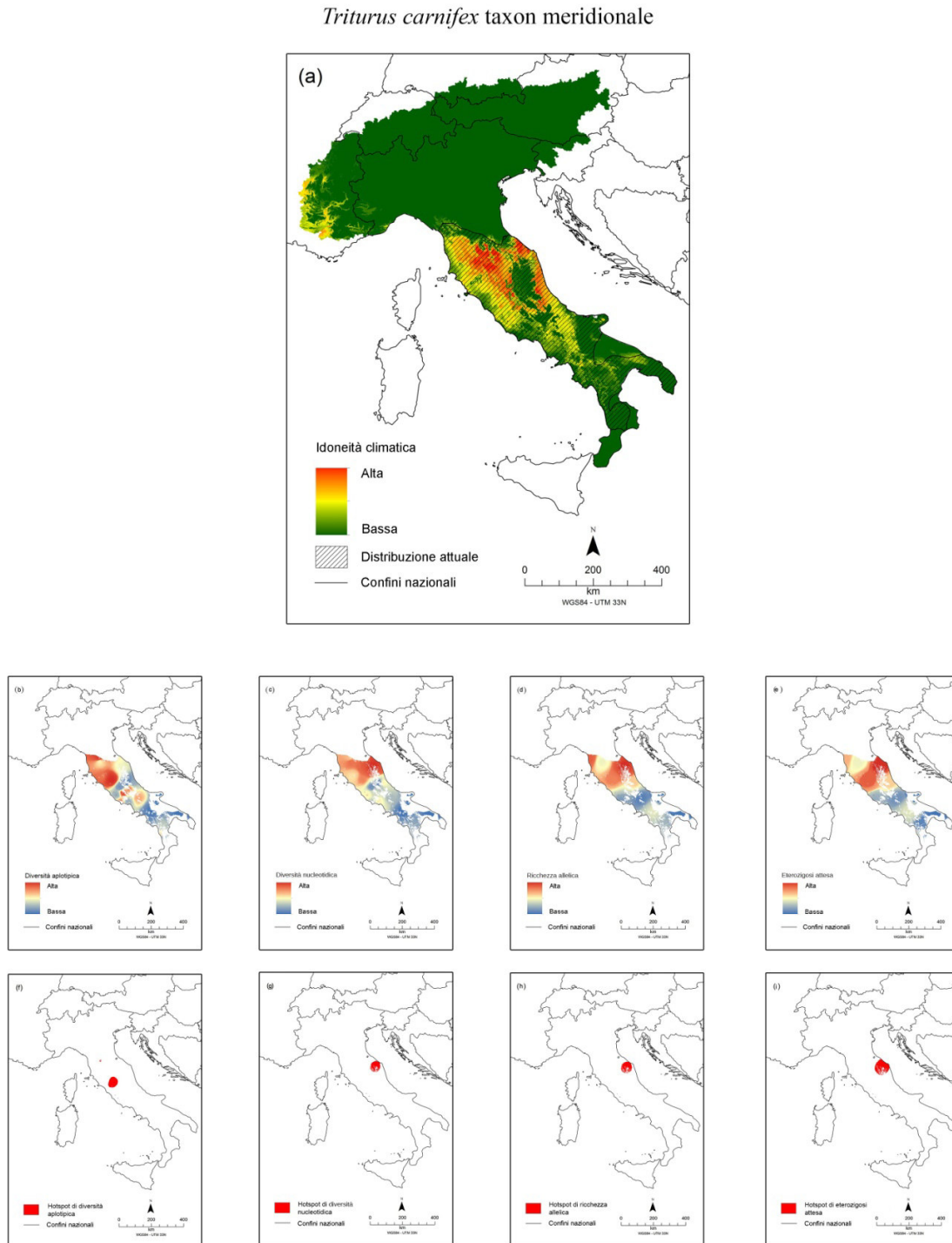


Figura 12. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Bombina pachypus*.

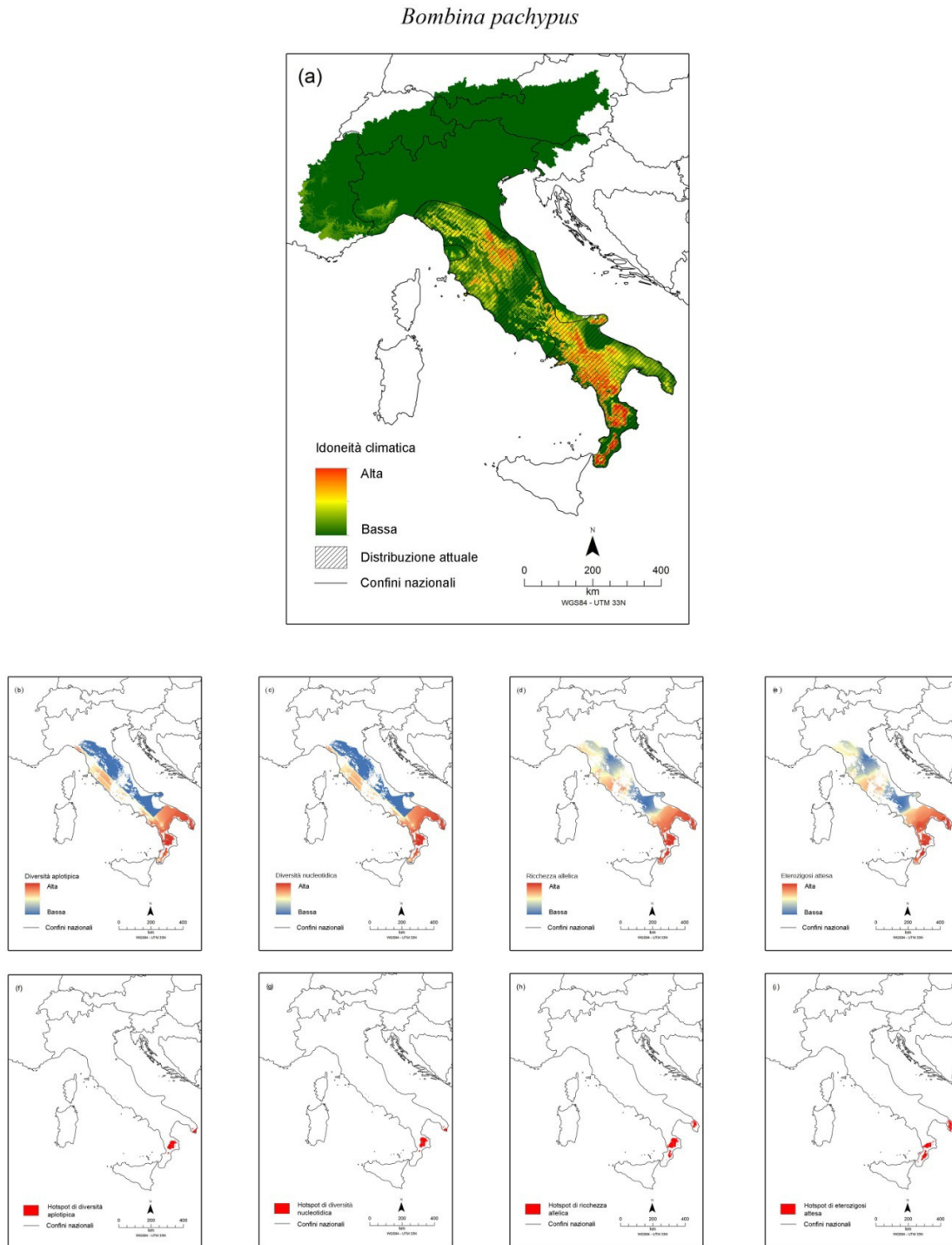


Figura 13. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Bufo bufo* taxon settentrionale.

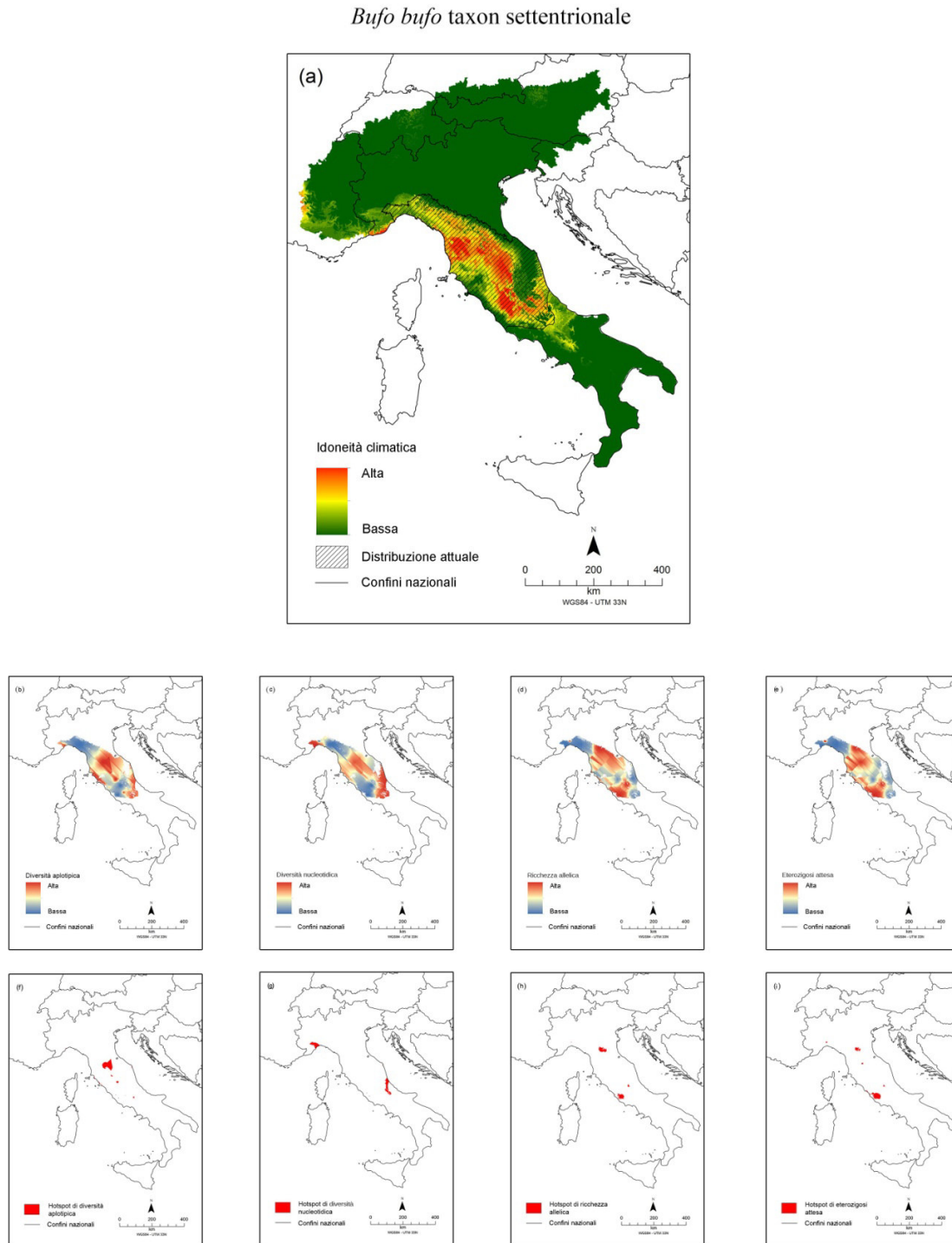


Figura 14. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Bufo bufo* taxon meridionale.

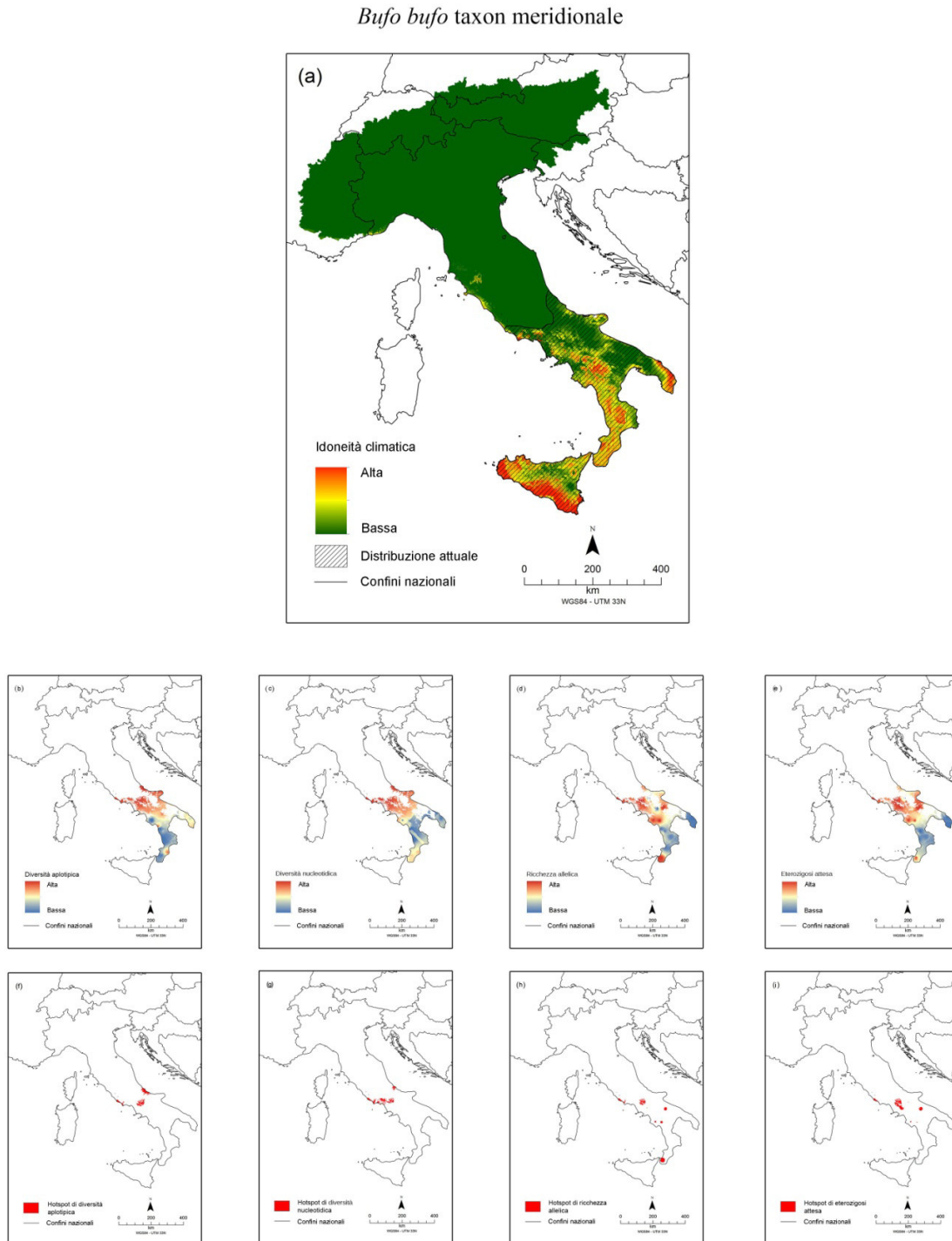


Figura 15. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Hyla perrini*.

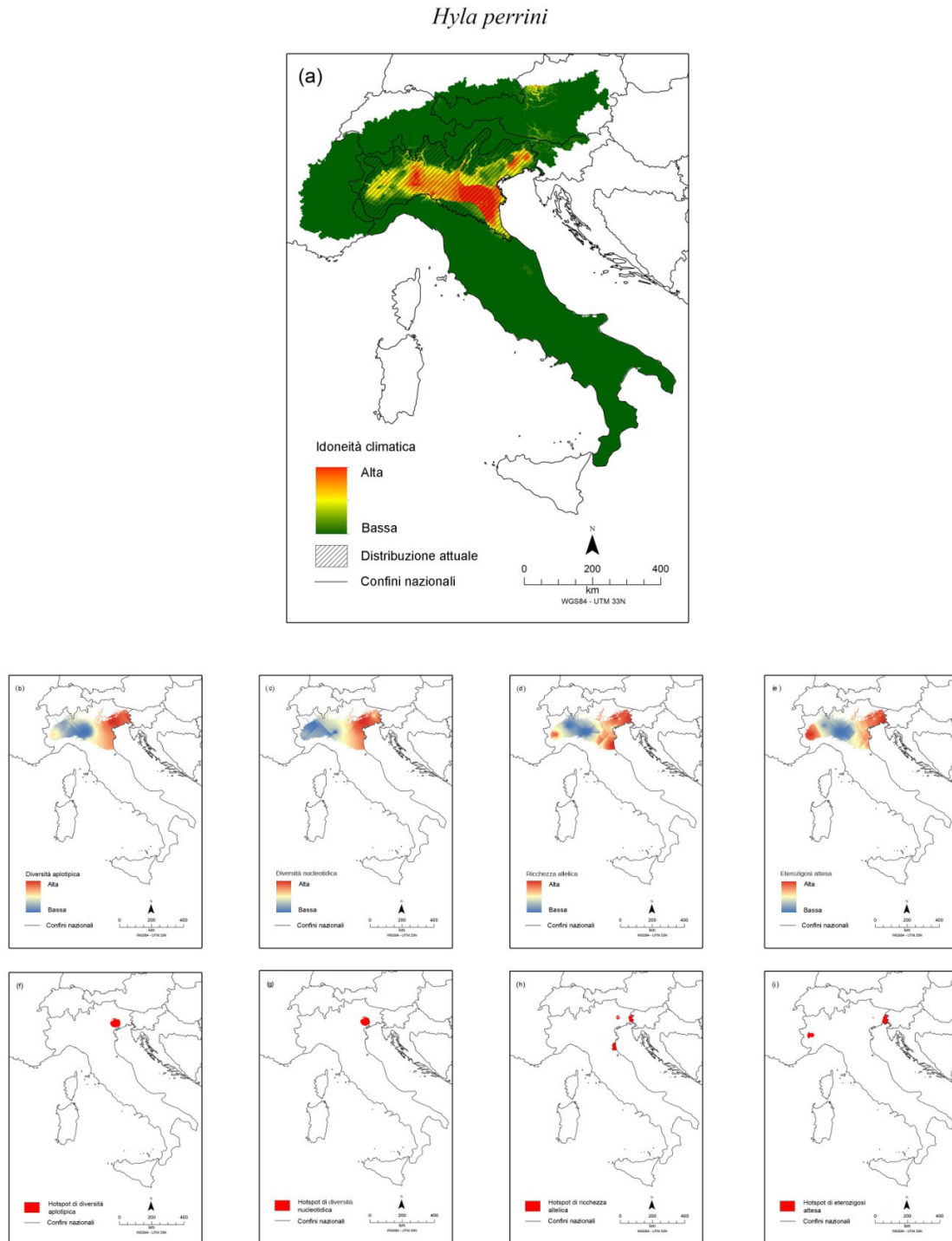


Figura 16. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Hyla intermedia*.

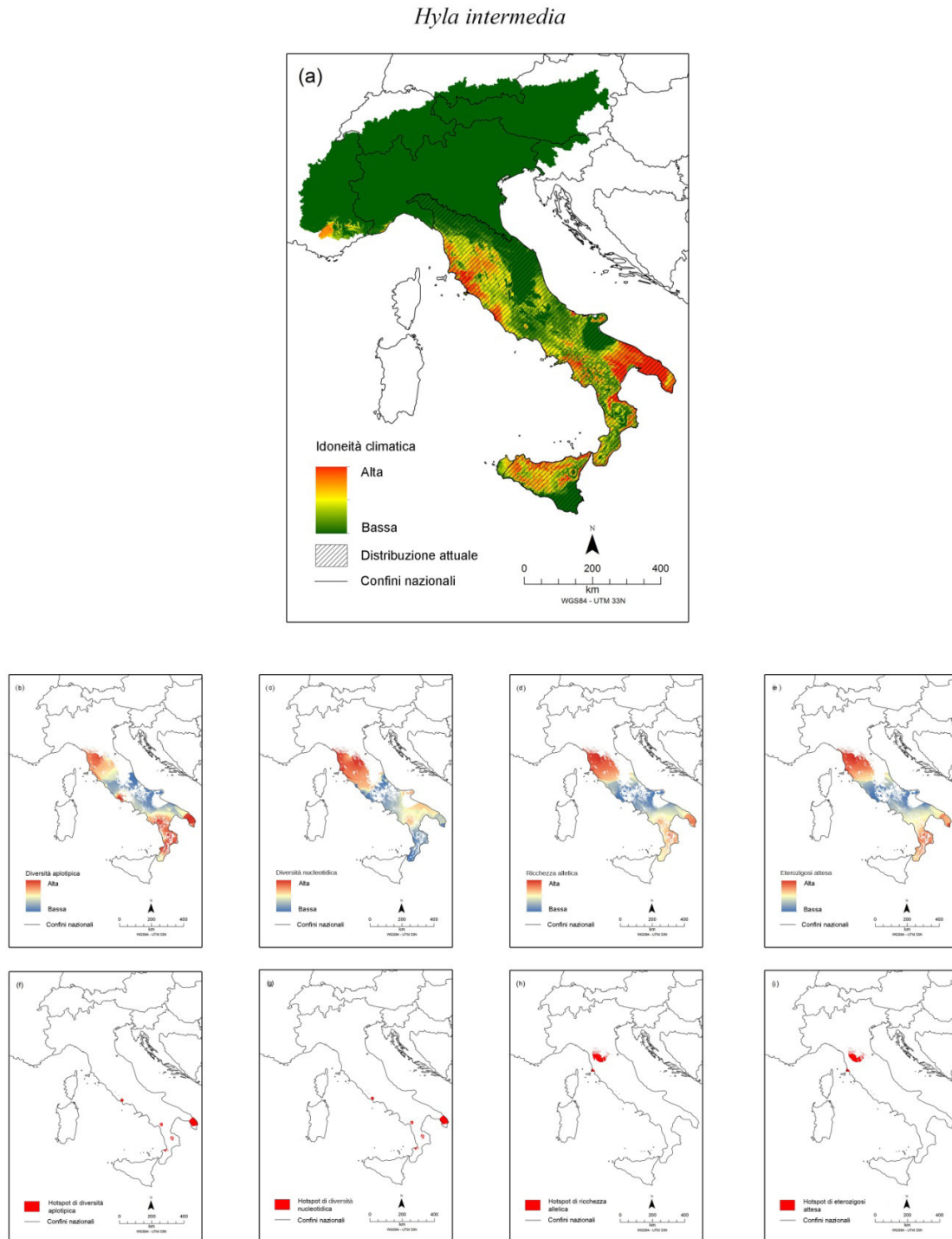


Figura 17. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplotipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Pelophylax lessonae*.

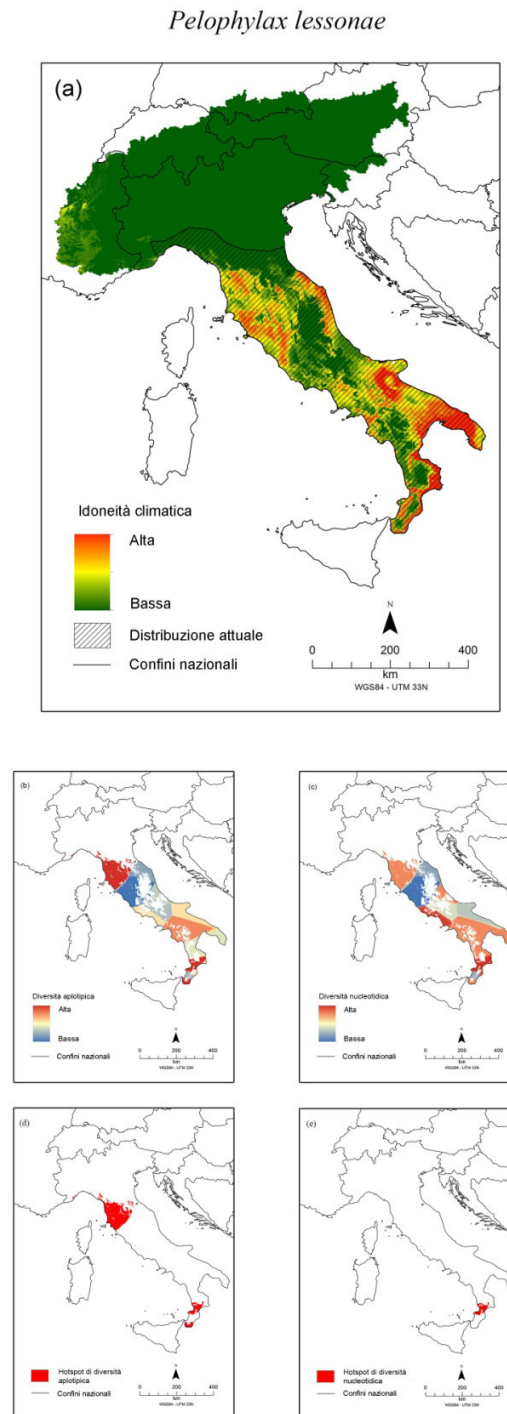


Figura 18. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Rana dalmatina* taxon meridionale.

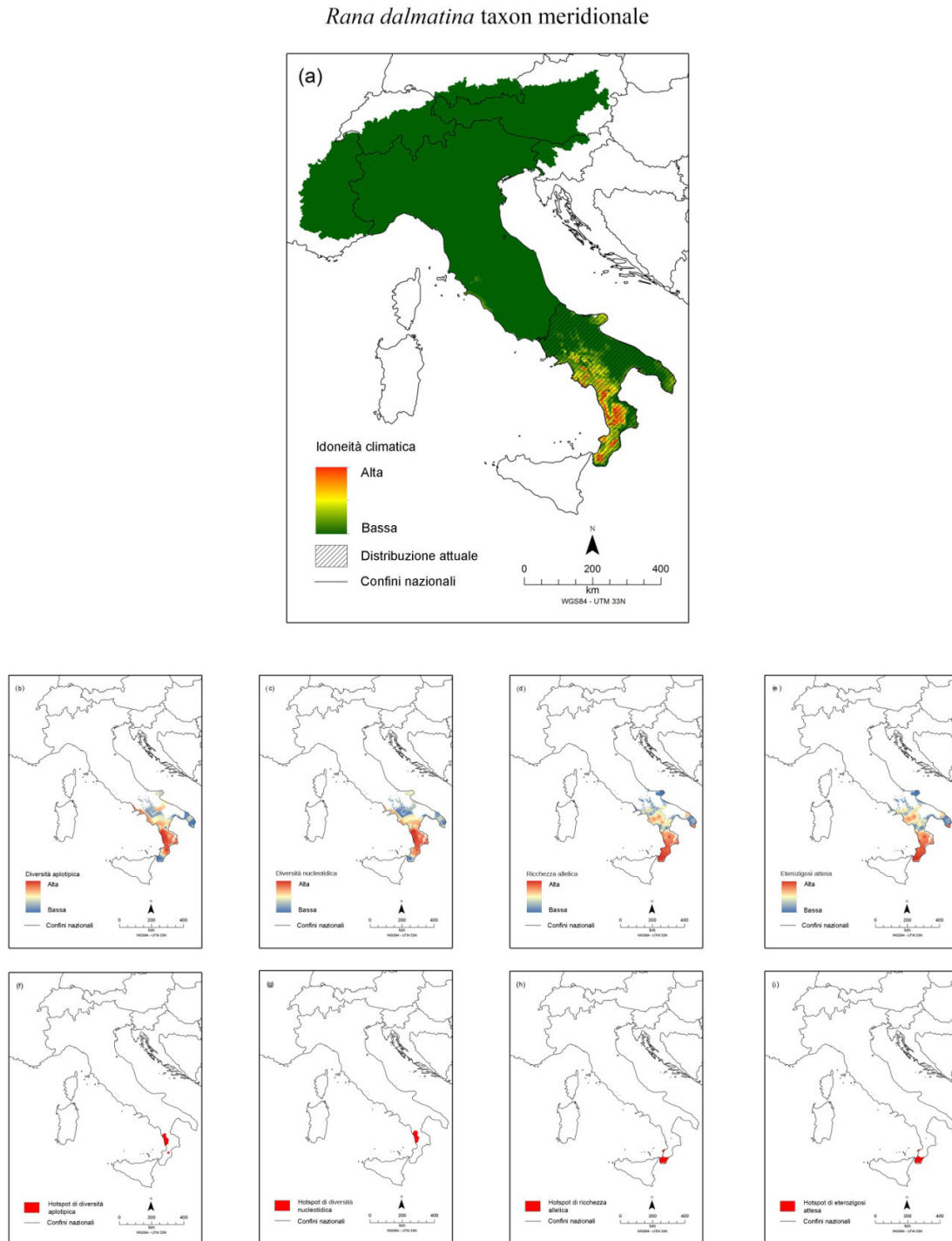


Figura 19. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Rana italica*.

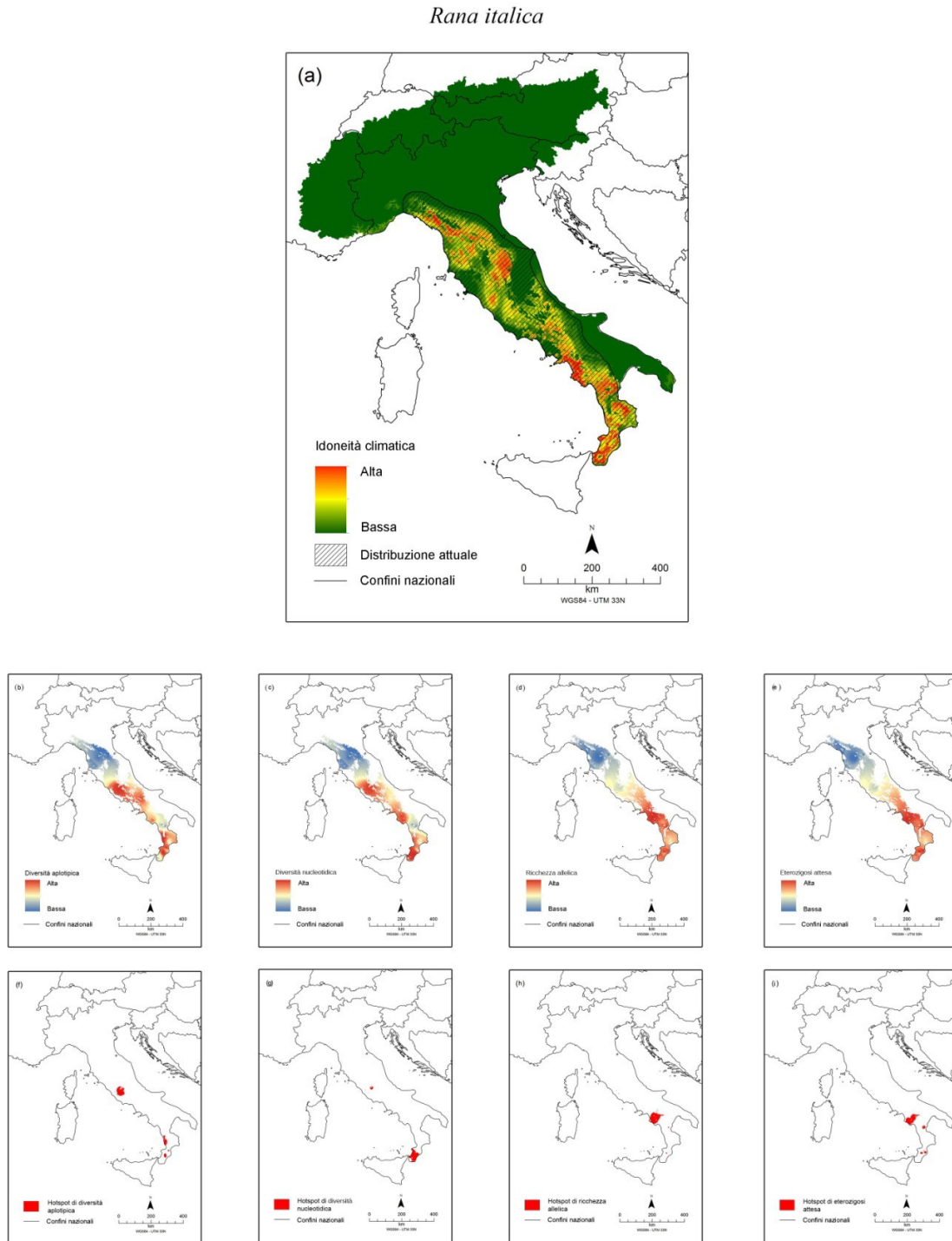


Figura 20. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Rana temporaria*.

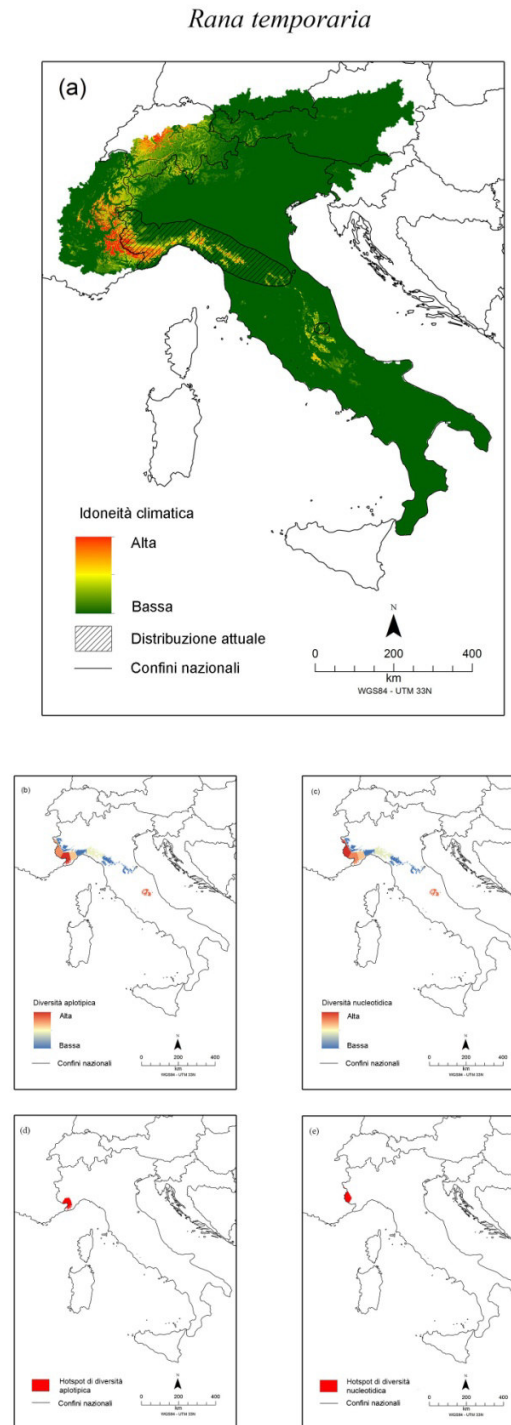


Figura 21. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplotipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Testudo hermanni hermanni*.

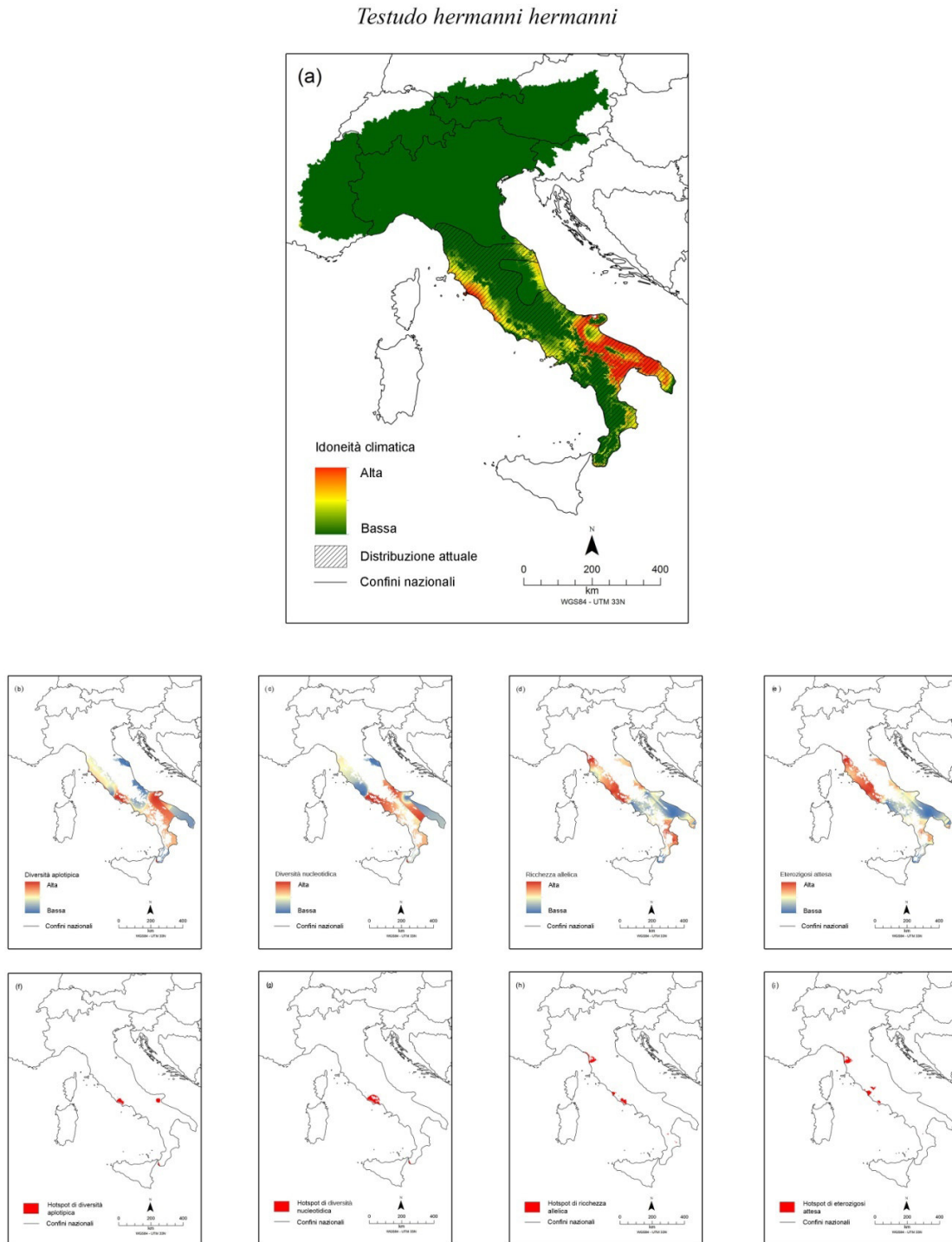


Figura 22. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplotipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Podarcis muralis* taxon meridionale.

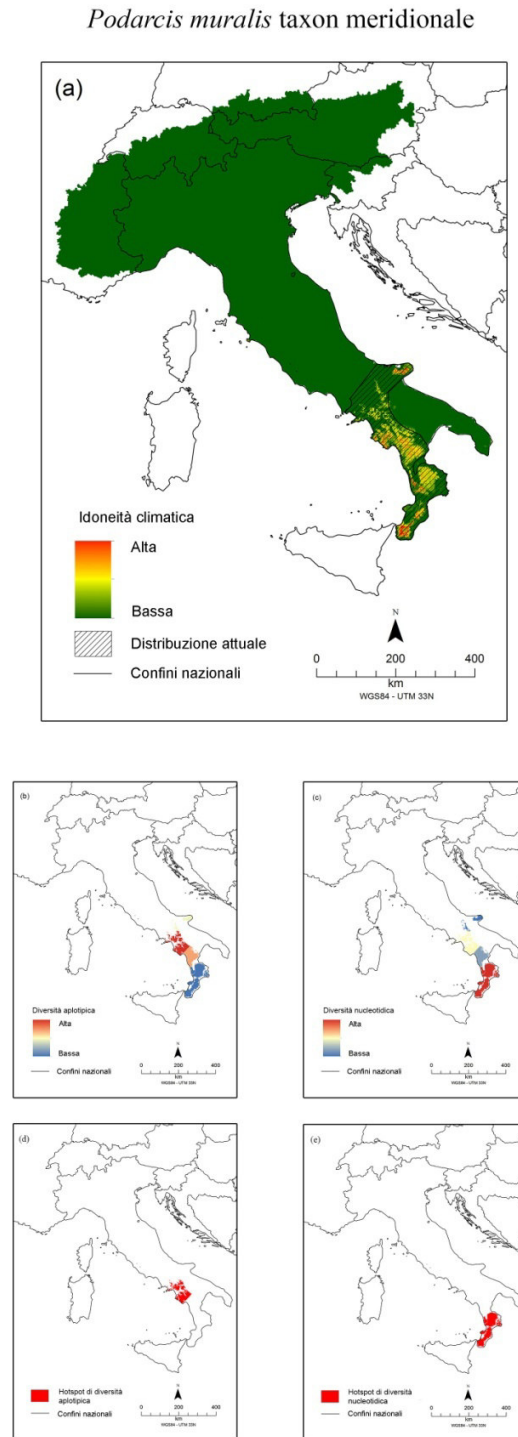


Figura 23. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplotipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per la *Talpa romana*.

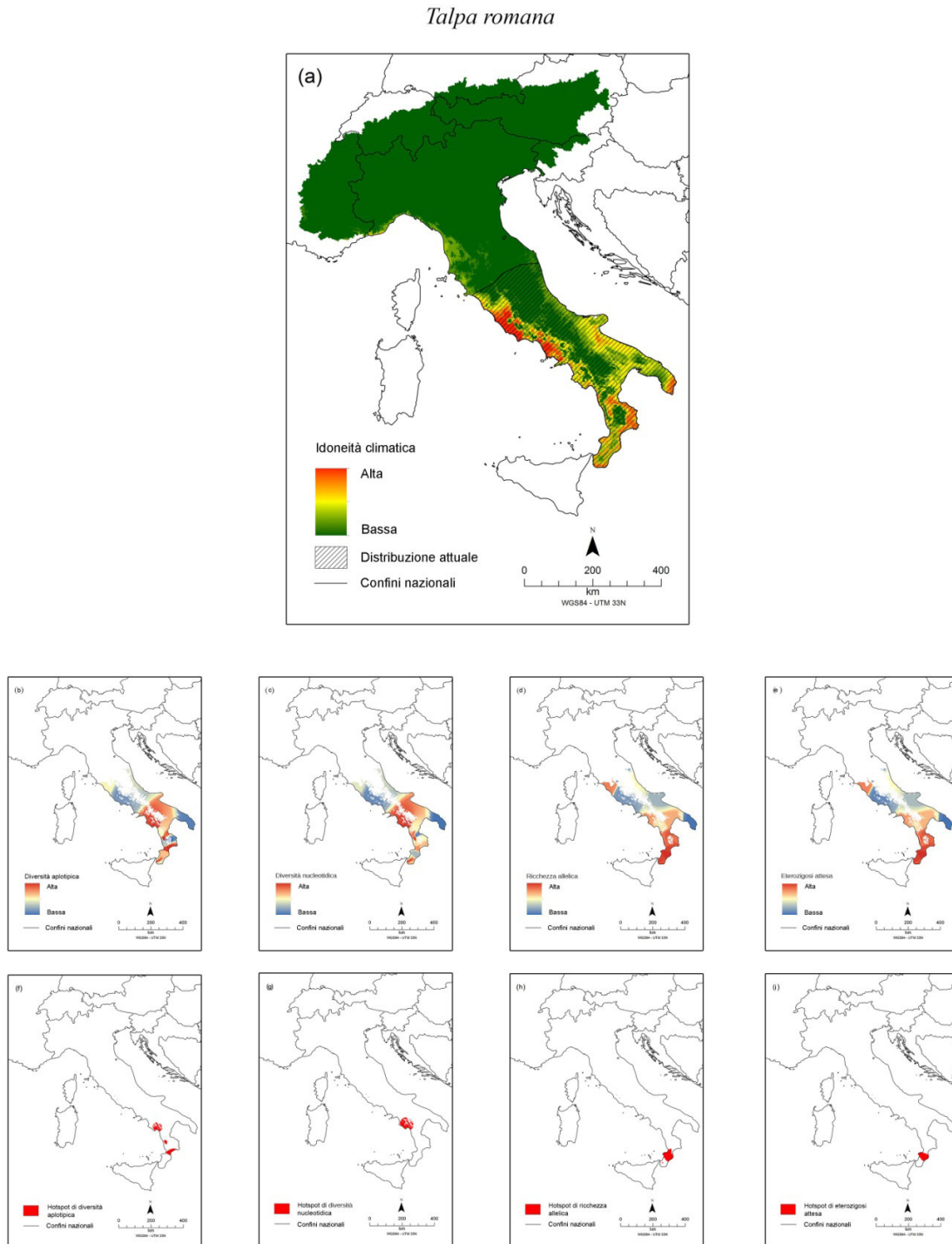


Figura 24. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per lo *Sciurus meridionalis*.

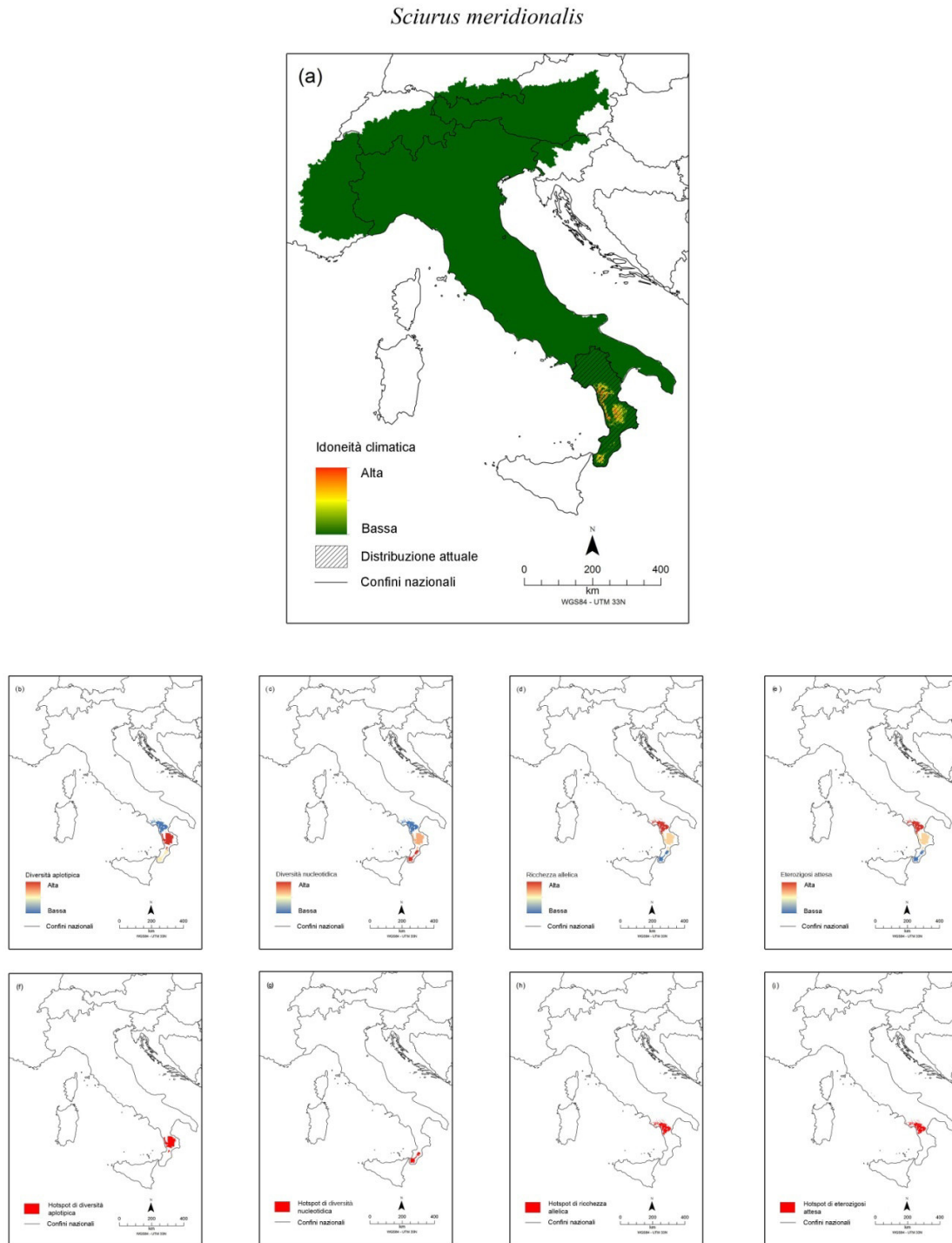


Figura 25. Modello continuo dell'idoneità climatica (a), interpolazione, all'interno del modello binario dell'idoneità climatica, per la diversità nucleotidica (b), la diversità aplo-tipica (c), la ricchezza allelica (d), l'eterozigosi attesa (e) e relativi hotspot corrispondenti al 5% superiore dei valori (f, g, h, i) per il *Myodes glareolus* taxon meridionale.

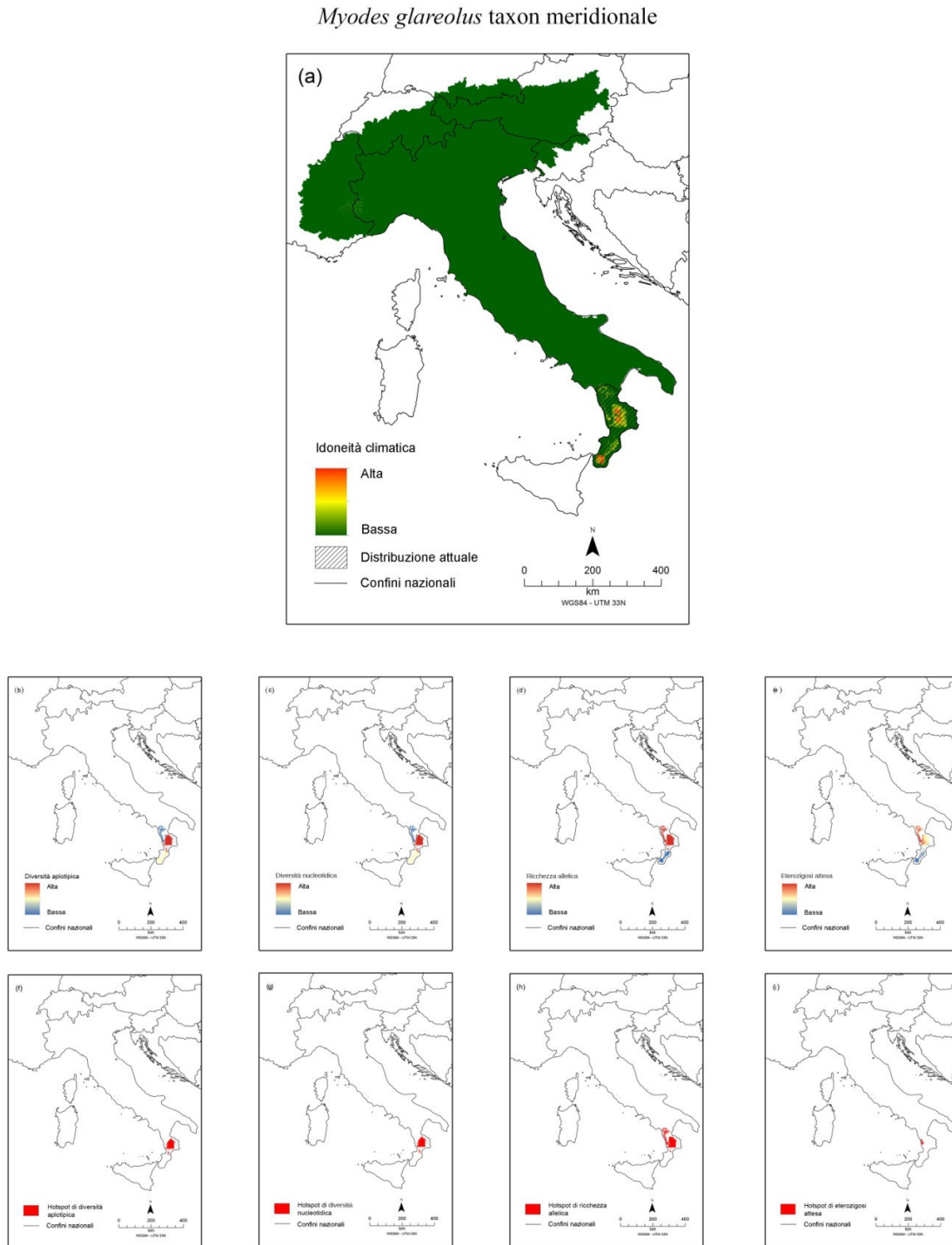


Figura 26. Ricchezza degli hotspot multi-taxon e nell'Italia peninsulare per ciascuno degli indici di diversità genetica analizzati: la diversità nucleotidica (a), la diversità aplo-tipica (b), la ricchezza allelica (c), l'eterozigosi attesa (d). La ricchezza degli hotspot è stata calcolata come la somma degli hotspot dei singoli taxon.

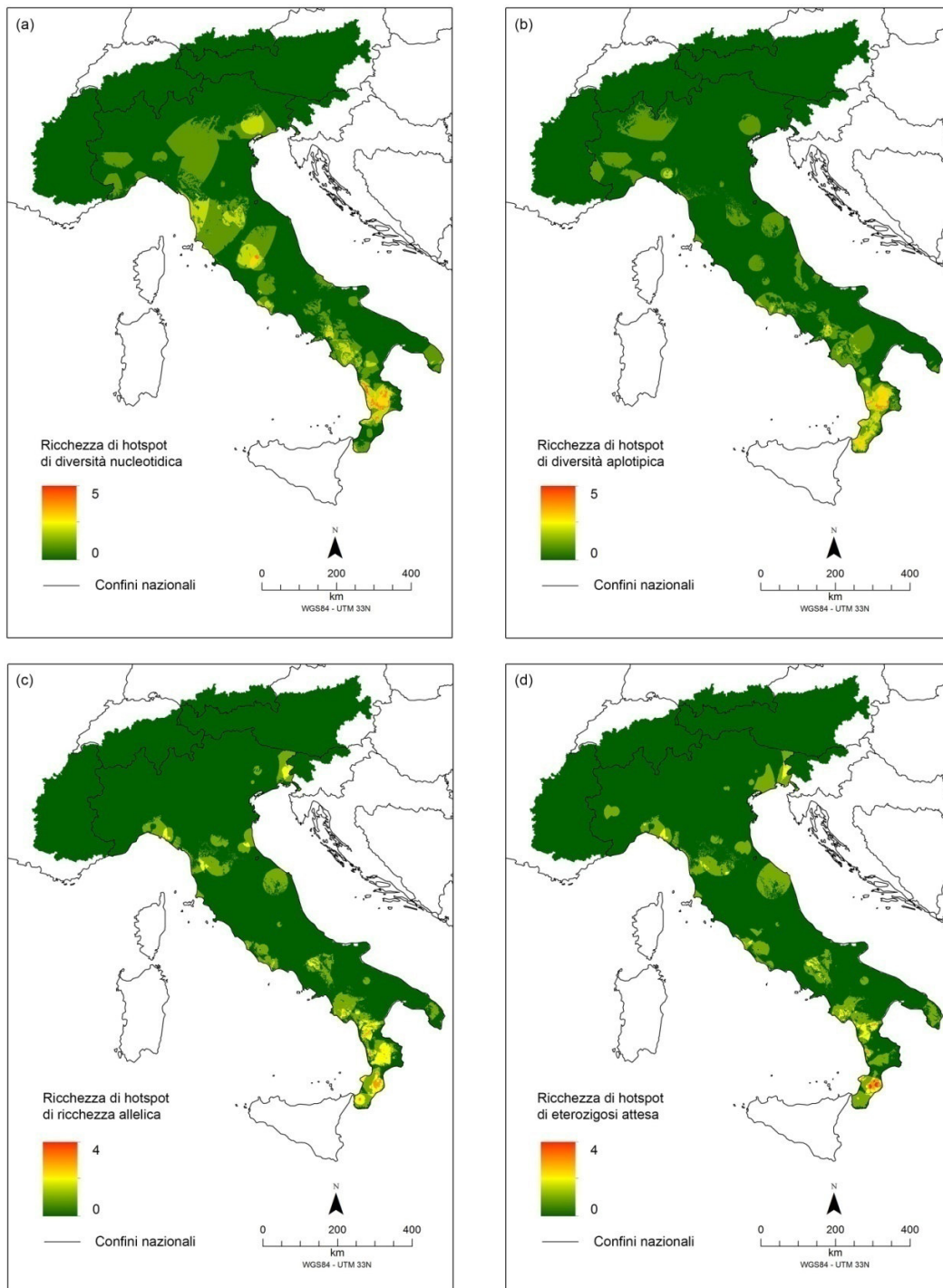


Figura 27. Ricchezza totale degli hotspot multi-taxon e nell'Italia peninsulare per la diversità genetica mitocondriale (a) e la diversità genetica nucleare (b). La ricchezza totale degli hotspot mitocondriali e nucleari è stata calcolata come la somma degli hotspot dei singoli indici mitocondriali e nucleari.

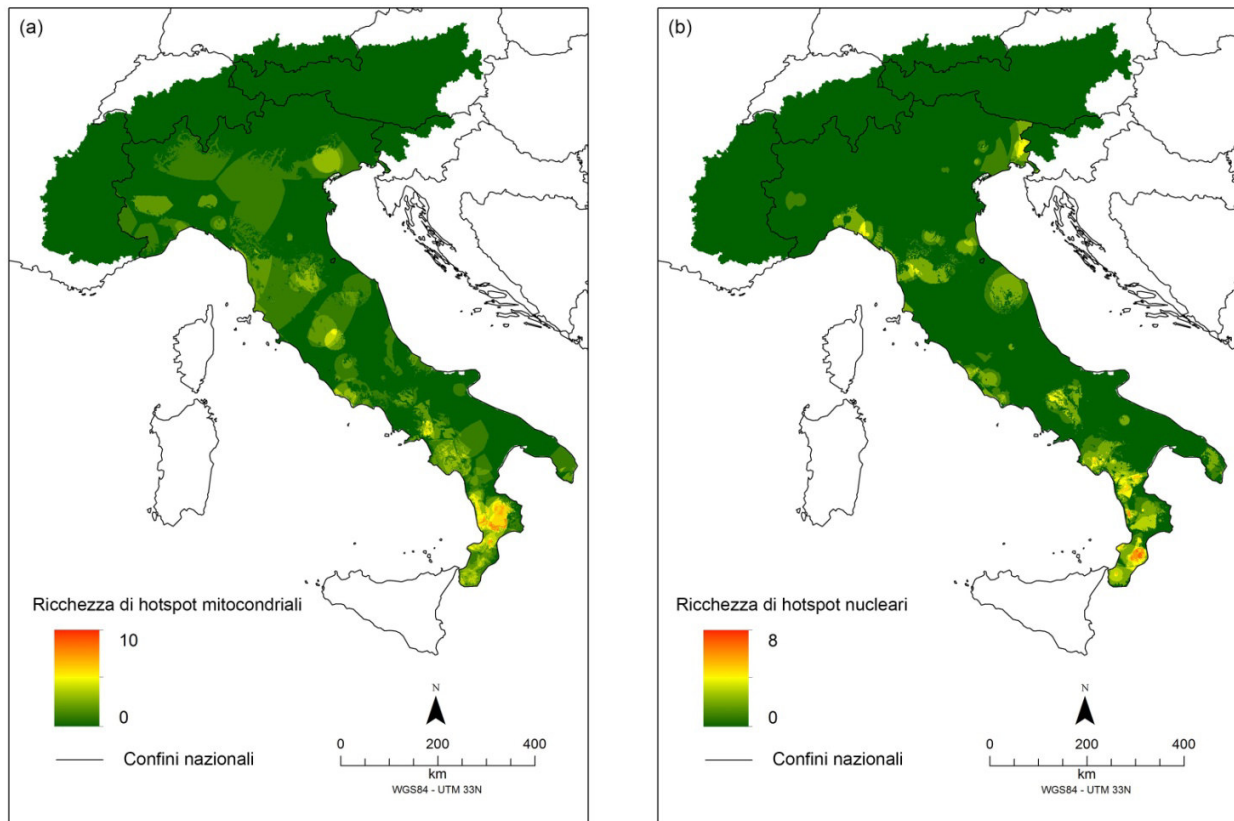
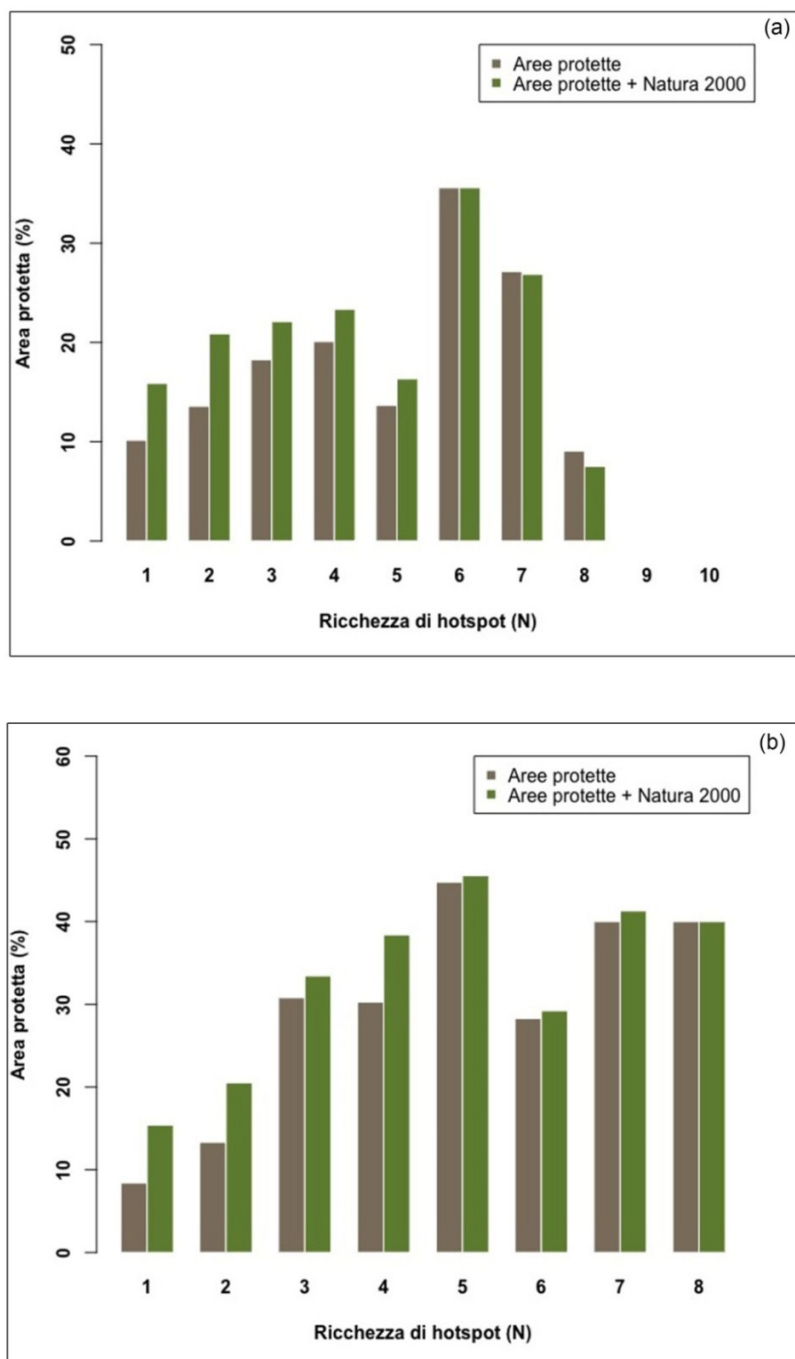


Figura 28. Percentuale di area protetta per ciascuna classe di ricchezza di hotspot mitocondriale (a) e nucleare (b). Il livello di copertura è stato calcolato sia per la SAP, che per la SAP più la rete Natura 2000.



5. DISCUSSIONE GENERALE

I cambiamenti ambientali che stanno alterando il pianeta rappresentano per la biodiversità una minaccia costante che richiede urgentemente interventi concreti ed efficaci (Ceballos et al., 2015). Le specie saranno in grado di rispondere a questi cambiamenti solo attraverso la loro capacità di adattarsi e modificarsi. Questa risposta può consistere nel modificare il proprio areale di distribuzione in direzione di aree con condizioni abiotiche e biotiche ancora favorevoli alla specie. Tuttavia, barriere geografiche, una crescente frammentazione antropica degli habitat o una ridotta capacità dispersiva, non sempre consentono alle specie di modificare la propria distribuzione nella direzione necessaria. Pertanto, frequentemente l'unica possibilità che le specie hanno per fronteggiare cambiamenti ambientali è quella di adattarsi *in-situ* alle nuove condizioni. Ad ogni modo, la possibilità sia di colonizzare nuovi habitat sia di adattarsi *in-situ* alle mutate condizioni ambientali, dipendono intimamente dal potenziale evolutivo delle popolazioni coinvolte e quindi dalla quantità di variazione genetica in esse presente (Frankham et al. 2005). La conservazione degli hotspot di diversità genetica intraspecifica risulta quindi un passaggio fondamentale per la salvaguardia a lungo termine delle specie. Tuttavia, per poter definire delle scelte operative per gestire la biodiversità, è necessario avere informazioni dettagliate non solo sulla posizione di questi hotspot, ma anche sui processi evolutivi che li hanno generati. I risultati ottenuti in questo studio hanno dimostrato come gli strumenti fino ad oggi utilizzati per l'identificazione e lo studio degli hotspot non garantiscano una corretta ed efficace conservazione e come l'utilizzo di scale geografiche più dettagliate sia una strategia fondamentale.

Un primo risultato ottenuto in questo studio attraverso l'analisi approfondita dell'hotspot di diversità intraspecifica dell'ululone appenninico ha rilevato non solo un forte declino generale della specie in quest'area, ma anche come questo declino non sia spazialmente né temporalmente omogeneo, ma stia affliggendo maggiormente le popolazioni delle sottoregioni centro settentrionali e in maniera minore le popolazioni della sottoregione meridionale della Calabria. La struttura geografica del declino è stata osservata in maniera uniforme in ognuno degli aspetti analizzati, che ricordiamo essere: la presenza, la demografia, la variabilità genetica, la presenza del patogeno *B. dendrobatidis* e l'idoneità climatica, il che ha permesso di ottenere un quadro dettagliato della situazione e di fornire una lista di strategie concrete che andrebbero attuate nell'area di studio per garantire la sopravvivenza dell'ululone appenninico.

Nonostante lo studio non si presenti conclusivo nell'identificazione del fattore chiave che sta determinando il declino dell'ululone appenninico, non possiamo escludere il ruolo che la diversità genetica sembrerebbe avere nel livello di protezione delle popolazioni. Infatti le popolazioni che risultano meno afflitte dal declino in ognuno delle caratteristiche analizzate rappresentano un cluster genetico distinto e sono proprio quelle con i valori più alti di diversità genetica. Sebbene anche in queste popolazioni sia stata rilevata una diminuzione della diversità genetica rispetto al monitoraggio precedente, tuttavia risultano non solo le uniche ad aver avuto un'espansione nella presenza, e un numero maggiore di individui per sito/giorno, ma anche le uniche a risultare negative per il chitridio. Questo dato conferma il ruolo della diversità genetica nel fornire il potenziale adattativo delle specie nel rispondere anche ai fattori di stress, come la presenza di un patogeno. Come confermato da studi precedenti infatti, i livelli maggiori di diversità genetica sono spesso correlati con popolazioni più sane e meno suscettibili (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Hughes & Boomsma, 2004; Pearman & Garner, 2005; Zampiglia *et al.*, 2013).

Un secondo risultato importante che analisi ad un dettaglio spaziale maggiore di quello usuale, condotte in questa tesi, hanno portato alla luce è come, nonostante i numerosi studi, ancora non si sia giunti ad uno scenario chiaro sui quali processi microevolutivi abbiano maggiormente contribuito alla genesi di un hotspot. Il primo scenario storicamente proposto infatti, ovvero la prolungata stabilità demografica garantita alle popolazioni nei rifugi grazie alla stabilità climatica che li caratterizzava, non è stato confermato dalle analisi condotte nel presente studio. La localizzazione dei rifugi lungo le coste infatti sembrerebbe supportare piuttosto il secondo scenario proposto, che mette in relazione i processi di frammentazione e flusso genico, avvenuti in seguito a contatti secondari favoriti dai cicli di espansione e contrazione degli areali delle specie, con la nascita di un hotspot di diversità genetica (Canestrelli *et al.*, 2010). Questo perché le coste del passato, in particolare quelle del meridione, non possono essere considerate delle aree di stabilità a causa delle cicliche trasgressioni marine avvenute durante il Pleistocene (Bonfiglio *et al.*, 2002; Cucci, 2004). Sebbene esista ormai un'ampia letteratura che identifica la localizzazione dei rifugi in aree influenzate da trasgressioni marine, inclusa la Calabria (Canestrelli *et al.*, 2010; Canestrelli *et al.*, 2012a; Canestrelli *et al.*, 2007), così come studi che identificano la presenza di rifugi multipli e frammentati (Magri, 2008; Forester *et al.*, 2013), tuttavia lo studio condotto rappresenta un notevole passo in avanti rispetto alle ricerche precedenti. Avendo infatti ottenuto risultati simili alle ricerche svolte fino ad oggi, ma con dati e metodi che derivano dall'ambito della modellistica della

distribuzione delle specie e non dalla filogeografia, i nostri risultati supportano fortemente il secondo scenario.

La carenza di evidenze che supportano il secondo scenario nella genesi di un hotspot di diversità possono essere riconducibili non solo all'uso di piani di campionamento e strumenti della sola filogeografia, ma anche all'utilizzo di marcatori genetici non adeguati. Infatti la maggior parte degli studi svolti fino ad oggi sia sulla nascita che sulla localizzazione degli hotspot si basa su marcatori a eredità uniparentale, come il DNA mitocondriale per la fauna o il DNA del cloroplasto per le piante, i quali spesso non sono sufficienti per rilevare le zone di contatto secondario tra le linee e quindi hanno portato all'identificazione classica degli hotspot con i rifugi glaciali. La più ampia diffusione di questi dati, così come la loro più semplice reperibilità per un cospicuo numero di specie ha reso questi dati maggiormente utilizzati rispetto ai dati di variabilità nucleare (Vandergaast et al., 2008; Miraldo et al., 2016).

Tuttavia nessuno studio, prima della presente ricerca, ha mai tentato di identificare la localizzazione degli hotspot di diversità genetica mitocondriale e nucleare per le stesse specie, al fine di confrontarli e approfondire le conoscenze sulla loro distribuzione spaziale. Seppur presentati in forma preliminare (Capitolo 4), i risultati ottenuti identificano all'interno della penisola italiana la dislocazione geografica degli hotspot di diversità nucleare e mitocondriale sia per molte dei singoli taxa che per gli hotspot multi-taxon. E' importante sottolineare come nonostante la ricchezza di hotspot aumenti nella porzione meridionale della penisola per entrambi i marcatori, tuttavia ad un'analisi più dettagliata le congruenze sono al massimo marginali. I risultati ottenuti da questo step della ricerca non risultano solo innovativi da un punto di vista metodologico e dei risultati ottenuti, ma sottolineano ancora una volta come la scala spaziale con cui vengono studiati fenomeni microevolutivi come la struttura della diversità genetica, la loro distribuzione e la loro origine influisca notevolmente. Solo una scala spaziale più fine ha permesso infatti di rivelare il pattern sopra descritto e, come dimostrato anche dallo studio dell'hotspot di ululone, permette in ultima analisi di predisporre strategie per la conservazione della biodiversità applicabili concretamente sul territorio.

In conclusione, il presente studio fornisce delle importanti implicazioni nell'ambito della biologia della conservazione che riguardano gli hotspot di diversità intraspecifica in Italia peninsulare. E' stata innanzitutto fornita un'analisi dettagliata dell'hotspot dell'ululone appenninico, che oltre a rilevare un declino consistente e rapidissimo della specie ed a suggerire azioni pratiche e potenzialmente attuabili dagli enti preposti, ha permesso di evidenziare un inatteso dinamismo

spaziale e temporale dei parametri studiati. Essendo stata poi fornita una prova accurata sul ruolo del flusso genico nella genesi degli hotspot, è possibile suggerire come risulti fondamentale che le diverse popolazioni continuino a scambiare geni, e quindi come, oltre all'intensificazione della rete di aree protette, sia bene costruire e mantenere corridoi ecologici che permettano alle specie di muoversi liberamente. In ultimo, l'identificazione degli hotspot nucleari multi-taxon fornisce materiale concreto non solo ai fini della validazione dell'efficacia dell'attuale rete di aree protette, ma anche della redazione di un eventuale piano di integrazione delle stesse. Sfortunatamente i risultati ottenuti mostrano come l'attuale protezione degli hotspot di diversità intraspecifica e dei processi che li hanno generati non sia ad oggi sufficiente ad una adeguata conservazione della biodiversità e suggeriscono come siano necessari ulteriori sforzi sia in termini di ricerca scientifica che di pratiche gestionali.

BIBLIOGRAFIA

- Abellán, P. & Svenning, J. (2014). Refugia within refugia – patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society*, **113**, 13–28.
- Acevedo-Whitehouse, K., Gulland, F., Greig, D. & Amos, W. (2003). Inbreeding: disease susceptibility in California sea lions. *Nature*, **422**, 35–35.
- Aiello-Lammens, M. E., Boria, R. A., Radosavljevic, A., Vilela, B., & Anderson, R. P. (2015). spThin: An R package for spatial thinning of species occurrence records for use in ecological niche models. *Ecography*, **38**, 541–545.
- Allendorf, F. W. & Luikart, G. (2009). *Conservation and the genetics of populations*. Hoboken, New Jersey ed: John Wiley and Sons.
- Andreone, F., Corti, C., Sindaco, R., Romano, A., Giachi, F., Vanni, S. & Delfino, G. (2009). *Bombinapachypus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T54450A86629977.
- Araújo, M. B. & New, M. (2007). Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 42–47.
- Barbet-Massin, M., Jiguet, F., Albert, C. H., & Thuiller, W. (2012). Selecting pseudo-absence for species distribution models: how, where and how many? *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 327–338.
- Barbieri, F., Bernini, F., Guarino, F. & Venchi, A. (2004). Distribution and conservation status of *Bombinavariegata* in Italy (Amphibia, Bombinatoridae). *Italian Journal of Zoology*, **71**, 83–90.
- Bateman, B. L., Vanderwal, J., Williams, S. E. & Johnson, C. N. (2012). Biotic interactions influence the projected distribution of a specialist mammal under climate change. *Diversity and Distributions*, **18**, 861–872.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR, 5000, 1996–2004.
- Bennett, K. D., Tzedakis, P. C. & Willis, K. J. (1991). Quaternary refugia of North European trees. *Journal of Biogeography*, **18**, 103–115.

- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. ... & Hines, H. B. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 9031-9036.
- Bidegaray-Batista, L., Sánchez-Gracia, A., Santulli, G., Maiorano, L., Guisan, A., Vogler, A. P., & Arnedo, M. A. (2016). Imprints of multiple glacial refugia in the Pyrenees revealed by phylogeography and palaeodistribution modelling of an endemic spider. *Molecular Ecology*, **25**, 2046–2064.
- Bisconti, R., Canestrelli, D., Colangelo, P. & Nascetti, G. (2011). Multiple lines of evidence for demographic and range expansion of a temperate species (*Hyla sarda*) during the last glaciation. *Molecular Ecology*, **20**, 5313–5327.
- Bonfiglio, L., Mangano, G., Marra, A. C., Masini, F., Pavia, M., Petruso, D. (2002). Pleistocene calabrian and sicilian bioprovinces. *Geobios*, **35**, 29-39.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T. & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, **60**, 141-148.
- Brodersen, J. & Seehausen, O. (2014). Why evolutionary biologists should get seriously involved in ecological monitoring and applied biodiversity assessment programs. *Evolutionary Applications*, **7**, 968-983.
- Brooks T. M., Cuttelod A., Faith D. P., Garcia-Moreno J., Langhammer P. & Pérez-Espona S. (2015). Why and how might genetic and phylogenetic diversity be reflected in the identification of key biodiversity areas? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **370**, 20140019
- Buisson, L., Thuiller, W., Casajus, N., Lek, S. & Grenouillet, G. (2010). Uncertainty in ensemble forecasting of species distribution. *Global Change Biology*, **16**, 1145–1157.
- Cañadas, A. & Vázquez, J. A. (2014). Conserving Cuvier's beaked whales in the Alboran Sea (SW Mediterranean): identification of high density areas to be avoided by intense man-made sound. *Biological Conservation*, **178**, 155-162.
- Canestrelli, D., Cimmaruta, R., Costantini, V. & Nascetti, G. (2006). Genetic diversity and phylogeography of the Apennine yellow-bellied toad *Bombina pachypus*, with implications for conservation. *Molecular Ecology*, **15**, 3741–54.

- Canestrelli, D., Zingari, F. & Nascetti, G. (2006). Genetic evidence for two distinct species within the Italian endemic *Salamandrina terdigitata* (Bonnaterre, 1789) (Amphibia: Urodela: Salamandridae). *Herpetological Journal*, **16**, 221-227.
- Canestrelli, D., Cimmaruta, R. & Nascetti, G. (2007). Phylogeography and historical demography of the Italian treefrog, *Hyla intermedia*, reveals multiple refugia, population expansions and secondary contact within peninsular Italy. *Molecular Ecology*, **16**, 4808-4821.
- Canestrelli, D. & Nascetti, G. (2008a). 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. & Nascetti, G. (2008b). 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. & Nascetti, G. (2010). Birth of a hotspot of intraspecific genetic diversity: notes from the underground. *Molecular Ecology*, **19**, 5432–5451.
- Canestrelli, D., Sacco, F. & Nascetti, G. (2012a). On glacial refugia, genetic diversity and microevolutionary processes: deep phylogeographical structure in the endemic newt *Lissotriton italicus*. *Biological Journal of Linnean Society*, **105**, 42–55.
- Canestrelli, D., Salvi, D., Maura, M., Bologna, M. A. & Nascetti, G. (2012b). One species, three Pleistocene evolutionary histories: phylogeography of the Italian crested newt, *Triturus carnifex*. *PLoS ONE*, **7**, e41754.
- Canestrelli, D., Zampiglia, M. & Nascetti, G. (2013). Widespread occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in contemporary and historical samples of the endangered *Bombina pachypus* along the Italian Peninsula. *PLoS ONE*, **8**, e63349.
- Canestrelli, D., Bisconti, R., Sacco, F. & Nascetti, G. (2014). What triggers the rising of an intraspecific biodiversity hotspot? Hint from the agile frog. *Scientific Reports*, **4**, 5042.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F. B., Rodriguez, M.T. & Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, **323**, 785-789.
- Carvalho, S. B., Brito, J. C., Crespo, E. J., & Possingham, H. P. (2011). Incorporating evolutionary processes into conservation planning using species distribution data: A case study with the western Mediterranean herpetofauna. *Diversity and Distributions*, **17**, 408–421.
- Carvalho, S. B., Velo-Antón, G., Tarroso, P., Portela, A. P., Barata, M., Carranza, S., ... & Possingham, H. P. (2017). Spatial conservation prioritization of biodiversity spanning the

- evolutionary continuum. *Nature Ecology and Evolution*, **1**, 0151.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., Garcia, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015). Accelerated Modern Human-Induced Species Losses: Entering the Sixth Mass Extinction. *Science Advances*, **1**, e1400253–e1400253.
- Chen, C., Durand, E., Forbes, F. & François, O. (2007). Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 747–756.
- Chiocchio, A., Bisconti, R., Zampiglia, M., Nascetti, G. & Canestrelli, D. (2017). Quaternary history, population genetic structure and diversity of cold-adapted Alpine newt *Ichthyosaura alpestris* in peninsula Italy. *Scientific Reports*, **7**, 2955.
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R., Mace, G. M. & Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 290-295.
- 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.
- D’Amen, M., Zimmermann, N. E. & Pearman, P. B. (2013). Conservation of phylogeographic lineages under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, **22**, 93–104.
- de Oliveira, G., Rangel, T. F., Lima-Ribeiro, M. S., Terribile, L. C. & Diniz-Filho, J. A. F. (2014). Evaluating, partitioning and mapping the spatial autocorrelation component in ecological niche modeling: a new approach based on environmentally equidistant records. *Ecography*, **37**, 637–647.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlik, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E. ... & Michaux, J. R. (2005). Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, **14**, 1727-1739.
- Dinis, M., Marabet, K., Martinez-Freiria, F., Steinfartz, S., Vences, M. ... & Velo-Antón, G. (2019). Allopatric diversification and evolutionary melting pot in a North African Palearctic relict: the biogeographic history of *Salamandra algira*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **130**, 81-91.
- Diniz-Filho, J. A. F., Bini, L. M., Rangel, T. F., Loyola, R. D., Hof, C., Nogués-Bravo, D. & Araújo, M. B. (2009). Partitioning and mapping uncertainties in ensemble of forecast of species turnover under climate change. *Ecography*, **32**, 897–906.

- Drees, C., Husemann, M., Homburg, K., Brandt, P., Dieker, P., Habel, J. C. & Assmann, T. (2016). Molecular analyses and species distribution models indicate cryptic northern mountain refugia for a forest-dwelling ground beetle. *Journal of Biogeography*, **43**, 2223–2236.
- Dufresnes, C., Mazepa, G., Rodrigues, N., Brelsford, A., Litvinchuk, S. N. ... & Jeffries, D. L. (2018). Genomic evidence for cryptic speciation in tree frog from appennine peninsula with description of *Hyla perrini* sp. nov. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **6**, 144.
- Durand, E., Jay, F., Gaggiotti, O. E. & François, O. (2009). Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones. *Molecular Biology and Evolution*, **26**, 1963–1973.
- Eizaguirre, C. & Baltazar-Soares, M. (2014). Evolutionary conservation-evaluating the adaptive potential of species. *Evolutionary Applications*, **7**, 963–967.
- Elith, J., Kearney, M. & Phillips, S. (2010). The art of modelling range-shifting species. *Methods in Ecology and Evolution*, **1**, 330–342.
- Faith, D.P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, **61**, 1–10.
- Forester, B. R., Dechaine, E. G., & Bunn, A. G. (2013). Integrating ensemble species distribution modelling and statistical phylogeography to inform projections of climate change impacts on species distributions. *Diversity and Distributions*, **19**, 1480–1495.
- François, O. & Durand, E. (2010). Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 773–784.
- Frankel, O. H. (1974). Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics*, **78**, 53–65.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**, 131–140.
- Frankham, R. (2010). Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological conservation*, **143**, 1919–1927.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., ... & Hyatt, A. D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, **18**, 4757–4774.
- Gómez, A., & Lunt, D. H. (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In *Phylogeography of Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity*(eds Weiss S., Ferrand N.). Dordrecht, The Netherlands: Springer Verlag, 155–188.
- Gonçalves, H., Martinez-Solano, I., Pereira, R. J., Carvalho, B., Garcia-Paris, M. & 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.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices(version 2.9. 3).
- Greenspan, S. E., Bower, D. S., Roznik, E. A., Pike, D. A., Marantelli, G., Alford, R. A. ... & Scheffers, B. R. (2017b). Infection increases vulnerability to climate change via effects on host thermal tolerance. *Scientific Reports*, **7**, 9349.
- Greenspan, S. E., Bower, D. S., Webb, R. J., Roznik, E. A., Stevenson, L. A., Berger, L. ... & Alford, R. A. (2017a). Realistic heat pulses protect frogs from disease under simulated rainforest frog thermal regimes. *Functional Ecology*, **31**, 2274–2286.
- Guisan, A. & Zimmermann, N. E. (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling*, **135**, 147–186.
- Hampe, A. & Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: The rear edge matters. *Ecology Letters*, **8**, 461–467.
- Hauswaldt, J. S., Schröder, C. & Tiedemann, R. (2007). Nine new tetranucleotide microsatellite markers for the fire-bellied toad (*Bombina bombina*). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 49–52.
- Heikkinen, R. K., Marmion, M. & Luoto, M. (2012). Does the interpolation accuracy of species distribution models come at the expense of transferability? *Ecography*, **35**, 276–288.
- Hendry, A. P., Lohmann, L. G., Conti, E., Cracraft, J., Crandall, K. A., Faith, D. P. ... & Donoghue, M. J. (2010). Evolutionary biology in biodiversity science, conservation, and policy: a call to action. *Evolution*, **64**, 1517–1528.
- Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages and their role, in divergence and speciation. *Biological Journal of Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Hewitt, G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of Linnean Society*, **68**, 87–112.
- Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hewitt, G. M. (2004a). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **359**, 183–195.
- Hewitt, G. M. (2004b). The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography.

Frontiers in Zoology, 1:4.

- Hewitt, G. M. (2011a). Mediterranean peninsulas: the evolution of hotspot. In (eds Zachos F. & Habel J.), *Biodiversity Hotspot*. Berlin, Heidelberg: Springer, 123–147.
- Hewitt, G. M. (2011b). Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*, **139**, 617–638.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965–1978.
- Hof, A. R., Jansson, R. & Nilsson, C. (2012). How biotic interactions may alter future predictions of species distributions: future threats to the persistence of the arctic fox in Fennoscandia. *Diversity and Distributions*, **18**, 554–562.
- Hoffmann, A.A. & Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, **470**, 479–485.
- Hughes, W. O. & Boomsma, J. J. (2004). Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution*, **58**, 1251–1260.
- Huntley, B. & Birks, H. J. B. (1983). *An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0–13,000 years ago*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Intergovernmental Panel on Climate Change: IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007. Disponibile presso http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_synthesis_report.htm.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23**, 1801–1806.
- Jones, T. A. (2013). When local isn't best. *Evolutionary Applications*, **6**, 1109–1118.
- Laikre, L. (2010). Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. *Conservation Genetics*, **11**, 349–354.
- Lanfear, R., Kokko, H. & Eyre-Walker, A. (2014). Population size and the rate of evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **29**, 33–41.
- Leakey, R. & Lewin, R., 1995. *The Sixth Extinction: Biodiversity and its Survival*. Phoenix, London.

- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Lotze, H. K., Lenihan, H. S., Bourque, B. J., Bradbury, R. H., Cooke, R. G., Kay, M. C. ... & Jackson, J. B. C. (2006). and Coastal Seas, **312**, 1806–1810.
- Luquet, E., Garner, T. W., Léna, J. P., Bruel, C., Joly, P., Lengagne, T. ... & Plénet, S. (2012). Genetic erosion in wild populations makes resistance to a pathogen more costly. *Evolution*, **66**, 1942-1952.
- Mace, G. M. & Purvis, A. (2008). Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molecular Ecology*, **17**, 9-19.
- 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.
- Magri, D., Vendramin, G. G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T., Gömöry, D. S. ... & de Beaulieu, J-L. (2006). A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist*, **171**, 199–221.
- Maiorano, L., Cheddadi, R., Zimmermann, N. E., Pellissier, L., Petitpierre, B., Pottier, J. ... & Guisan, A. (2013). Building the niche through time: using 13,000 years of data to predict the effects of climate change on three tree species in Europe. *Global Ecology and Biogeography*, **22**, 302–317.
- Marchese, C. (2015). Biodiversity hotspot: A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation*, **3**, 297–309.
- Marmion, M., Parviainen, M., Luoto, M., Heikkinen, R. K. & Thuiller, W. (2009). Evaluation of consensus methods in predictive species distribution modelling. *Diversity and Distributions*, **15**, 59-69.
- Maura, M., Salvi, D., Bologna, M. A., Nascetti, G. & Canestrelli, D. (2014). Northern richness and cryptic refugia: phylogeography of the Italian smooth newt *Lissotriton vulgaris meridionalis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, **113**, 590-603.
- Médail, F. & Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.
- Mimura, M., Yahara, T., Faith, D. P., Vázquez-Domínguez, E., Colautti, R. I., Araki, H., ... & Hollingsworth, P. M. (2017). Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evolutionary Applications*, **10**, 121-139.

- Miraldo, A., Li, S., Borregaard, M. K., Flórez-rodríguez, A., Gopalakrishnan, S., Rizvanovic, M., ... & Nogués-bravo, D. (2016). An Anthropocene map of genetic diversity. *Science*, **353**, 1532–1535.
- Moritz, C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238-254.
- Nogués-Bravo, D. (2009). Predicting the past distribution of species climatic niches. *Global Ecology and Biogeography*, **18**, 521–531.
- Nürnberger, B., Hofman, S., Förg-Brey, B., Praetzel, G., Maclean, A., Szymura, J. M., ...& Barton, N. H. (2003). A linkage map for the hybridising toads *Bombina orientalis* and *B. variegata* (Anura: Discoglossidae). *Heredity*, **91**, 136–42.
- Parmesan C., 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **37**, 637-669.
- Pauls S.U., Nowak C., Bálint M., Pfenninger M., 2012. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology*, **22**, 925-946.
- Pearce, J. L., & Boyce, M. S. (2006). Modelling distribution and abundance with presence-only data. *Journal of Applied Ecology*, **43**, 405–412.
- Pearman, P. B., Amen, M. D., Graham, C. H., Thuiller, W., & Zimmermann, N. E. (2010). Within-taxon niche structure: niche conservatism, divergence and predicted effects of climate change. *Ecography*, **33**, 990-1003
- Pearman, P. B., Garner, T. W. (2005). Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of *Ranavirus* parallels population genetic diversity. *Ecology Letters*, **8**, 401-408.
- Pecl, G. T., Araújo, M. B., Bell, J. D., Blanchard, J., Bonebrake, T. C., Ching Chen, I., ... & Williams, S. E. 2017. Biodiversity redistribution under climate change: impacts on ecosystem and human well-being. *Science*, **355**, eaai9214.
- Pereira, H. M., Ferrier, S., Walters, M., Geller, G. N., Jongman, R. H. G., Scholes, R. J., ... Wegmann, M. (2013). Essential Biodiversity Variables. *Science*, **339**, 277–279.
- Pérez-Espona, S. & ConGRESS Consortium (2017). Conservation genetics in the European Union – Biases, gaps and future directions. *Biological Conservation*, **209**, 130–136.
- Peterson, A. T. (2011). Ecological niche conservatism: a time-structured review of evidence. *Journal of Biogeography*, **38**, 817–827.

- Petit, J., Aguinagalde, I., Beaulieu, J. De, Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., ... & Vendramin, G. (2003). Glacial refugia: hotspot but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563-1565.
- Petit, J., Brewer, S., Cheddadi, R., Coart, E., Cottrell, J., Csakl, U. M., ... & Kremer, A. (2002). Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, **156**, 49–74.
- Pfenninger, M., Bálint, M. & Pauls, S. U. (2012). Methodological framework for projecting the potential loss of intraspecific genetic diversity due to global climate change. *BMC Evolutionary Biology*, **12**, 224.
- Phillips, S. J., Dudi'k, M. & Schapire, R. E. (2004). A Maximum Entropy Approach to Species Distribution Modeling. *Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning*, 655–662.
- Phillips, S. J., Dudi'k, M., Dudi'k, D., Elith, J., Graham, C. H., Lehmann, A., ... & Ferrier, S. (2009). Sample selection bias and presence-only distribution models: implications for background and pseudo-absence data. *Ecological Applications*, **19**, 181–197.
- Phuong, M. A., Bi, K., Moritz, C. (2017). Range instability leads to cytonuclear in a morphologically cryptic ground squirrel species complex. *Molecular Ecology*, **26**, 4743–4755.
- Pounds, J. A. & Coloma, L. A. (2008). Beware the lone killer. *Nature Reports Climate Change*, **2**, 57- 59.
- Provan, J. & Bennett, K. D. (2008). Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 564-571.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ranc, N., Santini, L., Rondinini, C., Boitani, L., Poitevin, F., Angerbjörn, A., & Maiorano, L. (2016). Performance tradeoffs in target-group bias correction for species distribution models. *Ecography*, **39**, 001-012.
- Rangel, T. F. L. V. B., Diniz-Filho, J. A. F., & Bini, L. M. (2006). Towards an integrated computational tool for spatial analysis in macroecology and biogeography. *Global Ecology and Biogeography*, **15**, 321–327.

- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, **86**, 248-249.
- Rice, W. E. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *MolecularEcology Resources*, **8**, 103–106.
- Salvi, D., Harris, D. J., Kaliontzopoulou, A., Carretero, M. A. & Pinho, C. (2013). Persistence across Pleistocene ice ages in Mediterranean and extra-Mediterranean refugia: phylogeographic insights from the common wall lizard. *BMC Evolutionary Biology*, **13**, 147.
- Shafer, A. B. A., Cullingham, C. I., Coté, S. D., & Coltman, D. W. (2010). Of glaciers and refugia: a decade of study sheds new light on the phylogeography of northwestern North America. *MolecularEcology*, **19**, 4589–4621.
- Simoncelli, F., Fagotti, A., Dall'Olio, R., Vagnetti, D., Pascolini, R. & Di Rosa, I. (2005). Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in water frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *EcoHealth*, **2**, 307.
- Stagni, G., Dall'olio, R., Fusini, U., Mazzotti, S., Scoccianti, C. & Serra, A. (2004). Declining populations of apennine yellow- bellied toad *Bombina pachypus* in the northern Apennines (Italy): is *Batrachochytrium dendrobatidis* the main cause? *Italian Journal of Zoology*, **71**, 151–154.
- Stefani, F., Gentili, A., Sacchi, R., Razzetti, E., Pellitteri-Rosa, D., Pupin, F. & Galli, P. (2012). Refugia within refugia as a key to disentangle the genetic pattern of a highly variable species: the case of *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 (Anura, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 718-726.
- Steinfartz, S., Veith, M. & 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*. *Molecula Ecology*, **9**, 397-410.
- Stewart J.R. & Lister A.M. (2001) Cryptic northern refugia and the origins of modern biota. *Trends in EcologyEvolution*, **16**, 608–613.
- Stoch, F. (2000-2005). CKmap 5.3.8. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Direzione Generale per la Protezione della Natura e del Mare.
- Stuckas, H. & Tiedemann, R. (2006). Eight new microsatellite loci for the critically endangered firebellied toad *Bombinabombina* and their cross-species applicability among anurans. *MolecularEcology Notes*, **6**, 150–152.

- Swets, J. A. (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, **240**, 1285-1293.
- Taberlet, P. (1998). Biodiversity at the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology*, **64**, 91–100.
- Thomassen, H. A., Fuller, T., Buermann, W., Mila, B., Kieswetter, C. M., Jarrin-V. P., ... & Smith, T. B. (2011). Mapping evolutionary process: a multi- taxon approach to conservation prioritization. *Evolutionary Applications*, **4**, 397-413.
- Thuiller, W., Lafourcade, B., Engler, R. & Araújo, M. B. (2009). BIOMOD—a platform for ensemble forecasting of species distributions. *Ecography*, **32**, 369-373.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Vandergast, A. G., Bohonak, A. J., Hathaway, S. A., Boys, J., & Fisher, R. N. (2008). Are hotspot of evolutionary potential adequately protected in Southern California? *Biological Conservation*, **141**, 1648–1664.
- Varela, S., Anderson, R. P., García-Valdés, R., & Fernández-González, F. (2014). Environmental filters reduce the effects of sampling bias and improve predictions of ecological niche models. *Ecography*, **37**, 1084–1091.
- Vega, R., Fløjgaard, C., Lira-Noriega, A., Nakazawa, Y., Svenning, J-C. & Searle, J. B. (2010). Northern glacial refugia for the pygmy shrew *Sorex minutus* in Europe revealed by phylogeographic analyses and species distribution modelling. *Ecography*, **33**, 260-271.
- Vernesi, C., Bruford, M. W., Bertorelle, G., Pecchioli, E., Rizzoli, A. & Hauffe, H. C. (2008). Where's the conservation in conservationgenetics? *Conservation Biology*, **22**, 802-804.
- Waltari, E., Hijmans, R. J., Peterson, A. T., Nyári, A. S., Perkins, S. L., & Guralnick, R. P. (2007). Locating Pleistocene Refugia: Comparing Phylogeographic and Ecological Niche Model Predictions. *PLoS ONE*, e563.
- Wauters, L.,A., Amori, G., Gippoliti S., Agnelli, P., Galimberti, A., Casiraghi, M., Preatoni, D. G. & Martinoli, A. (2017). New endemic mammal species for Europe: *Sciurus meridionalis* (Rodentia, Sciuridae). *Hystrix*, 28.
- Wielstra, B., Canestrelli, D., Cvijanović, M., Denoël, M., Fijarczyk, A., Jablonski, D., ... & Babik, W. (2018). The distributions of the six species constituting the smooth newt species complex (*Lissotriton vulgaris sensulato* and *L. montandoni*) - An addition to the new atlas of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia Reptilia*, **39**, 252–259.

- Wu, H., Guiot, J., Brewer, S., & Guo, Z. (2007). Climatic changes in Eurasia and Africa at the last glacial maximum and mid-Holocene: reconstruction from pollen data using inverse vegetation modelling. *Climate Dynamics*, **29**, 211–229.
- Zampiglia, M., Canestrelli, D., Chiocchio, A. & Nascetti, G. (2013). Geographic distribution of the chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* among mountain amphibians along the Italian peninsula. *Diseases of Aquatic Organisms*, **107**, 61–68.
- Zimmermann, N. E., Edwards, T. C., Graham, C. H., Pearman, P. B. & Svenning, J. C. (2010). New trends in species distribution modelling. *Ecography*, **33**, 985–989.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N. & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, **1**, 3–14.