



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

Facoltà di Scienze, Matematiche, Fisiche e Naturali

Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia

XX ciclo

Filogeografia in *Parnassius apollo*, Linnaeus, 1758

(Lepidoptera, Papilionidae)

Valentina Todisco

Docente Guida/Tutor: Prof. Valerio Sbordoni

Coordinatore: Prof.ssa Patrizia B. Albertano

Indice

Abstract	5
Introduzione	7
L'organismo in studio	9
Il genere <i>Parnassius</i>	9
<i>Parnassius apollo</i>	10
Filogeografia nei Lepidotteri	15
Cambiamenti climatici durante il Pleistocene	16
Pattern filogeografici	18
Filogeografia e conservazione	20
Obiettivi	23
Materiali e Metodi	25
Campionamento	27
Tecniche molecolari	29
Il marcatore molecolare: la Citocromo Ossidasi I	29
Estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA	30
Analisi dei dati	31
Variabilità genetica	31
Analisi filogenetica	32
Analisi filogeografica	32
Analisi spaziale della varianza molecolare	33
Equilibrio demografico e stima dei tempi evolutivi	34
Scelta del tasso di mutazione	36

Risultati	37
Variabilità genetica	39
Analisi dei siti variabili e di saturazione	39
Analisi filogenetica	41
Analisi filogeografica	43
Minimum spanning network	43
Nested Clade Phylogeographic Analysis	43
Analisi spaziale della varianza molecolare	47
Equilibrio demografico e stima dei tempi evolutivi	48
Il gruppo Alpi- Appennini	50
Discussione	53
Analisi filogenetica	55
Analisi filogeografica	57
Periodi di espansione in <i>P.apollo</i>	58
Pattern filogeografico e piante alimentari di <i>P.apollo</i>	61
Il gruppo Alpi-Appennini	63
Storia del popolamento appenninico in <i>P.apollo</i> e <i>P.mnemosyne</i>	64
Valutazioni conservazionistiche	67
Conclusione	69
Bibliografia	74

Abstract

Parnassius apollo is a widely distributed Eurasian butterfly species usually represented by small local populations. It's distributed on the main mountain ranges from the Sierra Nevada to Alps, Carpathians, Caucasus to the Altai. Being narrow in its ecological requirement this butterfly is very sensitive to habitat and climatic changes, and in most of its range it is experiencing range contraction and sometimes population extinction. We have sequenced 869 bp of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase I (COI) for 80 populations (N=201) from several portions of the range. Analysis revealed 71 haplotypes genetically structured in two haplogroups: one with the populations from Continental Greece, Anatolia and Central/Northern Europe and one with different groups of populations (Spain, Pyrenees, Sicily, Alps-Appenines, Central Appennine, Peloponnesus, Caucasus, Central Asia), each confined to a geographical area likely result of a past fragmentation. Estimating evolutionary time indicate that populations of *P.apollo* experienced different waves of range expansion end fragmentation in the recent past and in particular they suggest that Upper Pleistocene climatic changes played a major role in shaping the phylogeographic pattern of this butterfly.

Compared to *Parnassius mnemosyne*, which shares a similar range with *P. apollo*, the results suggest a discordant dating in the periods of demographic range expansion of these two species, reflecting their different ecological requirement.

Introduzione

L'organismo in studio

Il genere Parnassius

Tra le farfalle della regione Oloartica, quelle del genere *Parnassius* Latreille, 1804 (Lepidoptera, Papilionidae), attraggono da sempre i tassonomi e i collezionisti, per la loro variabilità geografica e la rarità di alcune specie che sono distribuite in zone remote dell'Himalaya, dell'Asia centrale, Tibet e altre zone del nord Eurasia. Gli adulti presentano una morfologia abbastanza omogenea, con ali trasparenti ai margini e assenza di code sulle ali posteriori. Il genere *Parnassius* insieme al genere *Hypermnestra*, forma la tribù Parnassiini della sottofamiglia Parnassiinae a cui appartiene anche la tribù Zerynthiini con cinque generi (*Zerynthia*, *Allancastris*, *Sericinus*, *Bhutanitis*), e la nuova tribù dei Luehdorfiini (Tutt, 1896) con il genere *Luehdorfia* e *Archon* (Nazari et al., 2007). Uno studio recente (Nazari et al., 2007), basato sull'utilizzo di sette marcatori nucleari e mitocondriali, ha permesso di stabilire che il differenziamento della sottofamiglia Parnassiinae, distribuita dall'altopiano iraniano fino al centro Asia e in Cina, è avvenuta probabilmente 65-42 milioni di anni fa, in seguito alla collisione dell'India e dell'Eurasia.

All'interno del genere *Parnassius* solo *P.apollo*, *P.phoebus* e *P.mnemosyne* sono distribuite in Europa. Le larve di *P.apollo* e *P.phoebus* si nutrono di specie appartenenti alla famiglia delle Crassulaceae: il primo è distribuito dai 600 mt ai 2400 mt, il secondo a più alte altitudini tra i 1400 mt e i 2400 mt. Dechamps-Cottin et al. (2000) hanno inoltre dimostrato che in alcune zone delle Alpi francesi, in cui le due specie si trovano in simpatria, esse si ibridano. *P.mnemosyne* si rinviene invece in habitat ecotonali in ambienti forestali mesofili, dove crescono le piante nutrici, del genere *Corydalis* (Fumariaceae) (Konvicka e Kuras, 1999; Bergström, 2005).

Diversi studi di filogenesi molecolare (Chen et al., 1999; Omoto et al., 2004; Katoh et al., 2005) hanno messo in evidenza che il genere *Parnassius* costituisce un gruppo monofiletico e i raggruppamenti più importanti

coincidono con quelli riconosciuti su base morfologica. *P.apollo* e *P.phoebus* oltre a presentare caratteristiche ecologiche molto simili, risultano essere anche molto affini da un punto di vista genetico. Entrambi appartengono al gruppo degli “Apollo” in senso stretto, insieme ad altre specie (*P.ruckbeili*, *P.bremeri*, *P.jacquemonti*, *P.nomion*, *P.epaphus*, *P.tianschanicus*, *P.actius*, *P.apollonius*, *P.honrathi*) a distribuzione unicamente asiatica e a *P.smintheus*, molto affine a *P.phoebus*, distribuito solo in Nord America. *P.mnemosyne* appartiene invece al gruppo “Mnemosyne” che risulta essere ben differenziato dal gruppo “Apollo”.

Parnassius apollo

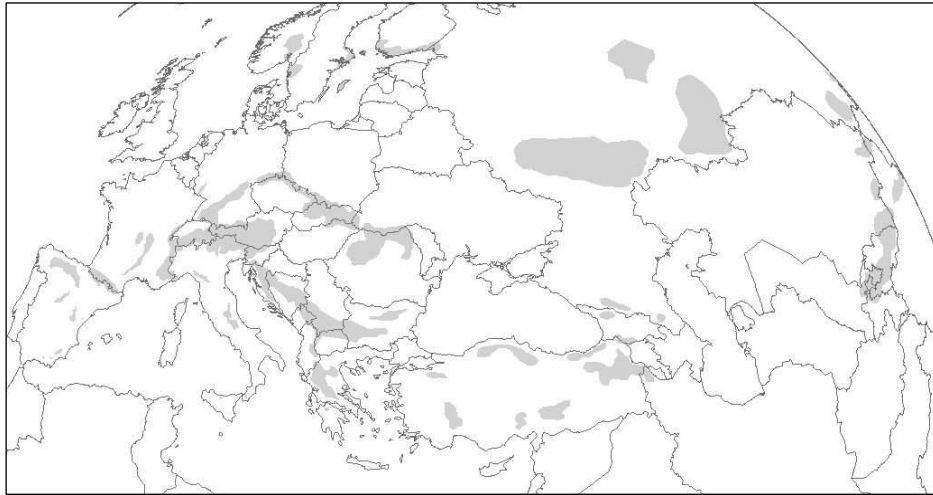
Distribuzione

Il *Parnassius apollo* (Linneus, 1758), è una farfalla di grandi dimensioni, con un’apertura alare di circa 7 cm ed è un buon volatore. E’ una specie a distribuzione paleartica e si rinviene sui principali massicci montuosi dalla Sierra Nevada alle Alpi e ai Carpazi, dal Caucaso fino all’Altai (Fig. 2). Le popolazioni più settentrionali si trovano sulle coste occidentali della Finlandia e sui monti scandinavi Oppland e le più meridionali sulla Sierra Gador in Spagna, sul massiccio delle Madonie in Sicilia, sul monte Erimanthos nel Peloponneso e sui monti Tauri occidentali nel nord-ovest della Turchia; le popolazioni più occidentali si trovano invece sui monti Cantari nel nord-ovest della Spagna e quelle più orientali sui monti Khentei in Mongolia fino al bacino del fiume Lena in Yakutia, Russia (Nakonieczny et al., 2007). In Italia è presente sulla catena alpina ed appenninica e con popolazioni molto localizzate in Sicilia, sulle Madonie. Mentre nelle regioni meridionali dell’areale è limitata alle quote più alte, già sulle Alpi scende a 500 m di quota e le popolazioni scandinave sono le sole a scendere a livello del mare.

A causa della sua ampia distribuzione *P.apollo* si può trovare in diversi tipi di habitat (Krzywicki, 1963; Descimon, 1995): nella brughiera, nella boscaglia, in radure boschive e anche in varie comunità di prateria in biotopi di pianura. L’habitat tipico è però rappresentato da praterie alpine e subalpine, praterie

calcaree e steppe in ambienti montani ed in alcuni casi si trova anche su ghiaioni e pendii rocciosi (Sierra Nevada sopra i 3000 mt, Alpi sopra i 2500 mt e sui Carpazi sopra i 1800 mt). *P.apollo* è rappresentato per lo più da piccole popolazioni localizzate, che in alcuni casi possono essere circoscritte ad un singolo massiccio montuoso o versante, come avviene sulle Alpi o sui Carpazi (Glassl, 1993).

Figura 2. In grigio la distribuzione di *Parnassius apollo* (Glassl, 1993).



Ecologia

Indipendentemente dal tipo di habitat, la distribuzione di *P.apollo* dipende dalla presenza della pianta nutrice della larva. Come le larve di altre specie appartenenti al genere *Parnassius*, quella di *P.apollo* è considerata un'erbivora stenofaga e si nutre solo di specie appartenenti alla famiglia delle Crassulaceae, per lo più del genere *Sedum* e in alcuni casi *Sempervivum*. Diversi studi hanno messo in evidenza che la larva si nutre per lo più di due specie *S.telephium* (e le sue sottospecie) e *S.album* (Ackery, 1975; Kreuzberg, 1987). Per cui in base alle esigenze trofiche si possono distinguere la forma “telefiofaga” e “albofaga” (Nakonieczny e Kedziorski, 2005). Le due forme presentano una diversa distribuzione ed il loro confine si trova in Europa centrale; infatti sui Carpazi le due forme si trovano in zone molto vicine l'una dall'altra. Le popolazioni

“telefiofaghe” sono distribuite in Europa centrale e sono monofaghe; le “albofaghe”, distribuite in Europa occidentale e meridionale, sono da considerarsi oligofaghe.

P.apollo è una specie univoltina e considerando la sua ampia distribuzione, le varie fasi del ciclo vitale hanno luogo in periodi leggermente sfalsati in base alla latitudine. A seconda delle condizioni climatiche, gli adulti volano tra Giugno e Agosto, la vita immaginale va da 2 a 4 settimane e i maschi compaiono qualche giorno prima delle femmine. Si alimentano al mattino presto e alla fine del pomeriggio, per lo più di specie appartenenti alla famiglia delle Dipsacaceae e Compositae, mentre durante le ore più calde della giornata rimangono ad ali aperte in luoghi ombreggiati. Baz (2002) in studi condotti sulla Sierra de Guadarrama (Spagna centrale) ha messo in evidenza che il foraggiamento dell’adulto è limitato ad un numero ristretto di piante, che variano in base alla località e nel tempo, ed inoltre il maschio e la femmina scelgono piante diverse. L’accoppiamento dura 3-4 ore, ma se inizia nel tardo pomeriggio dura tutta la notte. I bruchi sgusciano durante i primi giorni caldi della primavera successiva alla deposizione delle uova e impiegano 2 settimane per completare lo sviluppo, si alimentano solo in piena luce e la crisalide dura 2-3 settimane. I bozzoli vengono tessuti liberi sotto rocce e detriti vegetali.

Classificazione sottospecifica

In base alle condizioni ambientali locali si possono distinguere differenze in *P.apollo* che possono riguardare il pattern alare (presenza, dimensione, aspetto degli eyespots e intensità del colore della banda submarginale), le preferenze trofiche e la dimensione del corpo. Considerando le diverse caratteristiche morfologiche i lepidotterologi hanno distinto circa 200 sottospecie ed essendo il polimorfismo nelle farfalle adulte piuttosto comune, è opinione controversa (Capdeville, 1980; Napolitano et al., 1990; Rivoire, 1998; Brakefield e Gates, 1996) se alcune delle forme descritte come casi di variabilità fenotipica siano il risultato o meno di una diversa espressione genica.

Nel tentativo di chiarire le relazioni tra le varie sottospecie in *P.apollo*, Racheli et al. (1983) hanno confrontato la struttura genetica di 6 popolazioni naturali (Tab. 1) attraverso lo studio di 26 loci enzimatici e di diverse caratteristiche morfologiche. Per lo studio comparativo della variabilità genetica è stata calcolata l'eterozigosi media (H), la percentuale dei loci polimorfici (P) e il numero medio di alleli per locus (A) (Tab. 1), inoltre è stata calcolata la distanza genetica D (Nei, 1972) tra le popolazioni considerate.

Sottospecie	Località	Sigla	H	P	A
<i>P.a. montebaldensis</i>	Alpi Marittime, Mercantour	VAL	0,13	0,38	1,6
<i>P.a. baldensis</i>	Monte Baldo, Alpe Parena	MON	0,10	0,31	1,3
<i>P.a. civis</i>	Ovindoli, Monte Magnola	CIV	0,18	0,50	1,7
<i>P.a. romeii</i>	Gran Sasso, Campo imperatore	ROM	0,12	0,38	1,4
<i>P.a. pumilus</i>	Aspromonte, Montalto	PUM	0,13	0,31	1,3
<i>P.a. hispanicus</i>	Sierra de Albaracin, Orihuela	HIS	0,19	0,38	1,5

Tabella 1. Elenco delle popolazioni con località di campionamento, sigla identificativa e parametri di variabilità.

I risultati indicano che la popolazione *P.a.valderiensis* mostra una variabilità genetica relativamente elevata e la distanza genetica dalle altre popolazioni è relativamente bassa e uniforme ($D=0,07-0,10$). Questi dati hanno portato gli autori a considerare le Alpi il centro di dispersione di *P.apollo* verso Italia, Francia e Spagna. *P.a.montebaldensis* ha invece una variabilità genetica piuttosto bassa e mostra affinità genetica sia con le popolazioni delle Alpi che dell'Appennino centrale ($D=0,07-0,09$). La distanza genetica tra *civis* e *romeii* è relativamente bassa ($D=0,05$); valori simili sono stati trovati in vari gruppi di insetti tra popolazioni morfologicamente non differenziate. Inoltre la minore variabilità genetica in *romeii*, permette di ipotizzare una sua origine da un piccolo numero di individui della sottospecie *civis*. *P.a.pumilus* è molto affine geneticamente alle popolazioni italiane e risulta invece molto differenziato da *hispanicus*.

P.a.hispanicus è molto differenziato da tutte le popolazioni studiate ad eccezione di *valderiensis*. Probabilmente secondo gli autori, popolazioni di

P.apollo delle Alpi occidentali hanno inizialmente colonizzato i Pirenei occidentali, in seguito la parte orientale ed infine le Sierre centrali e meridionali. Tale ipotesi andrebbe a contraddire Kostrowicki (1969), secondo cui la penisola iberica ha rappresentato il centro di dispersione per molte sottospecie di *P.apollo* della Francia e Germania. Infine dai risultati è emerso che: i) *P.a.hispanicus* è il più differenziato sia geneticamente che morfologicamente; ii) la variabilità genetica è maggiore nelle sottospecie morfologicamente più polimorfe (*valderiensis*, *civis* e *hispanicus*) e più bassa in quelle morfologicamente più uniformi (*montebaldensis*, *romeii* e *pumilus*); iii) la variabilità genetica delle varie sottospecie è correlata positivamente sia con la dimensione di popolazione che con l'ampiezza dell'areale.

Misure di conservazione

Parnassius apollo è stata la prima farfalla di cui è stata vietata la cattura in Germania nel 1936 e il primo invertebrato ad essere incluso nell'appendice II della Convenzione sul Commercio Internazionale delle Specie in Estinzione (CITES, all. A), è inoltre inserita nella Convenzione di Berna (app. 2), nella Direttiva Habitat (all. 4) e nella legge Regionale Toscana (all. A). L'areale della specie è in progressiva contrazione su tutto il territorio europeo (20-50% negli ultimi 25 anni). Le estinzioni locali hanno riguardato soprattutto le popolazioni più marginali, come quelle della Sila in Calabria in cui *P.apollo* è ormai estinto, e quelle che occupavano quote più basse. La specie è scomparsa nei Paesi Bassi, in Ungheria e Lettonia, e in numerose località in Germania, Polonia, Francia e penisola scandinava. E' protetto legalmente in 19 dei 28 paesi in cui è presente (Red Data Book of the European Butterflies; Van Swaay e Warren, 1999), e misure di conservazione (13/28 paesi) coinvolgono anche la salvaguardia del suo habitat, come ad esempio in Germania, Polonia e Finlandia.

Filogeografia nei Lepidotteri

I cambiamenti climatici durante il Quaternario rappresentano tra i maggiori eventi storici che hanno modellato la variabilità genetica delle popolazioni naturali nella regione Palearctica (Hewitt, 2000, 2004; Schmitt, 2007). Alla fine del Pleistocene le fluttuazioni climatiche tra periodi freddi e caldi hanno portato alla contrazione o all'espansione della distribuzione geografica della fauna e della flora, determinando i livelli di variabilità genetica e di affinità delle popolazioni attuali (Avice, 2000).

Lo sviluppo di nuove tecniche di genetica molecolare ha consentito di studiare, misurare e confrontare la variabilità genetica nelle popolazioni di una specie e di ricostruirne la filogenesi.

Introdotta un po' meno di dieci anni fa da John Avice e collaboratori (Avice et al., 1987), la filogeografia è un metodo altamente integrativo utilizzato per comprendere le relazioni tra la storia della terra, l'ecologia e la biodiversità. La filogeografia unisce le conoscenze della genetica di popolazioni, della filogenesi, della storia geoclimatica, della paleontologia, della biologia di popolazioni, dell'evoluzione molecolare e della storia biogeografica, per determinare la distribuzione geografica delle linee genetiche (pattern filogeografico), e per comprendere i processi evolutivi, demografici e biogeografici che hanno determinato questo pattern. Il pattern filogeografico può portare alla comprensione della storia evolutiva di una popolazione, di una sottospecie o di una specie.

Gli studi di filogeografia sono aumentati rapidamente negli ultimi anni e per ciò che riguarda gli organismi animali è stata prevalentemente affrontata tramite l'analisi di sequenze di DNA mitocondriale (mtDNA). Le informazioni ottenute tramite questo tipo di approccio sono essenziali per comprendere dinamiche storiche di popolazioni e processi evolutivi (Avice, 1994; Prior et al., 1997) e possono essere la base per progetti di conservazione e di gestione di specie minacciate (es., Frankham et al., 2002; Hrbek et al., 2005). Nonostante ciò, la

filogeografia di specie di farfalle diurne su scala europea è stata relativamente poco studiata, al contrario di ciò che è avvenuto per altri taxa. Pattern filogeografici sono stati descritti solo per: *Aglais urticae* (Vandewoestijne et al., 2003), *Euphydryas aurinia* (Joyce e Pullin, 2001), il complesso di specie dell'*Erebia tyndarus* (Martin et al., 2002), *Erebia triaria*, e *Erebia palarica* (Vila, 2004), *Lycaena dispar* (Lai e Pullin, 2004), *Erebia medusa* (Hammouti, 2006), *Parnassius mnemosyne* (Gratton et al., subm.), *Melitaea cinxia* (Wahlberg e Saccheri, 2007). La maggior parte degli studi di biogeografia molecolare sulle farfalle europee sono basati su dati allozimici: *Parnassius apollo* (Racheli et al., 1983), *Melanargia galathea* e *M. lachesis* (Habel et al., 2005), *Polyommatus icarus* (Schmitt et al., 2003), il gruppo di specie *P.coridon* (Schmitt e Seitz 2001a, 2001b; Schmitt e Krauss, 2004), il gruppo di specie *Maculinea alcon* (Berezki et al., 2005), il complesso *Aricia agestis-artaxerxes* (Aagaard et al., 2002), *Maniola jurtina* (Schmitt et al., 2005), *Pieris napi* (Porter e Geiger 1995), *Coenonympha hero* (Cassel e Tammaru 2003), *Erebia medusa* (Schmitt 1999; Schmitt e Seitz, 2001a), *Erebia epiphron* (Schmitt et al., 2006).

Cambiamenti climatici durante il Pleistocene

Secondo la teoria Croll-Milankovitch il susseguirsi di periodi glaciali e interglaciali, che hanno interessato la storia della terra, sono dovuti essenzialmente ai moti millenari del nostro pianeta come l'eccentricità dell'orbita, la precessione degli equinozi e l'inclinazione dell'asse terrestre. Variazioni regolari dell'orbita terrestre provocarono cambiamenti nella durata dei periodi in cui la terra era esposta al sole ed in cui essa riceveva più energia. Essendo molta di questa energia trasportata dal sistema di circolazione oceanica, il cambiamento dell'orbita terrestre e delle correnti oceaniche causarono grandi cambiamenti climatici (Williams et al., 1998; Webb et al., 1997). Nei periodi freddi (glaciali), la diminuzione della temperatura portò alla

formazione di grosse calotte polari e ghiacciai, che successivamente andavano incontro a scioglimento parziale durante i periodi caldi (interglaciali). Durante le maggiori glaciazioni, la calotta glaciale si ampliava considerevolmente limitando il mare, le zone temperate e la vegetazione arborea in una fascia latitudinale relativamente più stretta o in piccole aree rifugiali (Williams et al., 1998). I ghiacciai che ricoprivano catene montuose come le Alpi, le Ande e le Montagne Rocciose immagazzinavano grandi volumi d'acqua, portando ad un abbassamento del livello del mare di circa 120m (Rholing, 1998) e alla conseguente formazione di connessioni territoriali tra regioni prima separate dal mare, favorendo in tal modo la dispersione delle specie. Nelle zone tropicali l'effetto delle glaciazioni si manifestava soprattutto attraverso cambiamenti bioclimatici che favorivano lo sviluppo di biomi aridi (foreste decidue, steppa, deserto) a spese delle foreste pluviali (Colinvaux, 1997). Questi cambiamenti climatici sembrano aver avuto diversi effetti a seconda della latitudine, delle correnti oceaniche e delle caratteristiche geografiche regionali, per cui le specie hanno modificato la loro distribuzione in base alle caratteristiche climatiche e geografiche locali. A testimoniare queste variazioni climatiche e a datarne gli effetti esiste una notevolissima documentazione di studi sugli isotopi del carbonio e dell'ossigeno e dati provenienti da fossili di polline e testimonianze di piante ritrovate nei ghiacciai (Huntley et al., 1983; Van Andel et al., 1996; Reille et al., 1998).

Le ere glaciali più recenti risalgono al Pleistocene e le quattro più importanti sono chiamate dalla più antica alla più recente: Günz, Mindel, Riss e Würm (Anderson e Borns, 1997). In Europa l'ultimo massimo glaciale (LGM) ci fu durante il Würm, circa 18 mila anni fa; esso portò alla formazione di un enorme ghiacciaio che ricopriva la Britannia e il nord Europa e ad una calotta glaciale sulla cima delle più alte catene montuose come i Pirenei, le Alpi e il Caucaso (Frenzel, 1973; Nilsson, 1983). Al margine dei ghiacciai c'era la tundra, che ricopriva l'Europa (Tzedakis et al., 2002).

Le glaciazioni causarono grandi cambiamenti nella distribuzione delle specie, con l'alternarsi di periodi di espansione e contrazione. Dati che confermano tale ipotesi provengono da reperti fossili di polline e coleotteri in Europa e nord America (Bennett, 1997; Coope, 1994). L'avanzamento dei ghiacciai e del permafrost portò alla perdita di diversi habitat, con la conseguente estinzione di popolazioni locali e/o il loro confino in aree di rifugio. I "rifugi glaciali" rappresentano zone dove la fauna e la flora temperata trovavano condizioni adatte alla loro sopravvivenza durante i periodi freddi. In Europa i maggiori rifugi glaciali sono rappresentati dalle penisole iberica, italiana e balcanica (Hewitt, 1996).

Pattern filogeografici

La distribuzione geografica della variabilità genetica nelle specie dipende da come le popolazioni hanno risposto ai continui cicli di espansione e contrazione associati con i cicli glaciali. La dimensione della popolazione, la capacità di dispersione della specie, il tipo di rifugio, i livelli di flusso genico tra popolazioni e il tasso di ricolonizzazione, sono tutti fattori che hanno contribuito a determinare la struttura genetica delle popolazioni.

Due modelli contrastanti sono stati proposti per descrivere i processi con cui le popolazioni hanno risposto ai cambiamenti climatici nel Pleistocene. Nel modello "pioneer" (Hewitt, 1996), durante i periodi glaciali le popolazioni erano spinte a sud dall'avanzamento dei ghiacci e sopravvivevano solo nei rifugi. Al contrario, durante gli interglaciali le popolazioni si espandevano verso nord a partire dai loro rifugi (Taberlet et al., 1998), colonizzando rapidamente e ripetutamente habitat lontani adatti alla loro sopravvivenza; tale processo comporta una perdita di alleli per effetto del fondatore (Hewitt, 2000). Questo tipo di espansione è caratteristica di molte specie di animali e piante con esigenze ecologiche peculiari, un esempio descritto tra le farfalle è *Polyommatus coridon* (Schmitt e Seitz, 2002; Schmitt et al., 2002). Nel modello

“phalanx”, invece, la colonizzazione verso nord a partire dai rifugi è più lenta e la diversità genetica è mantenuta nelle popolazioni. In questo modello la colonizzazione avviene a breve distanza e conseguentemente i colli di bottiglia sono meno frequenti (Hewitt, 1996). Quest’ultimo modello di espansione è proprio di specie che presentano ampia valenza ecologica come nel caso di alcune specie comuni di farfalle: *Pieris napi* (Geiger e Shapiro 1992; Porter e Geiger, 1995), *Polyommatus icarus* (Schmitt et al., 2003), *Aglais urticae* (Vandewoestijne et al., 1999), *M.jurtina* (Schmitt et al., 2006) e *M.galatea* (Habel et al., 2005).

Per quanto riguarda l’Europa, l’analisi comparativa dei risultati ottenuti da recenti studi filogeografici sui livelli di variabilità presenti in diverse specie ha permesso di distinguere differenti pattern biogeografici molecolari (Schmitt, 2007): “Mediterraneo”, “Continentale”, “Artico” e/o “Alpino”.

Nel gruppo di specie con pattern “Mediterraneo”, una o più linee genetiche cominciano a divergere durante l’isolamento nei rifugi glaciali del Mediterraneo: penisola iberica, balcanica e italiana. Nella maggior parte dei casi, come osservato in molte specie di animali e piante (Hewitt 1999, 2000; Taberlet, 1998), il flusso genico tra popolazioni in queste tre penisole “rifugio” è assente o molto limitato, per cui le popolazioni in queste aree disgiunte vanno incontro ad evoluzione indipendente. Questo pattern filogeografico è stato osservato anche in alcune farfalle come le specie del complesso *Polyommatus coridon/hispana* (Schmitt e Seitz, 2002, Schmitt e Krauss, 2004), quelle del complesso *Melanargia galatea/lachesis* (Habel et al., 2005) e in *Polyommatus bellargus* (Schmitt, unpub.).

Nell’ambito del gruppo di specie con pattern “Mediterraneo”, l’espansione postglaciale può determinare quattro diversi pattern filogeografici che si distinguono a seconda se le Alpi e/o i Pirenei hanno costituito una barriera all’espansione. Nel gruppo di specie con pattern “Continentale” si possono distinguere due pattern biogeografici: i) specie con rifugi non mediterranei, ma che presentano differenti centri geograficamente limitati in Europa (rivestono

particolare importanza la penisola Balcanica, il bacino dei Carpazi e le Prealpi);
ii) specie con espansione postglaciale a partire da diversi centri in Asia, in cui quelli più occidentali sono probabilmente rappresentati dai monti Urali. Tra le specie che presentano questo tipo di pattern ci sono diversi insetti e tra le farfalle *Erebia medusa* (Schmitt et al., 2007) e *Coenonympha hero* (Cassel e Tammaru, 2003).

L'ultimo gruppo è quello delle specie "Artiche" e/o "Alpine" a cui appartengono: i) specie di climi freddi, che durante i periodi glaciali popolavano le steppe periglaciali e presentavano un'ampia distribuzione, come ad esempio la pianta di *Ranunculus glacialis* (Schönswetter et al., 2005) e le farfalle *Zygaena exulans* (Schmitt e Hewitt, 2003) ed *Erebia epiphron* (Schmitt et al., 2006) che, maggiormente diffuse durante i periodi glaciali, presentano oggi una distribuzione disgiunta con diversi rifugi sui principali rilievi montuosi in Europa (Schmitt, 2007).

Filogeografia e conservazione

Sono diversi gli studi, su vertebrati e invertebrati, che dimostrano come la conservazione a lungo termine di una popolazione o di una specie dipende dal mantenimento della sua variabilità genetica (Reed e Frankham, 2003) e che l'isolamento in un ambiente frammentato, con una riduzione del flusso genico tra popolazioni, può contribuire all'erosione genetica (per esempio: Margules et al., 1994; Brookes et al., 1997; Lewis et al., 1997; Clarke e O'Dwyer, 2000; Madsen et al., 2000). Come abbiamo visto precedentemente, la distribuzione della variabilità genetica che oggi noi osserviamo nelle diverse specie, dipende da come le popolazioni hanno risposto ai continui cicli di espansione e contrazione associati ai cicli glaciali durante il Pleistocene. La gestione delle popolazioni e la conservazione della diversità presente nelle specie può quindi essere migliorata aumentando la comprensione dei differenti pattern filogeografici. I motivi biogeografici che hanno portato all'attuale distribuzione

della diversità genetica ci possono aiutare a comprendere le differenti minacce a cui le attuali popolazioni possono essere soggette (Schmitt, 2007).

La filogenesi ha assunto un ruolo essenziale e di supporto alla conservazione con l'introduzione da parte di Moritz (1994) di due concetti utili per individuare le unità prioritarie di conservazione all'interno di una specie, l'"Evolutionarily Significant Unit" ESU e il "Management Unit" (MU). Mentre le ESU possono essere reciprocamente monofiletiche per alleli mitocondriali e avere una divergenza significativa per alleli nucleari, le MU sono popolazioni che presentano una divergenza significativa sia a livello nucleare che mitocondriale. Moritz (1995) inoltre propone che le ESU devono essere alla base della genetica di conservazione, in quanto esse sono la principale sorgente storica di variabilità genetica in una specie.

Le specie più minacciate sono quelle più esigenti, cioè che richiedono particolari condizioni per la loro sopravvivenza, come alcune farfalle diurne. Nelle farfalle lo stadio larvale può richiedere necessariamente un determinato microclima o una particolare pianta ospite, inoltre alcune possono avere una limitata capacità di dispersione (in alcuni casi solo un centinaio di metri), fattore che rende vulnerabili le popolazioni ai cambiamenti improvvisi nell'habitat. Thomas (1995) individua due cause principali per il declino delle farfalle in Europa: i) distruzione e perdita della qualità dell'habitat; ii) eccessiva frammentazione dell'habitat, con riduzione del flusso genico tra le popolazioni. Proprio per queste loro esigenze ecologiche peculiari le farfalle possono rispondere ai grandi cambiamenti ambientali, e sono spesso scelte per comprendere le cause storiche che hanno portato agli attuali pattern filogeografici. Studi recenti mettono in evidenza come i pattern filogeografici possono darci un'informazione sul grado di vulnerabilità di una popolazione (Schmitt e Hewitt, 2004). Confrontando diverse specie di farfalle si è osservata una correlazione tra i livelli di variabilità genetica e la vicinanza o meno ai rifugi glaciali. Le specie in studio infatti, sembrano essere meno minacciate di estinzione (maggiore variabilità genetica) nelle zone di rifugio pleistocenico o

in zone limitrofe ad esse, piuttosto che in regioni lontane dai rifugi, dove presentano una minore variabilità genetica. La scarsa capacità di adattamento di quest'ultime è dovuta ad impoverimento genetico causato da rapide espansioni durante i periodi postglaciali (modello pioneer).

Obiettivi

L'obiettivo di questo studio è valutare la variabilità genetica in *Parnassius apollo* (Linneus, 1758), considerando un campione di popolazioni rappresentative di tutto il suo areale, e ricostruire i processi storici che hanno portato alla sua attuale distribuzione.

Per determinare le relazioni filogenetiche e per descrivere il pattern filogeografico della specie verranno sequenziate 869 bp del gene mitocondriale Citocromo Ossidasi I. La SAMOVA o analisi spaziale della varianza (Dupanloup et al., 2002), permetterà inoltre di distinguere gruppi di popolazioni che sono geograficamente omogenee e ben differenziate da altre. Per cui verranno individuati gruppi di popolazioni non solo su base genetica ma anche geografica, e su di essi verrà verificato l'equilibrio demografico. Inoltre attraverso recenti strumenti analitici basati sulla teoria della coalescenza, per quei gruppi non all'equilibrio ed in assenza di selezione, verranno stimati il tempo di espansione e contrazione demografica con diversi parametri.

I risultati di *P.apollo* per le popolazioni italiane verranno inoltre confrontati con quelli ottenuti in *Parnassius mnemosyne* (Gratton, 2006), che presenta una distribuzione simile a *P.apollo*, ma esigenze ecologiche diverse.

Infine saranno proposte valutazioni utili alla salvaguardia della specie.

Materiali e Metodi

Campionamento

In questo studio sono state analizzate 80 popolazioni distribuite in 17 nazioni, per un totale di 201 individui (Tab. 2 e Fig. 3). Inoltre sono stati inclusi campioni appartenenti ad altre specie del genere *Parnassius*: *P.phoebus*, *P.bremeri*, *P.mnemosyne*, *P.ariadne*, *P.nordmanni*.

Gli individui analizzati sono per lo più esemplari secchi provenienti da varie collezioni (S.Churkin, J.Klir, G.Sala, V.Sbordoni) o da campioni raccolti sul campo tra il 2003 e il 2007 con Autorizzazione del Ministero dell'Ambiente DPN/2D/2005/21020.

Il numero di individui analizzati per popolazione (da tre a nove) è stato determinato dalla disponibilità degli individui in collezione e dalla possibilità di raccolta sul campo.

Figura 3. Distribuzione campioni.

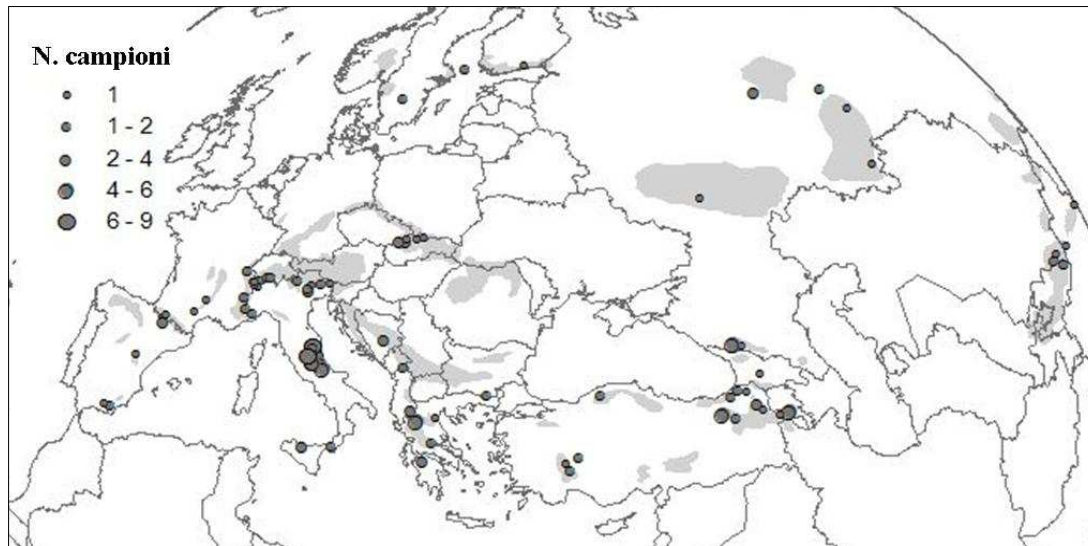


Tabella 2. Campioni analizzati (n.p.=non pervenuto; * =Gratton et al., subm.).

<i>Pop.</i>	<i>Taxon</i>	<i>Nazione e località</i>	<i>N</i>	<i>Lat.</i>	<i>Lon.</i>	<i>Sigla</i>
1	<i>P.a.hispanicus</i>	ES:Fries de Albarracin,Valle del Guado	1	40.33	-1.61	ALB
2	<i>P.a.nevadensis</i>	ES:Andalusia,Sierra Nevada	1	37.08	-3.18	NEV
3	<i>P.a.filabricus</i>	ES:Andalusia,Sierra de los Filabres	2	37.22	-2.34	FIL
4	<i>P.a.aragonicus</i>	ES:Pirenei,Panticosa	1	42.72	-0.28	PAN
5	<i>P.a.finnmarchicus</i>	FIN:Etela-Suomi	1	60.53	26.41	FIN
6	<i>P.a.fennoscandicus</i>	FIN:Arcipelago SW Finland	2	60.21	19.93	SWA
7	<i>P.a.norvegicus</i>	S:Schereden	2	57.78	14.35	SCH
8	<i>P.a.valesiacus</i>	CH:Alpi, Gr.St.Bernard	2	45.91	7.36	STB
9	<i>P.a.valesiacus</i>	CH:Laggintal,Sempione	2	46.16	8.05	LAG
10	<i>P.a.substitutus</i>	F:Briançon,M. Gramom	2	44.9	6.68	BRI
11	<i>P.a.nivatus</i>	F:Alpi,Gex,Col della Faucille	2	46.33	6.05	GEX
12	<i>P.a.lozerae</i>	F:Massif Central,Causse Majean	1	44.24	3.35	HUR
13	<i>P.a.lozerae</i>	F:Massif Central,Maures	1	43.55	2.56	MAU
14	<i>P.a.pyrenaicus</i>	F:Pirenei,Lac D'Estaing	4	42.54	00.13	LAC
15	<i>P.a.pyrenaicus</i>	F:Pirenei,Super Bareges	1	42.92	-0.07	SBA
16	<i>P.a.substitutus</i>	F:Alpi,La Basee,L' Argentiere	1	44.21	7.03	LAB
17	<i>P.a.siciliae</i>	I:Sicilia,Madonie,Pizzo Carbonara	3	37.88	14	MAD
18	<i>P.a.pumilus</i>	I:Aspromonte, M.Alto	2	38.16	15.9	ALT
19	<i>P.a.civis</i>	I:Abruzzo,Assergi-C.imperatore	5	42.42	13.55	ASS
20	<i>P.a.civis</i>	I:Abruzzo,M.Magnola	9	42.13	13.45	MAG
21	<i>P.a.civis</i>	I:Abruzzo,Pizzo Ovindoli	5	42.12	13.49	OVI
22	<i>P.a.italicus</i>	I:Abruzzo,Majella	4	42.08	14.15	MAI
23	<i>P.a.italicus</i>	I:Abruzzo,Majella, Pizzoferrato	6	41.9	14.3	PIZ
24	<i>P.a.euappenninus</i>	I:Abruzzo,M.Morrone,Ghiaccio Rosso	6	42.11	13.96	MMO
25	<i>P.a.euappenninus</i>	I:Abruzzo,Gran Sasso,M.Corvo	8	42.48	13.46	COV
26	<i>P.a.euappenninus</i>	I:Lazio,M.Terminillo	9	42.46	12.99	TER
27	<i>P.a.euappenninus</i>	I:Marche,M.Rotondo	8	42.97	13.18	MRT
28	<i>P.a.euappenninus</i>	I:Marche,M.Palazzo Borghese	2	42.86	13.23	PAB
29	<i>P.a.valdierensis</i>	I:Piemonte,Bosco Navette	2	44.11	7.73	BOS
30	<i>P.a.valdierensis</i>	I:Piemonte,Sambuco	2	44.33	7.07	SAM
31	<i>P.a.valesiacus</i>	I:Piemonte,Varzo	2	46.24	8.3	VAR
32	<i>P.a.pedemontanus</i>	I:Valle D'Aosta,Val di Cogne	1	45.58	7.39	COG
33	<i>P.a.pedemontanus</i>	I:Valle D'Aosta,Val Vèny	1	45.78	6.9	COU
34	<i>P.a.pedemontanus</i>	I:Valle D'Aosta,Valgrisanche	1	45.62	7.06	GRI
35	<i>P.a.pedemontanus</i>	I:Valle D'Aosta,Morgex	1	45.78	7.02	MOR
36	<i>P.a.triumphator</i>	I:Veneto,Croce D'Aune	1	46.06	11.81	DAU
37	<i>P.a.grappensis</i>	I:Veneto,M. Grappa	3	45.85	11.77	GRP
38	<i>P.a.victoralis</i>	I:Veneto,Loc. Lazzaretti	2	45.9	11.63	LAZ
39	<i>P.a.friulanus</i>	I:Trentino,Lago Tramonti	2	46.26	12.67	CAM
40	<i>P.a.montanus</i>	I:Trentino,Passo Tonale	2	46.28	10.65	TON
41	<i>P.a.julianus</i>	I:Friuli,Sella Carniza	1	46.33	13.31	CAR
42	<i>P.a.carpathicus</i>	SK:Carpazi, Podmanin	3	48.97	18.47	STR
43	<i>P.a.interversus</i>	SK:Carpazi,Bile-Vrsatec	4	49	18	BIL
44	<i>P.a.antiquus</i>	SK:Carpazi,Manin	1	49.11	18.48	MAN
45	<i>P.a.oraviensis</i>	SK:Carpazi,Osobità	1	49.26	19.73	OSO
46	<i>P.a.lipatauensis</i>	SK:Carpazi,Chocske Pohorie	1	49.13	19.33	POH
47	<i>P.a.dardanus</i>	AL:M. Collates,Valbona	2	42.44	19.89	TRO
48	<i>P.a.bosniensis</i>	BIH: Sarajevo, M. Bjelasnica	4	43.77	18.29	BJE
49	<i>P.a.atrides</i>	GR:Pelop.,Monte Erinanthos	3	37.96	21.85	ERI
50	<i>P.a.graecus</i>	GR:Ioannina,Oros Grammos	3	40.33	20.78	GRA
51	<i>P.a.graecus</i>	GR:Katara,Passo Katara	5	39.79	21.2	KAT
52	<i>P.a.graecus</i>	GR:Lamia,Oiti Oros	2	38.81	22.28	LAM
53	<i>P.a.olympiacus</i>	GR:Thessalia,Monte Olimpo	1	40.08	22.34	OLI
54	<i>P.a.rhodopensis</i>	BG:K"rdzhali,Rodopi	2	41.3	25.48	ROD
55	<i>P.a.tkatsukovi</i>	TR:Igdir,Ararat	1	39.72	44.27	ARA
56	<i>P.a.tkatsukovi</i>	TR:Kars,Agveran	1	40.07	43.21	AGV
57	<i>P.a.tirabzonus</i>	TR:Artvin,Artvin	2	41.15	41.7	ART
58	<i>P.a.tirabzonus</i>	TR:Artvin,Kackar Dagi	2	40.86	41.2	KAC

59	<i>P.a.caucasicus</i>	TR:Artvin,Yalnizçam Daglari	1	41.08	42.21	YAL
60	<i>P.a.paphlagonicus</i>	TR:Karabuk, Ahmetusta	2	41.38	32.72	KAR
61	<i>P.a.anatolicus</i>	TR:Anatolia,Konia,Sultan Dagh	2	38.33	31.33	KON
62	<i>P.a.tauricus</i>	TR:Anatolia,Tota Dagh	1	38.01	30.5	TOT
63	<i>P.a.tauricus</i>	TR:Isparta,Anatolia,Davras Dagh	2	37.74	30.74	DAV
64	<i>P.a.dubius</i>	TR:Kars,Sarikamis	4	40.38	42.83	SAR
65	<i>P.a.dubius</i>	TR:Baybut,Kop Dagi Geçidi	6	40.05	40.44	KOP
66	<i>P.a.dubius</i>	TR:Erzurum,Palandoken Daglari	2	39.77	41.24	PAL
67	<i>P.a.tkatsukovi</i>	AM:Agveran vill.	6	39.8	44.58	ARM
68	<i>P.a.ciscaucasicus</i>	GE:Mesketskiy,Azkuri	1	41.82	43.38	CISa
69	<i>P.a.ciscaucasicus</i>	RUS:Caucaso, Mt.Elbrus	1	43.34	42.43	CISb
70	<i>P.a.ciscaucasicus</i>	RUS:Caucaso,fiume Aksaut	6	43.47	41.8	AKS
71	<i>P.a.democratus</i>	RUS:Medvedov	4	57.99	50.55	KIR
72	<i>P.a.uralensis</i>	RUS:M. Urali,fiume Chusovaya	2	57.8	58.8	URA
73	<i>P.a.uralensis</i>	RUS:M. Urali,lago Itkul	1	56.16	60.56	LIMa
74	<i>P.a. uralensis</i>	RUS:Siberia,Arkaim	1	52.37	59.33	LIMb
75	<i>P.a.democratus</i>	RUS:Voronezh,alture del Volga	1	51.48	41.61	VOR
76	<i>P.a.minerva</i>	KS:Tian-Shan,Altyn Arashan	2	42.46	78.55	ALA
77	<i>P.a.transiliensis</i>	KZ:Alma-Ata (Almati)	2	43.11	76.9	ALM
78	<i>P.a.transiliensis</i>	KZ:Almaty	1	43.32	77.78	TRA
79	<i>P.a.mongolicus</i>	RC:Sinkiang,Barkol	1	43.65	92.98	BAR
80	<i>P.a.minerva</i>	RC:Sinkiang,Zhaosu	1	43.23	81.13	ZHA
	<i>P.phoebus</i>	I:Trentino,Peio	1	46.38	10.65	-
	<i>P.bremeri</i>	-	1	-	-	-
	<i>P.mnemosyne*</i>	-	1	-	-	-
	<i>P.ariadne*</i>	-	1	-	-	-
	<i>P.nordmanni*</i>	-	1	-	-	-

Tecniche molecolari

Il marcatore molecolare: la Citocromo Ossidasi I

Per valutare la variabilità genetica presente nelle diverse popolazioni di *Parnassius apollo* sono state sequenziate 869 bp del gene mitocondriale Citocromo Ossidasi I (COI). La citocromo ossidasi è l'ultimo elemento della catena respiratoria e ha la funzione di catalizzare il trasferimento di elettroni dal ferrocitocromo c all'ossigeno molecolare, che è l'accettore finale. Il gene che codifica per la subunità I della citocromo ossidasi, benché se confrontato alla regione di controllo sia una delle regioni più conservate del genoma mitocondriale degli insetti, possiede alcune caratteristiche che lo rendono particolarmente adatto per risolvere le relazioni filogenetiche tra specie affini (Sperling et al., 1995, 1999; Lunt et al., 1996; Moran et al., 1999; Caterino e Sperling, 1999; Farrell, 2001; Quek et al., 2004) e per descrivere pattern filogeografici (Walberg e Saccheri, 2007; Gratton et al., sub.; Hammouti, 2006; DeChaine e Martin, 2004; Vandewoestijne, 2003; Brower, 1994). Diversi studi

hanno inoltre dimostrato che il suo tasso di mutazione può considerarsi costante, quindi può essere utilizzato per stimare i tempi di divergenza tra diverse linee genetiche e per la datazioni di eventi biogeografici pleistocenici (Allegrucci et al., 2005; Gratton et al., sub.; Sequeira et al., 2000; Moran et al., 1999).

Estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA

L'estrazione del DNA è stata eseguita a partire da due zampe, sia per i campioni secchi che per quelli catturati sul campo; in quest'ultimo caso dopo il prelievo, le zampe sono state conservate in Etanolo al 100% e l'individuo rilasciato in natura. Il DNA è stato estratto utilizzando "GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit" della Sigma, diluito in 100 µl di buffer e conservato a -40°C.

Tutte le amplificazioni sono state compiute in una soluzione di 25µl contenente: 12,5µl di Master Mix (Promega, Madison, Wi, USA; con 0.625 unità di Taq DNA polimerasi, un buffer di reazione a pH 8,5, 200 µM dNTP, 1,5 µM di MgCl₂), 0,25 µl di ciascun primer, 11 µl di acqua sterile e 1 µl di DNA. I primer universali per gli invertebrati S1718/N2191 e J2183/UEA8 (S1718, J2183, N2191: Simon et al., 1994; UEA8: Lunt et al., 1996) sono stati inizialmente utilizzati per amplificare due segmenti tra loro sovrapponibili. Successivamente per facilitare l'amplificazione, in particolare nei campioni secchi, ho disegnato i primer APO2/APO3 e APO1/APO4 (APO2: TGA TGA GCC AAA CAA T AAT CCTA ATA AA; APO3: GAT TTT GAT TAT TAC CCC CCT CAT; APO1: AGT TTA TAT TTT AAT TTT ACC TGG TTT CGG AA; APO4: ATT TAA TGA TAG TCC TGT RAA TAA RGG A) sulle sequenze ottenute.

Il programma di amplificazione utilizzato è costituito da una denaturazione iniziale a 94°C per 5 min., 5 cicli di denaturazione a 98°C per 15 sec., annealing a 46°C per 45 sec., estensione a 62°C per 1 min. e 30 sec., seguiti da 30 cicli di denaturazione a 92°C per 15 sec., annealing a 48°C per 45 sec, estensione a 62°C per 1 min. e 30 sec., ed infine un'estensione a 62°C per 7 min. I prodotti di

amplificazione sono stati separati attraverso elettroforesi su un gel di agarosio all'1% e purificati con ExoSap (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) attraverso un incubazione a 37C° per 30 min e a 80C° per 30 min.

I prodotti purificati sono stati sequenziati con Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA). La reazione di sequenza è avvenuta in una soluzione totale di 20µl contenente 4 pmol di primer iniziale, 10µl di acqua sterile e 1-3µl di prodotto amplificato, con 35 cicli di denaturazione a 96C° per 10 sec., annealing a 50C° per 5 sec. e 60C° per 3 min. e 30 sec. Per rimuovere l'eccesso di DyeDeoxy™ terminator, i prodotti della reazione di sequenza sono stati purificati con precipitazione sodio acetato/etanolo (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit protocol, Applied Biosystems) e sospesi poi in 20µl di formammide. I cromatogrammi sono stati ottenuti con elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems) nel Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma "Tor Vergata".

Per *P.mnemosyne*, *P.ariadne* e *P.nordmanni*, l'estrazione e il sequenziamento sono stati condotti utilizzando procedure già descritte in Gratton et al. (subm.) e Konopinski (2007).

Analisi dei dati

Variabilità genetica

Il programma SEQUENCHER 4.1 (1999-2000, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan) ha permesso di allineare automaticamente le sequenze complementari e correggere eventuali ambiguità. Il programma PAUPUP 1.0.3.1 BETA (Calendini e Martin, 2005) è stato impiegato per calcolare la frequenza delle diverse basi nucleotidiche e per il test di omeogeneità delle frequenze nucleotidiche tra taxa, condotto con il test del χ^2 . Con DNASP 4.10.9 (Rozas et al., 2003) è stato calcolato il numero di siti polimorfici, la proporzione di siti sinonimi e non sinonimi, sono stati distinti i vari aplotipi ed è stata calcolata la

diversità aplotipica in ciascuna popolazione (Nei, 1987). Infine attraverso il test di Tajima (1989) è stato valutato se tutte le mutazioni sono selettivamente neutrali. Inoltre per valutare il livello di saturazione del segnale filogenetico, per ciascuna posizione (prima, seconda e terza) nel codone e per tutte, attraverso il programma DAMBE (Xia et al., 2001) la distanza genetica di Jukes e Cantor (1969) è stata messa in relazione con il numero delle transizioni (Ti) e delle trasversioni (Ts).

Analisi filogenetica

Le relazioni filogenetiche tra i diversi aplotipi sono state ricostruite utilizzando un metodo di distanza, il Neighbor Joining (NJ) con PAUPUP 1.0.3.1 BETA (Calendini e Martin, 2005). Il modello evolutivo è stato scelto con il Likelihood Ratio test tra 56 modelli evolutivi attraverso MODELTEST 3.7 (Posada e Crandall, 1998), con cui è stato calcolato anche il parametro della distribuzione gamma e la proporzione di siti invariati. La robustezza dei nodi è stata valutata attraverso il bootstrap, con 1000 repliche.

Analisi filogeografica

La Nested Clade Phylogeographic Analysis (NCPA) è un metodo che integra i risultati ottenuti dalla filogenesi con la distribuzione geografica degli aplotipi considerati.

Studi recenti (Panchal e Beaumont, 2007; Petit, 2008) hanno testato la veridicità di quest'analisi attraverso l'utilizzo di diverse simulazioni e non sempre il risultato era compatibile con l'atteso. Inoltre un recentissimo studio di Templeton (2008) afferma che i falsi positivi osservati nelle simulazioni di Panchal e Beaumont (2007) non derivano da errori nella NCPA, ma da errori nella simulazione. Per cui Templeton sconsiglia di utilizzare il programma di Panchal e Beaumont (2007).

In questo lavoro la NCPA è stata realizzata sia utilizzando un approccio tradizionale che con il programma automatico di Panchal e Beaumont (2007), ed i risultati ottenuti sono gli stessi.

La NCPA è basata sul testare un'ipotesi nulla: non esiste nessuna correlazione tra la posizione di un determinato aplotipo in un albero filogenetico e la sua distribuzione geografica. L'analisi inizia con il costruire un minimum spanning network degli aplotipi, con parsimonia statistica utilizzando TCS 1.18 (Clement et al., 2000); in seguito i vari cladi vengono distinti in base a quanto descritto in Templeton et al. (1987) e Templeton e Sing (1993) per ottenere un network nidificato. In questo lavoro sono state considerate solo quelle connessioni che si presentavano con un valore superiore al 98%. Successivamente GEODIS 2.4 (Posada et al. 2000) ha permesso di valutare, per ciascun clade ad ogni livello di nidificazione, se esiste una correlazione tra il clade e la sua distribuzione geografica. A tal fine le coordinate geografiche di ciascun aplotipo sono state utilizzate per calcolare alcuni indici statistici: i) D_c misura la distribuzione geografica di un clade; ii) D_n misura come un clade è distribuito geograficamente rispetto agli altri nello stesso livello superiore di nidificazione; iii) I-T (interior tip) è calcolato in ciascuna categoria di nidificazione come la distanza interna media meno la distanza media dalla punta. La significatività di questi indici è determinata da un metodo di Monte Carlo, ed è stata considerata una soglia del 5% con 1000 permutazioni. L'interpretazione biologica dei risultati è stata ottenuta seguendo "inference key" di Templeton et al. (2004).

Analisi spaziale della varianza molecolare

La SAMOVA o analisi spaziale della varianza (Dupanloup et al., 2002), è un metodo utilizzato per distinguere gruppi di popolazioni che sono geograficamente omogenee e ben differenziate da altre. Il risultato consiste nell'identificazione di barriere genetiche tra gruppi. Al contrario dei classici test di struttura genetica (AMOVA, Excoffier et al., 1992), in cui i gruppi di popolazione sono definiti a priori sulla base di caratteristiche fisiche,

ecologiche, linguistiche o culturali, questo metodo riconosce un gruppo solo sulla base di dati genetici.

LA SAMOVA si basa sull'algoritmo della "Simulated Annealing" (SA), che ha lo scopo di massimizzare la varianza genetica totale dovuta a differenze tra gruppi di popolazioni. L'analisi inizia con la suddivisione casuale, attraverso poligoni di Voronoi (Voronoi, 1908) delle n popolazioni campionate in K gruppi. Successivamente la SA viene utilizzata per trovare la composizione dei K gruppi e massimizzare l'indice F_{CT} , che rappresenta la proporzione di varianza genetica totale dovuta a differenze tra gruppi di popolazioni.

L'analisi è stata condotta utilizzando il programma SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al., 2002) con 100 permutazioni, e sono stati considerati un numero progressivamente crescente di gruppi K .

Equilibrio demografico e stima dei tempi evolutivi

L'equilibrio demografico in differenti gruppi di sequenze è stato testato applicando le statistiche D (Tajima, 1989) e F_s (Fu, 1997). Valori significativamente negativi di entrambi i valori D e F_s sono associati (in assenza di selezione) ad eventi di espansione demografica. I valori di D e F_s e la loro significatività ($P < 0,05$ per D e $P < 0,02$ per F_s) sono stati calcolati con ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005).

Considerando che l'aumento della dimensione di una popolazione lascia caratteristici segni nella distribuzione delle differenze tra sequenze di DNA mitocondriale (*mismatch distribution*), la *mismatch distribution* può darci delle informazioni sulla storia dei cambiamenti che hanno interessato la dimensione di una popolazione. Se una popolazione è stata stabile per lungo tempo la distribuzione sarà irregolare e non uniforme, al contrario la *mismatch distribution* di una popolazione che è stata sottoposta ad espansione demografica sarà uniforme e presenterà un picco. La posizione del picco corrisponde al tempo "t" in cui la popolazione ha subito l'espansione

demografica. La distribuzione attesa del *mismatch* secondo un modello di rapida espansione demografica (*sudden expansion*) e il parametro $\tau=2\mu t$ sono stati calcolati con ARLEQUIN 3.11 (Schneider e Excoffier et al., 1999), ed un test di *goodness of fit* è stato utilizzato per valutare la consistenza delle distribuzioni osservate con le attese in base al modello. Il modello di rapida espansione demografica prevede che t generazioni fa, una popolazione di dimensione N_0 all'equilibrio demografico si espande in modo istantaneo raggiungendo la dimensione N_1 , rimasta invariata fino ad oggi.

Per stimare il tempo di coalescenza (time to Most Recent Common Ancestor, tMRCA) di insieme definiti di sequenze è stato utilizzato il programma BEAST 1.4.5 (Drummond e Rambaut, 2007). Questo programma impiega un algoritmo di campionamento basato su catene di Markov (Drummond et al., 2002) per ottenere un campione della distribuzione delle probabilità a posteriori di diversi parametri demografici, incluso il tMRCA e la dimensione di popolazione, consentendo di impostare modelli genealogici compatibili a diversi scenari demografici. Il maggiore vantaggio di quest'analisi è che non si ottiene una sola genealogia delle sequenze ma tutte le possibili genealogie, pesante in base al loro tempo di persistenza nella catena di Markov. Il modello evolutivo scelto per questa analisi è HKY+ Γ , con due partizioni indipendenti (codone 1+2 e codone 3) (Shapiro et al., 2006). Il Bayesian Skyline Plot (BSP; Drummond et al., 2005) è stato scelto come il "tree prior". Il BSP non assume un andamento demografico monotono, e appare il più adatto per tracciare la storia demografica di popolazioni sottoposte a cambiamenti climatici e ambientali dell'Europa pleistocenica e olocenica.

Il modello di Isolamento con Migrazione (IM; Nielsen e Wakeley, 2001) è stato applicato nel caso in cui alla base dell'attuale distribuzione della variabilità genetica c'è un evento di divergenza improvvisa di una popolazione originariamente panmittica, in due popolazioni distinte geneticamente, sebbene connesse da un certo grado di flusso genico. Il programma IM (Hey e Nielsen, 2004) è stato utilizzato per far correre le Catene di Monte Carlo Markov

(MCMC) (Drummond et al., 2002), utilizzando come modello evolutivo HKY. L'analisi stima la probabilità a posteriori delle distribuzioni, considerando sette parametri demografici che comprendono: il tempo di divergenza "t", due tassi di flusso genico direzionale, l'effettiva dimensione delle due popolazioni attuali e della popolazione ancestrale, ed infine un parametro che dà una stima di quanto la popolazione ancestrale ha contribuito a formare ciascuna delle popolazioni discendenti.

Scelta del tasso di mutazione

Studi recenti (Ho et al., 2005; Ho e Larson, 2006) hanno messo in evidenza che utilizzando tassi di mutazione "filogenetici" in studi di popolazione si può ottenere una sistematica sovrastima della datazione di eventi evolutivi recenti. Nella traduzione dei parametri demografici ed evolutivi su scala di tempi assoluti, in questo lavoro si è scelto di utilizzare due diversi tassi di mutazione: i) il tasso di evoluzione ottenuto per *Parnassius mnemosyne* di Gratton et al. (subm.), basato su un set di dati con un livello comparabile di divergenza nucleotidica; ii) quello ottenuto in lavori filogenetici, come ad esempio il tasso di mutazione di Brower (1994).

Gratton et al. (subm.) hanno ottenuto una stima del valore medio del tasso di mutazione (0.08/Ma) in popolazioni nord-europee di *P. mnemosyne*. Tale tasso di mutazione è stato ottenuto con un'analisi basata su modelli di coalescenza, assumendo che la colonizzazione baltica sia avvenuta a partire da 10.000-11.000 anni fa, dopo lo scioglimento della calotta glaciale scandinava.

Risultati

Variabilità genetica

Un frammento completo di 869 bp del gene mitocondriale COI è stato ottenuto dall'allineamento di frammenti complementari per 201 individui appartenenti a varie popolazioni di *Parnassius apollo* e di un individuo ciascuno per le specie *P.phoebus* e *P.bremeri* (Tab. 2).

Il test di omeogeneità delle frequenze nucleotidiche tra sequenze è stato condotto con il test del χ^2 ed il risultato ottenuto ($P= 1.0$) mostra che i dati osservati non si discostano significativamente da un'ipotesi di omogeneità. Il calcolo del valore medio totale per ciascuna base (30.1% A, 13.8% C, 15% G, 41% T) ha messo in evidenza che l'adenina e la timina presentano una maggiore frequenza e il valore della loro somma $A+T= 71.1\%$ è compatibile con i risultati ottenuti per lo stesso gene in vari ordini di insetti (Lunt et al., 1996).

I risultati dimostrano che i 201 individui analizzati di *P.apollo* possono essere distinti in 71 aplotipi mitocondriali con una diversità aplotipica totale $H_d=0.941\pm 0.010$, ed inoltre 77 siti su 869 (8.86%) sono polimorfici. In tabella 3 sono indicati gli aplotipi e la diversità aplotipica per popolazione.

Analisi dei siti variabili e di saturazione

Analizzando i 77 siti polimorfici è possibile ricavare il numero complessivo di sostituzioni sinonime e non sinonime: nel campione di 201 *P.apollo*, ben 203 sostituzioni risultano essere sinonime e 664 non sinonime.

Il test di Tajima (1989) ha permesso di respingere l'ipotesi di selettività naturale per il campione di *P.apollo* ($D= -0.95355$ e $P > 0.1$).

Per valutare la variabilità dei diversi siti nucleotidici nel codone aminoacidico (prima, seconda e terza posizione) e il livello di saturazione del segnale filogenetico, la distanza genetica (d) di Jukes e Cantor (1969) è stata messa in relazione con il numero di transizioni (Ti) e il numero di trasversioni (Ts) (Fig.4). In quest'analisi gli outgroups sono stati esclusi, in quanto presentando in alcuni casi un alto livello di divergenza con i campioni analizzati, avrebbero

Tabella 3. Numero di individui (N), aplotipi (H) e diversità aplotipica (H_d) presente in ciascuna popolazione.

<i>Sigla</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	H_d	<i>Sigla</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	H_d	<i>Sigla</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	H_d
ALB	1	H ₁₀	-	SAM	2	H ₉ ,H ₁₈	1.000±0.500	YAL	1	H ₆₀	-
NEV	1	H ₁₃	-	VAR	2	H ₄₈	0.000±0.000	KAR	2	H ₆₄	0.000±0.000
FIL	2	H ₁₁	0.000±0.000	COG	1	H ₃₁	-	KON	2	H ₆₅ ,H ₆₆	1.000±0.500
PAN	1	H ₁₂	-	COU	1	H ₃₂	-	TOT	1	H ₆₇	-
FIN	1	H ₁₉	-	GRI	1	H ₃₃	-	DAV	2	H ₆₁ ,H ₆₂	1.000±0.500
SWA	2	H ₁₉ ,H ₂₀	1.000±0.500	MOR	1	H ₄₂	-	SAR	4	H ₅₄	0.000±0.000
SCH	2	H ₂₀	0.000±0.000	DAU	1	H ₉	-	KOP	6	H ₆₇ ,H ₆₈ ,H ₆₉	0.733±0.155
STB	2	H ₉	0.000±0.000	GRP	3	H ₉	0.000±0.000	PAL	2	H ₆₇ ,H ₇₀	1.000±0.500
LAG	2	H ₉ ,H ₃₄	1.000±0.500	LAZ	2	H ₉	0.000±0.000	ARM	6	H ₁ ,H ₂ ,H ₃	0.733±0.155
BRI	2	H ₉ ,H ₁₄	1.000±0.500	CAM	2	H ₉ ,H ₃₀	1.000±0.500	CISa	1	H ₅₄	-
GEX	2	H ₁₅	0.000±0.000	TON	2	H ₄₆ ,H ₄₇	1.000±0.500	CISb	1	H ₅₅	-
HUR	1	H ₉	-	CAR	1	H ₉	-	AKS	7	H ₅₂ ,H ₅₃	0.524±0.209
MAU	1	H ₉	-	STR	3	H ₂₀	0.000±0.000	KIR	4	H ₅₆ ,H ₅₇ ,H ₄₉	0.833±0.222
LAC	4	H ₁₆ ,H ₁₇ ,H ₁₂	1.000±0.272	BIL	4	H ₂₀	0.000±0.000	URA	2	H ₄₉	0.000±0.000
SBA	1	H ₁₂	-	MAN	1	H ₂₀	-	LIMa	1	H ₅₈	-
LAB	1	H ₁₈	-	OSO	1	H ₂₀	-	LIMb	1	H ₄₉	-
MAD	3	H ₃₅ ,H ₃₆	0.667±0.314	POH	1	H ₂₀	-	VOR	1	H ₅₉	-
ALT	2	H ₂₈	0.000±0.000	TRO	2	H ₄	0.000±0.000	ALA	2	H ₄₉	0.000±0.000
ASS	5	H ₉ ,H ₂₉	0.400±0.237	BJE	4	H ₅ ,H ₆	0.500±0.265	ALM	2	H ₄₉ ,H ₅₀	1.000±0.500
MAG	9	H ₉ ,H ₃₇ ,H ₃₈ ,H ₃₉	0.750±0.112	ERI	3	H ₂₁	0.000±0.000	TRA	1	H ₄₉	-
OVI	5	H ₃₇	0.000±0.000	GRA	3	H ₂₂ ,H ₂₃	0.667±0.314	BAR	1	H ₄₉	-
MAI	4	H ₄₀ ,H ₄₁	0.500±0.265	KAT	5	H ₂₄ ,H ₂₅ ,H ₂₆	0.700±0.218	ZHA	1	H ₅₁	-
				PIZ	6	H ₄₁	0.000±0.000	LAM	2	H ₂₇	0.000±0.000
				MMO	6	H ₄₀ ,H ₄₁	0.533±0.172	OLI	1	H ₂₄	-
				COV	8	H ₉	0.000±0.000	ROD	2	H ₇ ,H ₈	1.000±0.500
				TER	9	H ₃₇ ,H ₄₄ ,H ₄₅	0.417±0.191	ARA	1	H ₁	-
				MRT	8	H ₄₃ ,H ₉	0.250±0.180	AGV	1	H ₁	-
				PAB	2	H ₉	0.000±0.000	ART	2	H ₆₀	0.000±0.000
				BOS	2	H ₉	0.000±0.000	KAC	2	H ₅₄ ,H ₆₃	1.000±0.500

influito sul grado di saturazione.

In prima posizione non si osserva molta variabilità: non c'è nessuna trasversione e le transizioni tendono ad aumentare proporzionalmente alla distanza genetica con un andamento rettilineo. In seconda posizione ci sono solo tre sostituzioni. In terza posizione si osserva un numero considerevolmente maggiore di trasversioni e transizioni: le prime aumentano molto poco con l'aumentare della distanza genetica, mentre le seconde aumentano proporzionalmente in misura significativa. Per valutare la variabilità

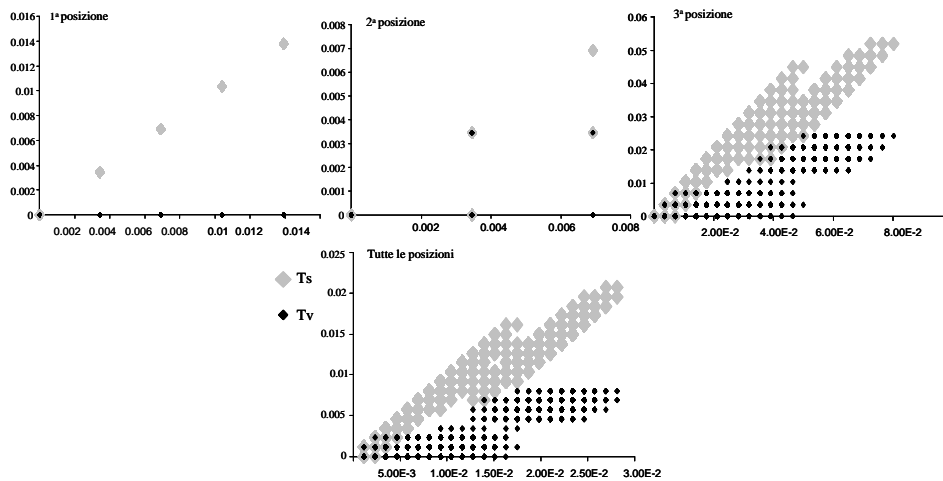


Figura 4. Numero di sostituzioni nucleotidiche (transizioni, Ts e trasversioni, Tv) in relazione alla distanza genetica d di Jukes e Cantor (1969).

complessiva, è stato inoltre costruito il grafico anche considerando contemporaneamente tutte e tre le posizioni nel codone ed il risultato ovviamente è molto simile a quello osservato in terza posizione.

Nella sequenza nucleotidica analizzata si riscontra, come atteso, una maggiore variabilità in terza posizione e un aumento del numero delle transizioni proporzionale alla distanza genetica. Il numero di transizioni non si avvicina alla fase asintotica, per cui la divergenza tra i campioni considerati non è presumibilmente influenzata da un processo di saturazione.

Analisi filogenetica

Le relazioni filogenetiche tra i diversi aplotipi in *P.apollo* sono state esplorate attraverso il metodo Neighbor-Joining (NJ; Fig. 5), infatti, data la bassa diversità genetica trovata nel campione, questo metodo basato sulla distanza risulta più robusto di altri nella definizione della topologia dell'albero. Sequenze omologhe di *P.mnemosyne*, *P.nordmanni* e *P.ariadne* prese in letteratura (Gratton et al., subm.) sono stati utilizzate come outgroups. Il modello evolutivo che meglio si adatta ai campioni in base al "Hierarchical

likelihood ratio test”, è Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) con distribuzione gamma e siti invariati (TrN+ Γ +I; $\alpha=0.75$; proporzione dei siti invariati=0.68). Questo modello evolutivo ed i relativi parametri sono stati utilizzati nella ricostruzioni filogenetica, la robustezza dei nodi è stata valutata con 1000 repliche di bootstrapping dei dati.

In figura 5 è rappresentato l’albero filogenetico e si può osservare che tra le popolazioni di *P.apollo* è possibile distinguere diversi clusters che occupano aree geografiche più o meno localizzate (confronta Fig. 5 con Fig. 6). In particolare è possibile distinguere un gruppo chiamato I (valore di bootstrap=95, statisticamente significativo), che comprende tre sottogruppi (statisticamente non significativi): il cluster T costituito da popolazioni distribuite in Anatolia; il cluster G con popolazioni della Grecia continentale, Bulgaria e Bosnia-Erzegovina, ed infine il gruppo E, che non è un gruppo monofiletico ed include sequenze appartenenti a popolazioni dell’Europa centro-settentrionale. Gruppi monofiletici che mostrano valori di bootstrap significativi sono anche il cluster Sp (bootstrap=94) che include le popolazioni della Spagna centrale e meridionale, il gruppo C (bootstrap=82) (ad esclusione dell’aplotipo H₇₁ e H₅₅) comprendente le popolazioni del Caucaso, ed infine il gruppo delle popolazioni Pirenaiche (Pi; bootstrap=90) e della Sicilia (S; bootstrap=90). I rimanenti gruppi, che non presentano valori di bootstrap significativi sono: il cluster delle popolazioni dell’Appennino centrale (Ap), il gruppo che include tutte le popolazioni distribuite sulle Alpi, gli Appennini e sul Massiccio centrale francese (AA), la popolazione del monte Erimanthos in Peloponneso (Pi) e il gruppo comprendente popolazioni dell’Asia centrale ed Urali (K). Infine il cluster con le due specie *P.phoebus* e *P.bremeri* è statisticamente supportato (bootstrap=100) e si lega alle popolazioni di *P.apollo* con un valore di bootstrap pari ad 83.

Analisi filogeografica

Minimum spanning network

Le relazioni genealogiche tra i 71 aplotipi identificati in *P.apollo* sono state ricostruite attraverso un minimum spanning network (Fig. 5) con il programma TCS 1.18 (Clement et al., 2000), considerando solo le connessioni che si presentano con un valore superiore al 98%.

Il network mette in evidenza due raggruppamenti principali (Fig. 5). Un primo gruppo, o aplogruppo I, costituito dagli aplotipi del cluster I dell'albero filogenetico include 25 aplotipi ed è articolato in vari sottogruppi con distribuzione geografica ben localizzata (Fig. 6). L'altro aplogruppo con 46 aplotipi è ad undici steps mutazionali dall'aplogruppo I e può essere suddiviso in diversi sottogruppi che coincidono con i clusters osservati nell'analisi filogenetica (Caucaso, Sicilia, Peloponneso, Pirenei, Asia centrale, Appennino centrale, Alpi-Appennini).

Nested Clade Phylogeographic Analysis

Per comprendere i processi storici che sono alla base dell'attuale distribuzione della variabilità genetica in *P.apollo* è stata applicata la Nested Clade Phylogeographic Analysis (NCPA), ed il campione è stato suddiviso in due gruppi: il gruppo I, osservato sia nell'analisi filogenetica che nel network, ed il gruppo II che racchiude tutti gli altri campioni.

L'"inference key" di Templeton (2004) è stata applicata solo nel caso in cui la NCPA ha restituito valori significativi di D_c , D_n o I-T ($P < 0.05$).

All'interno del gruppo I sono stati ottenuti valori significativi solo per il clade di terzo livello 3.3 (Fig. 7), che riunisce tutte le popolazioni della Turchia anatolica ad eccezione della popolazione distribuita nei dintorni di Konya (KON). La NCPA suggerisce che l'attuale distribuzione della variabilità genetica in questo clade è dovuta ad un flusso genico ristretto con isolamento per distanza.

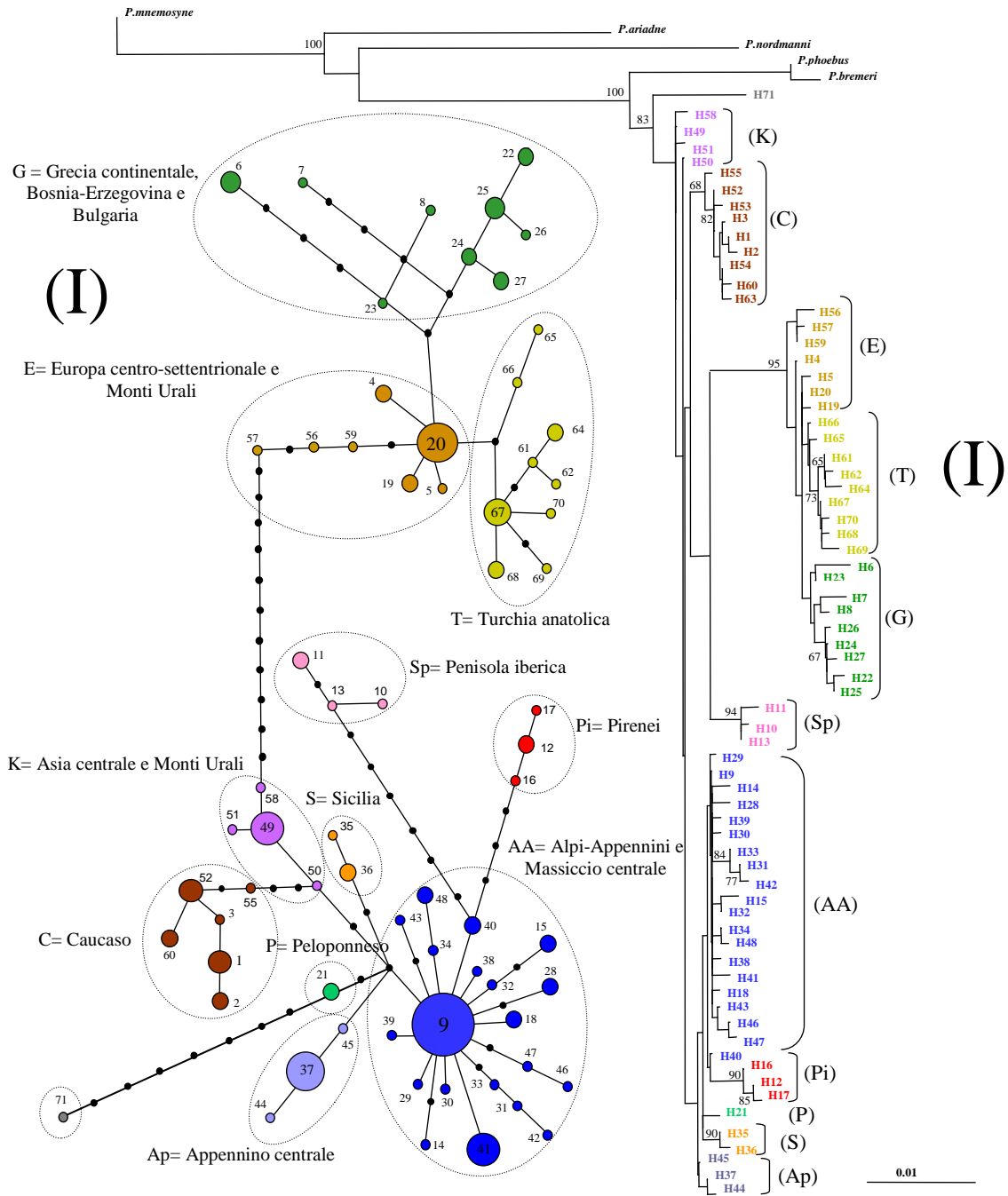


Figura 5. A sinistra: Minimum spanning network con indicati gli aplotipi e dimensioni proporzionali al numero di sequenze. A destra: albero NJ degli aplotipi osservati, con valori di bootstrap > 60%.

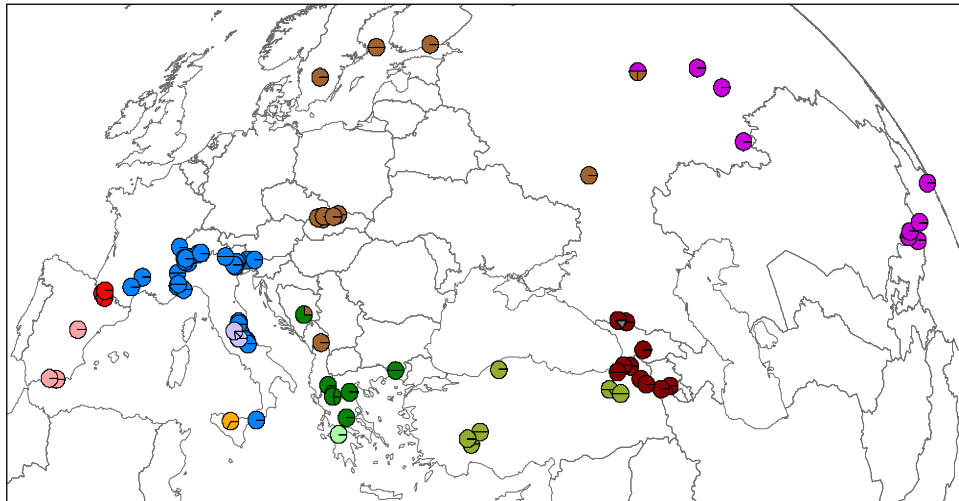
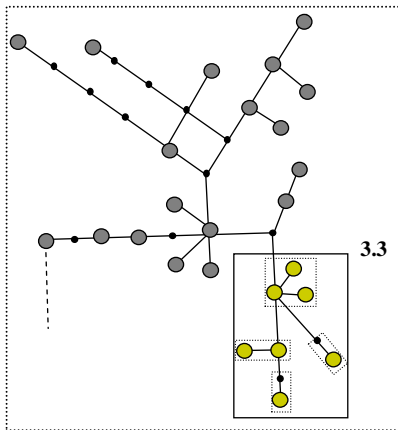


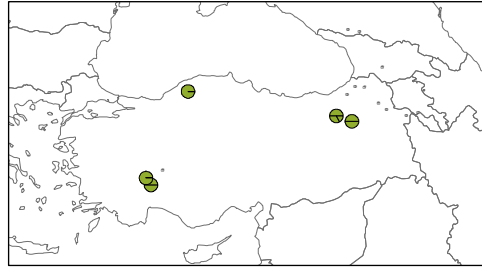
Figura 6. Distribuzione dei vari gruppi.

Valori significativi all'interno del gruppo II sono stati ottenuti per i cladi 2.4 e 3.5. Il clade 2.4 comprende tutte le popolazioni distribuite sull'arco alpino (ad eccezione della Valle D'Aosta), le popolazioni appenniniche, la popolazione dell'Aspromonte in Calabria e del Massiccio centrale francese. La distribuzione della variabilità genetica in questo clade sembra essere il risultato di un flusso genico ristretto con estinzione di popolazioni intermedie. Il clade 3.5 include i cladi di secondo livello 2.5 e 2.6. Nel clade 2.5 è presente la popolazione del Peloponneso (P), le popolazioni dell'Appennino centrale (Ap) e della Sicilia (S); nel 2.6 sono invece incluse le popolazioni dell'Asia centrale e dei monti Urali. La NCPA suggerisce in questo caso una frammentazione allopatrica.

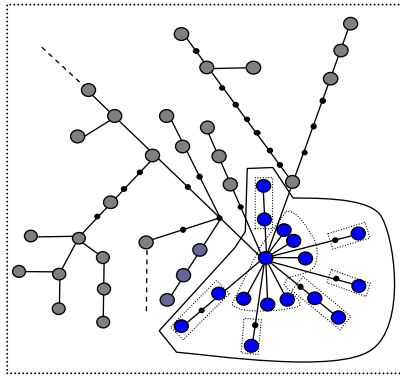
GRUPPO (I)



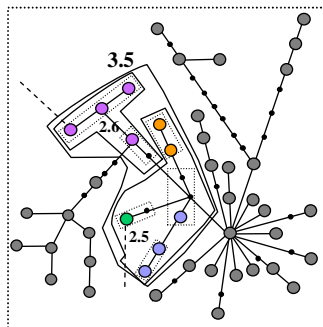
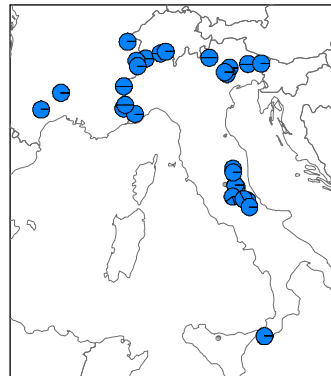
Clade 3.3: 1-2-3-4 No
Flusso genico ristretto con isolamento per distanza.



GRUPPO (II)



Clade 2.4: 1-2-3-4 No
Flusso genico ristretto con estinzione di popolazioni intermedie.



Clade 3.5: 1-19 No
Frammentazione allopatrica.

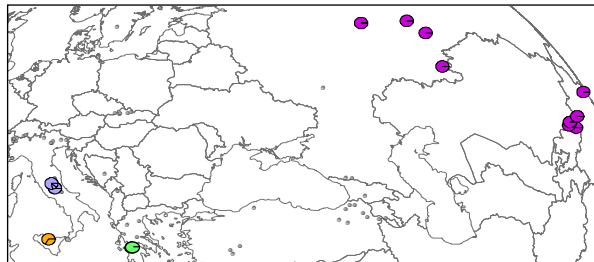


Figura 7. Cladi significativi nella NCPA e loro distribuzione. Per ogni clade sono indicati gli steps dell'“inference key” ed l'evento biogeografico suggerito.

Analisi spaziale della varianza molecolare

Per distinguere all'interno del campione di *P.apollo* gruppi di popolazioni che sono geograficamente omogenee e ben differenziate geneticamente da altre è stata utilizzata l'analisi multivariata della varianza molecolare o SAMOVA. È stato calcolato l' F_{CT} per valori crescenti di K (numero di gruppi) fino ad un massimo di 14 (Fig. 8).

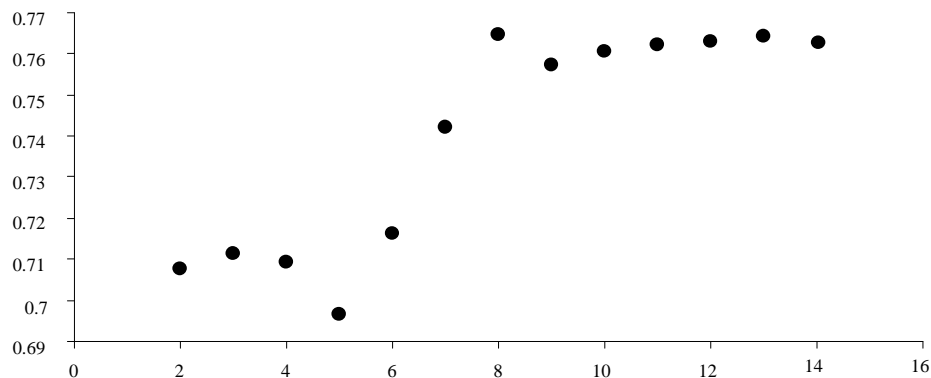


Figura 8. Valori di F_{CT} in funzione di un numero crescente di K gruppi.

Come si osserva dal grafico i valori di F_{CT} variano poco a causa delle minime differenze genetiche esistenti tra i gruppi, raggiungendo un valore massimo di 0.764 per $K=8$.

I gruppi individuati, mostrati in figura 9, sono: (1) tutte le popolazioni distribuite sulle Alpi, gli Appennini, il Massiccio centrale francese, la Sicilia, il Peloponneso, le popolazioni Pirenaiche e le popolazioni della Spagna centrale e meridionale; (2) la popolazione KIR del Caucaso; (3) le popolazioni della Bulgaria e Grecia continentale; (4) le popolazioni dell'Europa centro-orientale fino alle alture del Volga e la popolazione distribuita nei dintorni di Konya (KON) in Turchia; (5) le popolazioni del Caucaso; (6) le popolazioni della Turchia anatolica ad esclusione della popolazione KON (Konya); (7) le popolazioni dell'Asia centrale e dei monti Urali ed infine (8) la popolazione della Bosnia-Erzegovina.

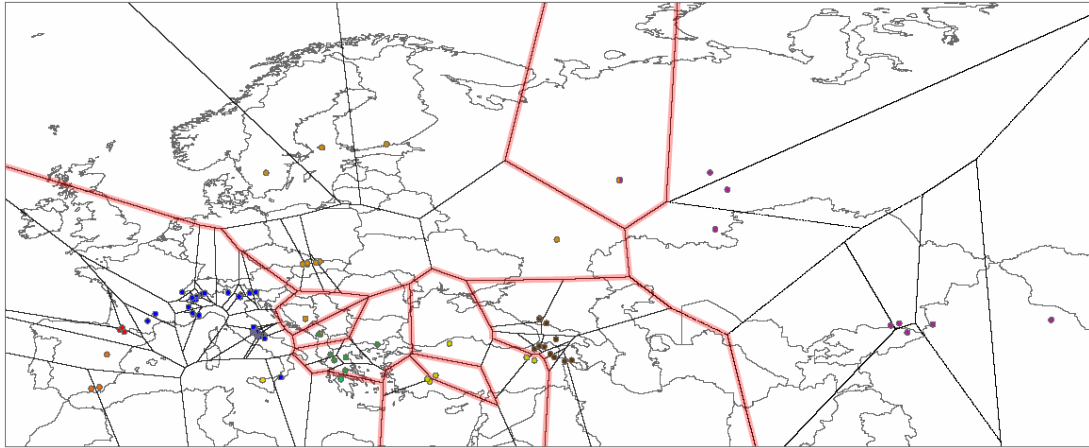


Figura 9. Gruppi di popolazioni individuati dalla SAMOVA, in rosso i gap rilevati tra un gruppo e l'altro, identificati come possibili barriere al flusso genico.

Equilibrio demografico e stima dei tempi evolutivi

Le statistiche D di Tajima (1989) e F_s di Fu (1997) sono state utilizzate per valutare l'equilibrio demografico per diversi insiemi di popolazioni (Tab. 4). I raggruppamenti sono stati scelti su base geografica e tenendo conto dei risultati ottenuti dalle precedenti analisi.

I gruppi che hanno mostrato entrambi i valori D ed F_s negativi e statisticamente significativi sono evidenziati in grigio in tabella 4 e sono quattro: il gruppo I, che comprende Anatolia, Grecia continentale, Carpazi, penisola scandinava, alture del Volga e monti Urali; un raggruppamento suggerito dalla SAMOVA, che è l'unione dei gruppi Sp+Pi+AA+Ap+P+S; un gruppo composto da tutte le popolazioni alpine e del Massiccio centrale; il clade 2.4, significativo nella NCPA, che comprende le popolazioni del Massiccio centrale francese, le Alpi (senza la Valle D'Aosta), gli Appennini (senza il gruppo Ap) e la Calabria; il gruppo AA dell'analisi filogenetica che coincide con il clade 2.4 ma considerando anche le popolazioni della Valle D'Aosta.

Per comprendere i processi demografici storici che hanno interessato questi gruppi, la loro *mismatch distribution* è stata confrontata con un modello di rapida espansione demografica (Fig. 10).

Gruppo	N. aplotipi	F_s	P	D	P
(I)	25	-12,9	0,00	-1,32	0,00
Clade 3.3 (gruppo I)	7	-2,41	0,00	-0,98	0,30
Clade 3.5 (gruppo II)	9	-0,63	0,70	-0,029	0,30
Clade 2.4 (gruppo II)	17	-10,8	0,00	-1,91	0,00
Anatolia	9	-3,83	0,00	-1,20	0,20
(C)	7	-1,56	0,40	-1,18	0,00
(G)	9	-1,32	0,00	-0,19	0,40
(G) no Bulgaria e Bosnia	6	-1,65	0,10	-0,78	0,60
(E)	7	-2,42	0,00	-1,03	0,10
Carpazi + penisola scandinava	2	0,13	0,40	-0,39	0,30
(Sp) + (Pi)	6	1,01	0,50	1,64	1,00
Alpi + Massiccio Centrale francese	11	-6,36	0,00	-1,79	0,00
(AA)	20	-14,08	0,00	-2,01	0,00
Appennini	12	-2,24	0,30	-0,90	0,00
Sequenze appenniniche in (AA)	10	-1,51	0,30	-0,10	0,30
(Sp) + (Pi) + (AA) +(Ap) + (P) +(S)	32	-18,15	0,00	-1,86	0,00

Tabella 4. Stime di D (Tajima, 1989) e F_s (Fu, 1997) e di P per entrambi i valori.

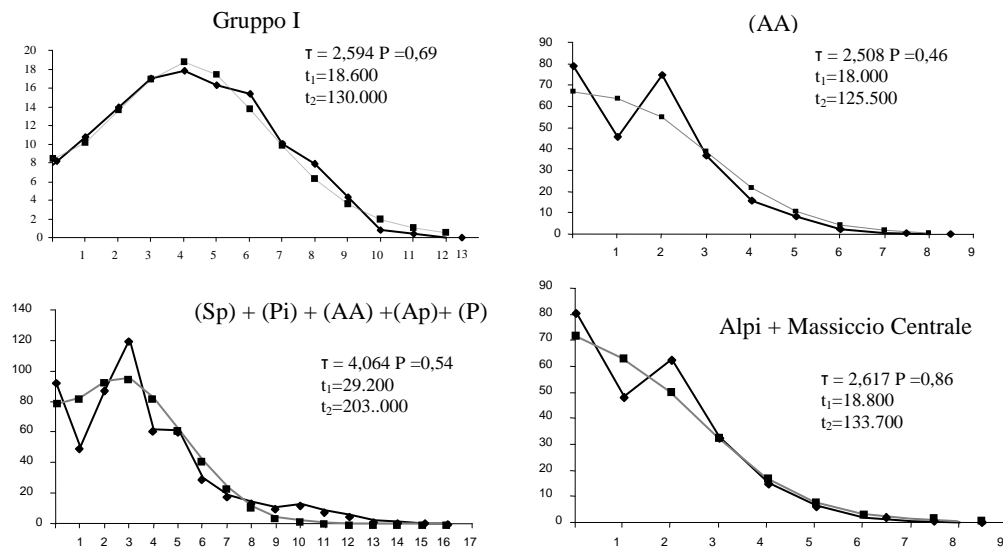


Figura 10. Mismatch distribution: valori di τ , P e due stime del tempo di espansione (t_1 e t_2). In grigio i valori attesi ed in nero gli osservati.

Il *goodness of fit test* non ha mostrato significative deviazione tra i risultati attesi e quelli osservati, per cui il parametro $\tau=2\mu t$ è stato utilizzato per stimare il tempo t dell'espansione demografica. Il tempo t (Tab. 5) è stato calcolato utilizzando il tasso di mutazione $\mu_1 = 0.08/\text{Ma}$ di Gratton et al. (subm.) e il tasso di sostituzione $\mu_2 = 0.023/\text{Ma}$ di Brower (1994) (vedi Materiali e Metodi).

Gruppo	t_1	t_2
(I)	18.600	130.000
(AA)	18.000	125.500
Alpi + Massiccio Centrale	18.800	133.700
(Sp) + (Pi) + (AA) +(Ap)+ (P)	29.200	203.000

Tabella 5. Stima dei tempi t_1 e t_2 in base ad un modello di rapida espansione demografica calcolati rispettivamente per μ_1 e μ_2 .

Il gruppo Alpi- Appennini

Per comprendere meglio i processi storici che hanno coinvolto le popolazioni alpine e appenniniche di *P.apollo*, considerando anche l'elevato numero di campioni disponibili per quest'area geografica, è stato calcolato il tempo di coalescenza (tMRCA) con il programma BEAST 1.4.5 (Drummond e Rambaut, 2007). In quest'analisi è stato utilizzato solo il tasso di mutazione di Gratton et al. (subm.), in quanto il tasso di sostituzione di Brower (1994) sembra sovrastimare i tempi evolutivi, restituendo datazioni non compatibili con l'ecologia della specie (vedi Discussione).

Nell'aplogruppo AA (Fig. 11), solo l'aplotipo H₉ è ampiamente diffuso dalle Alpi agli Appennini, mentre diversi aplotipi poco differenziati sono distribuiti un po' ovunque in questa area geografica. La distribuzione della variabilità genetica in questo aplogruppo suggerisce che la linea mitocondriale H₉ dalle Alpi si è espansa verso l'Appennino. Per ottenere una finestra temporale di tale processo è stato considerato come limite superiore (più antico) il tempo di coalescenza di tutto il gruppo di sequenze dell'aplogruppo AA (Alpi ed Appennini) e come limite inferiore (più recente) il tempo di coalescenza delle

sequenze appenniniche, vincolate a formare un gruppo monofiletico (Fig 11, in basso a sinistra). Infatti se la colonizzazione fosse avvenuta come un singolo evento e/o avesse coinvolto pochi individui, tutte le sequenze mitocondriali degli Appennini dovrebbero discendere da una singola sequenza progenitrice formando un sottoclade monofiletico. L'analisi così vincolata suggerisce un ampio intervallo temporale compreso tra 19.000 e 29.000 anni fa (Fig.11).

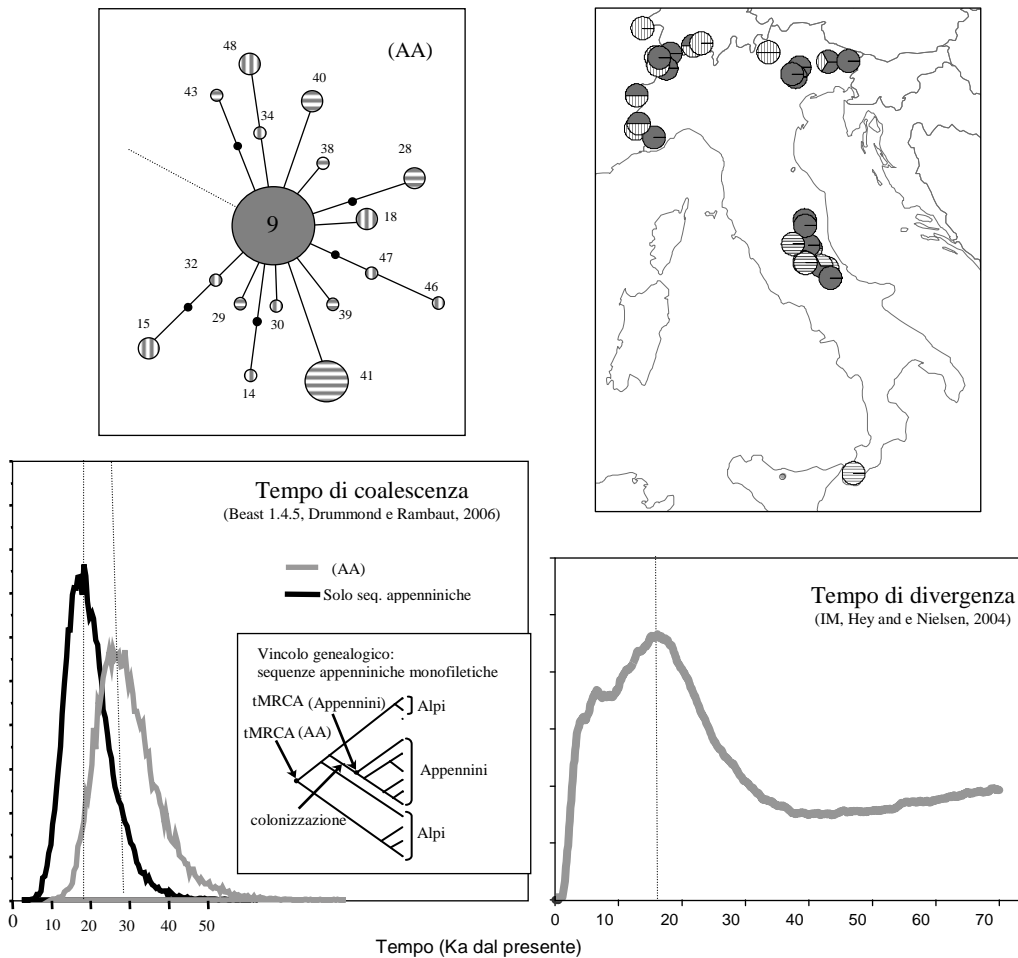


Figura 11. In alto l'aplogruppo (AA) e la sua distribuzione. In basso a sinistra: curva della probabilità a posteriori per la stima del tempo di coalescenza e albero filogenetico in cui sono indicati i gruppi alpino-appenninici. In basso a destra: curva della probabilità a posteriori per la stima del tempo di divergenza tra le popolazioni alpine e appenniniche. Sulle ordinate la P-density.

Inoltre sugli stessi dati è stato applicato il modello di Isolamento con Migrazione (IM; Nielsen e Wakeley, 2001). L'ipotesi alla base di questo modello è che le popolazioni alpine ed appenniniche formavano originariamente una popolazione panmittica e solo successivamente per un evento di divergenza improvvisa hanno dato origine a due popolazioni distinte geneticamente, una sulle Alpi e una sugli Appennini. La curva in figura 11 indica che con massima probabilità la divergenza tra le popolazioni alpine ed appenniniche è avvenuta circa 14.900 anni fa (Fig. 11, in basso a destra).

Discussione

Analisi filogenetica

L'analisi di un frammento di 869 bp del gene mitocondriale COI in 201 individui provenienti da 80 popolazioni di *P.apollo* distribuite in gran parte del suo areale, ha rilevato nel complesso una diversità genetica relativamente bassa tra popolazioni anche distanti. Questa differenza emerge in particolare dal confronto con *P. mnemosyne* che presenta un areale largamente sovrapponibile a quello di *apollo*.

La ricostruzione delle relazioni filogenetiche attraverso il metodo del Neighbor-Joining (NJ; Fig. 5) delle sequenze di *P.apollo*, conferma l'affinità genetica di *P.apollo* con *P.phoebus* e *P.bremeri*, come già rilevato da Omoto et al. (2004).

All'interno di *P.apollo* è possibile distinguere un gruppo I ben definito, distribuito in Europa centro-settentrionale, Grecia continentale e Turchia anatolica (Fig. 12), e diversi clusters, ognuno confinato in un'area geografica: (penisola iberica, Pirenei, Sicilia, Alpi-Appennini, Appennino centrale, Peloponneso, Caucaso, Asia centrale) probabile risultato della passata frammentazione dell'areale. Nel gruppo I si possono riconoscere due sottogruppi (T= Turchia anatolica e G= Grecia continentale, Bosnia-Erzegovina e Bulgaria), mentre non risultano chiare le relazioni filogenetiche all'interno del gruppo E (= Europa centro-settentrionale e Monti Urali), in cui è presente un unico aplotipo H₂₀ ampiamente distribuito dalla penisola scandinava ai Balcani e una serie di aplotipi unici distribuiti un po' ovunque.

Ben supportati dall'analisi filogenetica sono i clusters della penisola iberica (Sp), dei Pirenei (Pi), della Sicilia (S) e del Caucaso (C). Non sono invece ben risolte le relazioni filogenetiche tra i vari clusters e per il gruppo dell'Appennino centrale (Ap), delle Alpi-Appennini (AA), del Peloponneso (P) e dell'Asia centrale (K).

Per gli aplotipi appenninici è interessante notare la mancanza di un unico gruppo monofiletico. Infatti al cluster Ap appartengono tre aplotipi, distribuiti unicamente sul monte Terminillo, Ovindoli e monte Magnola

($H_d=0.750\pm 0.112$), e al cluster AA sette aplotipi distribuiti sulla Maiella, sul monte Magnola, Campo Imperatore e sui monti Sibillini (monte Rotondo, monte Palazzo Borghese, monte Corvo). La posizione basale del gruppo Ap suggerisce che probabilmente l'aplotipo H₉, ampiamente diffuso sulle Alpi e sul Massiccio Centrale, solo successivamente si è esteso sugli Appennini e differenziato in nuove linee mitocondriali.

Le popolazioni dell'Asia centrale (K) insieme all'aplotipo H₇₁, distribuito in Caucaso, pur non costituendo un gruppo monofiletico, sono basali all'intero campione di *P.apollo*. Tale risultato andrebbe a confermare l'ipotesi di Nazari et al. (2007), secondo cui il genere *Parnassius* si sarebbe differenziato in Asia centrale e solo successivamente avrebbe colonizzato l'Europa.

Infine da notare la popolazione KIR ($H_d=0.833\pm 0.222$) dei monti Urali, affine geneticamente sia alle popolazioni più orientali (K) con l'aplotipo H₄₉ sia a quelle dell'Europa centro-orientale (E) nel gruppo I con gli aplotipi H₅₆ e H₅₇.

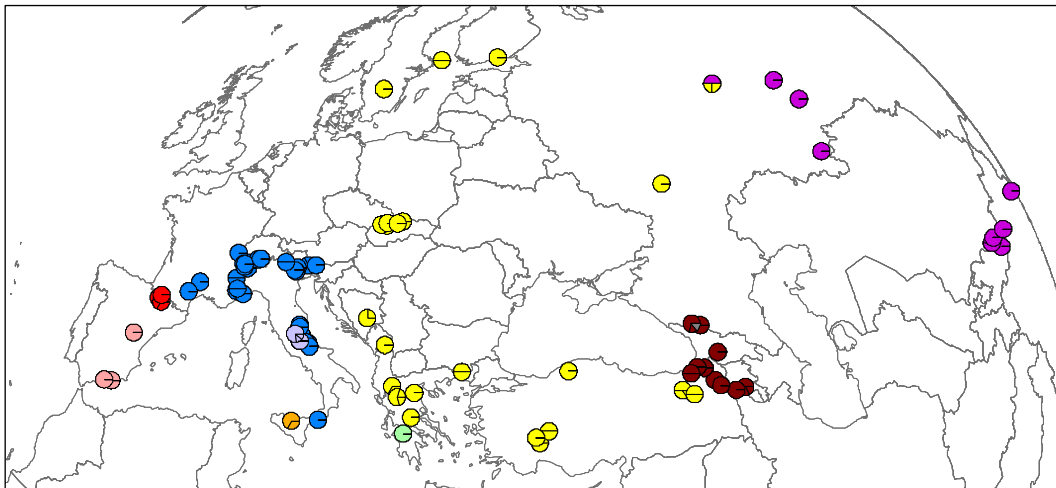


Figura 12. Distribuzione del gruppo (I) in giallo e dei diversi clusters individuati dall'analisi filogenetica.

Analisi filogeografica

Il minimum spanning network in figura 5, conferma i raggruppamenti osservati nell'analisi filogenetica.

Il gruppo I risulta ben differenziato rispetto agli altri aplogruppi. Le popolazioni dell'Europa centro-settentrionale (sottogruppo E) formano una stella con l'aplotipo H₂₀, ampiamente diffuso dalla penisola Scandinava ai Balcani, al centro e con una corona di aplotipi non molto differenziati distribuiti un po' ovunque. Probabilmente la linea mitocondriale H₂₀ fu in grado di espandersi in quest'area geografica dopo lo scioglimento della calotta glaciale scandinava, dando origine solo recentemente ad altre linee mitocondriali. Queste popolazioni, che nell'analisi filogenetica non costituiscono un gruppo monofiletico, nel network formano un gruppo ben strutturato. Più differenziate all'interno di questo gruppo sono la popolazione KIR (H₅₆, H₅₇) dei monti Urali e la popolazione delle alture del Volga (H₅₉). Il sottogruppo della Grecia continentale non è molto omogeneo ed al suo interno le popolazioni della Bulgaria (H₇, H₈) e della Bosnia-Erzegovina (H₆) risultano più differenziate rispetto alle popolazioni più vicine geograficamente. Il sottogruppo dell'Anatolia è ben articolato con un aplotipo H₆₇ ampiamente diffuso nella regione ed una serie di aplotipi unici distribuiti un po' ovunque. La popolazione KON, dei dintorni di Konya, è quella che risulta più differenziata all'interno del gruppo. Questo sottogruppo, ad esclusione di quest'ultima popolazione, ha restituito valori significativi per la NCPA e l'attuale distribuzione della variabilità genetica sembrerebbe essere il risultato di un flusso genico ristretto con isolamento per distanza.

Oltre al gruppo I ci sono diversi aplogruppi tra loro ben distinti, tra questi il più complesso è l'aplogruppo distribuito nelle Alpi e negli Appennini (AA). La struttura a stella dell'aplogruppo AA tende a confermare l'ipotesi già suggerita dall'analisi filogenetica di un'espansione della linea mitocondriale H₉, al centro della stella, verso gli Appennini, dove persisteva un gruppo di aplotipi

dell'Appennino centrale (Ap). L'aplogruppo dell'Appennino centrale (Ap) e la linea mitocondriale H₉ sono probabilmente due dei superstiti di un'unica e vasta frammentazione che ha dato origine anche a tutti gli altri aplogruppi (Caucaso, Peloponneso, Sicilia, Pirenei ed Asia centrale). Per l'aplogruppo del Caucaso, del Peloponneso e della Sicilia tale ipotesi è anche confermata dal risultato della NCPA. L'attuale distribuzione della variabilità genetica all'interno dell'aplogruppo AA potrebbe essere invece spiegata, secondo la NCPA, da un flusso genico ristretto con estinzione di popolazioni intermedie. Tale risultato suggerisce che *P.apollo* in periodi climatici favorevoli era ampiamente distribuito in Italia, e successivamente con il cambiamento di tali condizioni il suo areale avrebbe subito una contrazione e una frammentazione, limitando *P.apollo* ad aree circoscritte. La recente estinzione di alcune popolazioni di *P.apollo* dell'Appennino centrale (monti Simbruini, Lazio) e meridionale (Sila, Calabria) riflettono questa tendenza.

Nel campione di *P.apollo* considerato in questo studio, la SAMOVA ha identificato otto gruppi di popolazioni geograficamente omogenee e ben differenziate geneticamente tra loro. Quest'analisi ha confermato alcuni raggruppamenti individuati dalle precedenti analisi (Fig. 9; Caucaso, Anatolia, Asia centrale, Europa centro- settentrionale, Grecia continentale) ed ha isolato in gruppi distinti le due popolazioni, KIR dei monti Urali e BJE della Bosnia-Erzegovina, che presentavano caratteristiche intermedie tra gruppi adiacenti. Inoltre ha riunito in un unico grande gruppo tutte le popolazioni della penisola iberica, Pirenei, Peloponneso, Sicilia, Alpi-Appennini e Appennino centrale, identificando una barriera tra l'Europa occidentale ed orientale e tra la Grecia continentale ed il Peloponneso.

Periodi di espansione in P.apollo

Entrambe le statistiche D di Tajima (1989) e l' F_s di Fu (1997), hanno evidenziato significative tracce di espansione demografica (Tab. 4) nel gruppo I,

nell'aplogruppo AA, nel gruppo che riunisce le popolazioni alpine e del Massiccio centrale ed infine nel gruppo individuato dalla SAMOVA con tutte le popolazioni dell'Europa occidentale ed il Peloponneso (Fig. 9). In base al modello di rapida espansione demografica è stato calcolato il tempo in cui è avvenuta l'espansione per ciascun gruppo di popolazioni, considerando il tasso di mutazione $\mu_1=0.08/\text{Ma}$ (Gratton et al., subm.) e il tasso di sostituzione $\mu_2=0.023/\text{Ma}$ (Brower, 1994).

Appare di particolare interesse confrontare e discutere i tempi evolutivi risultanti dall'applicazione dei due tassi di mutazione. I risultati (Tab. 5) evidenziano che l'espansione del gruppo I, del gruppo AA e del gruppo delle popolazioni alpine e del Massiccio centrale è avvenuta intorno ai 18.000 anni fa considerando μ_1 , ed intorno ai 130.000 anni per μ_2 .

La prima stima corrisponde a l'ultimo Massimo Glaciale (22.000-14.000 anni fa), durante il Würm (Fig. 13). In questo periodo la maggior parte delle

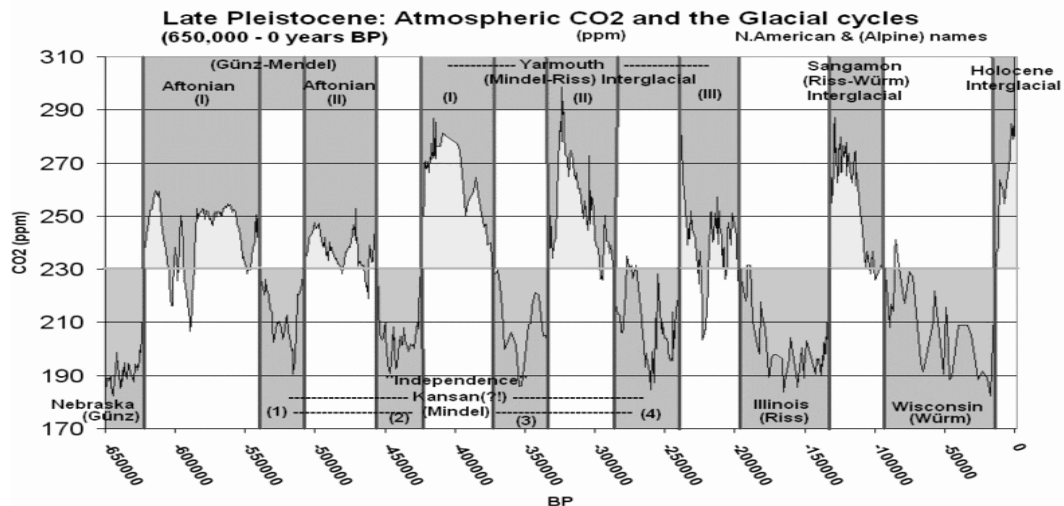


Figura 13. Cicli glaciali e interglaciali rappresentati mediante la misurazione della presenza di CO₂ atmosferico, rilevato in campioni di ghiaccio.

montagne europee erano ricoperte da ghiacciai e la calotta glaciale ricopriva le Alpi, i Pirenei e la penisola scandinava (Fig.14). L'Europa centrale era ricoperta da una steppa-tundra ed il permafrost si estendeva in gran parte dell'Europa fin

quasi alla latitudine della Francia centrale. In Europa meridionale le condizioni climatiche leggermente più calde portavano ad un'aridità e questa area geografica era per lo più ricoperta da steppe semi-desertiche. Solo in alcune aree molto localizzate erano presenti zone boschive.

La seconda datazione, circa 130.000 anni fa, corrisponde ad un interglaciale (Fig.13) ed è una fase in cui il clima in Europa era più caldo. Le foreste si

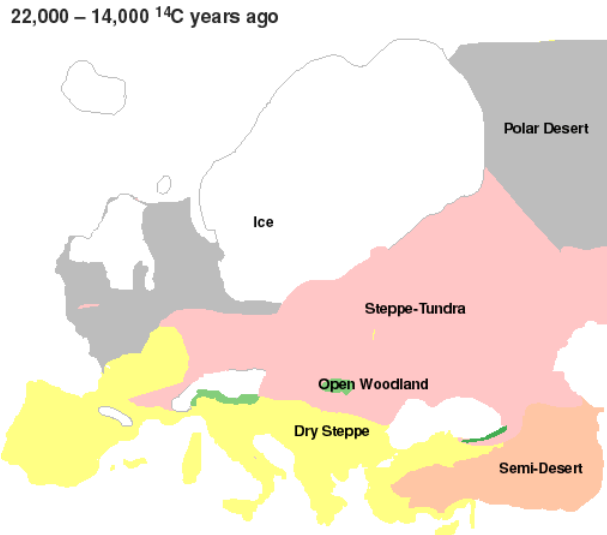


Figura 14. Distribuzione della vegetazione in Europa durante l'ultimo massimo glaciale. Boschi in verde, steppe semi-deserte in giallo, steppa-tundra in rosa ed in bianco i ghiacciai (<http://www.esd.ornl.gov/projects/gen/nercEUROPE.html>).

espandevano più a nord rispetto ad ora, la penisola scandinava era un'isola circondata dal mar Baltico e nella regione Mediterranea erano presenti foreste decidue.

Per il gruppo che comprende tutta l'Europa occidentale e il Peloponneso sono state invece ottenute datazioni di circa 29.000 (con μ_1) e 203.000 anni (con μ_2) fa. La prima datazione (29.000 anni fa) cade nell'ultimo glaciale Würm. In base a reperti pollinici (Guiot et al. 1989), in Francia centrale erano presenti zone boschive localizzate e la vegetazione era per lo più di tipo steppico. Le stesse condizioni climatiche fredde e di semi aridità erano presenti nella maggior parte

dell'Europa settentrionale e centrale ed in Europa meridionale il paesaggio era costituito da foreste steppiche con limitate zone boschive.

La seconda datazione (203.000 anni fa) corrisponde anche in questo caso ad un interglaciale in cui le condizioni climatiche erano più calde e le foreste più ampiamente diffuse.

In generale si osserva che con il tasso di mutazione di Gratton et al. (subm.) si ottengono dei tempi che coincidono sempre con un periodo glaciale, mentre con il tasso di sostituzione di Brower (1994) tempi che corrispondono ad un interglaciale. Le datazioni ottenute con il tasso di mutazione $\mu_1=0.08/\text{Ma}$ sembrano essere più coerenti con le caratteristiche ecologiche di *P.apollo*, mentre il tasso di sostituzione di Brower (1994) probabilmente tende a sovrastimare i tempi evolutivi, come osservato anche in altre occasioni per i tassi di sostituzione da Ho e Larson (2006).

P.apollo è una specie xerofila e la sua distribuzione dipende principalmente dalla presenza delle piante nutrici della larva, due specie associate ad ambienti steppici: *Sedum album* e *S.thelephium*. In base ai risultati ottenuti, i periodi interglaciali sembrano aver rappresentato per *P.apollo* delle fasi climaticamente favorevoli alla sua espansione, probabilmente perché in Europa predominava un ambiente steppico (Fig. 14) e la distribuzione della sua pianta nutrice era più ampia. Al contrario durante i periodi glaciali, in cui predominavano le foreste, *Sedum album* e *S.thelephium* avevano una distribuzione più ridotta, come un versante o una montagna, e di conseguenza anche *P.apollo*.

Pattern filogeografico e piante alimentari di P. apollo

La larva di *P.apollo*, come già precedentemente accennato, si nutre per lo più di due specie di *Sedum*: *S.thelephium* (e le sue sottospecie) distribuita dal centro Europa al Giappone e *S.album* distribuita in tutta Europa fino all'Asia occidentale e al nord Africa. Un recente studio di Nakonieczny e Kedziorski (2005) ha messo in evidenza che in base alla scelta della pianta nutrice è

possibile distinguere in *P.apollo* due diverse forme trofiche “telefiofaga” e “albofaga”. Le popolazioni “telefiofaghe” sono distribuite in Europa centrale e sono strettamente monofaghe; le “albofaghe”, distribuite in Europa occidentale e meridionale, sono da considerarsi oligofaghe, in quanto possono nutrirsi anche di *S.telephium*.

Se confrontiamo la distribuzione della forma “telefiofaga” (Fig. 20) con il pattern filogeografico di *P.apollo*, si osserva una certa concordanza con la distribuzione del gruppo delle popolazioni dell’Europa centro-settentrionale (E). Ciò potrebbe indicare che *P.apollo* e *S.telephium* durante l’ultimo glaciale hanno avuto gli stessi rifugi, ed in seguito, con lo scioglimento della calotta glaciale scandinava circa 10.000-11.000 anni fa, sono andati incontro ad un’espansione verso nord. Come osservato da Saarma et al. (2007) su popolazioni di *Ursus arctos* dell’Europa centro-orientale, i monti Carpazi possono aver rappresentato uno dei possibili rifugi per le popolazioni di *P.apollo* e *S.telephium* in Europa centro-settentrionale.

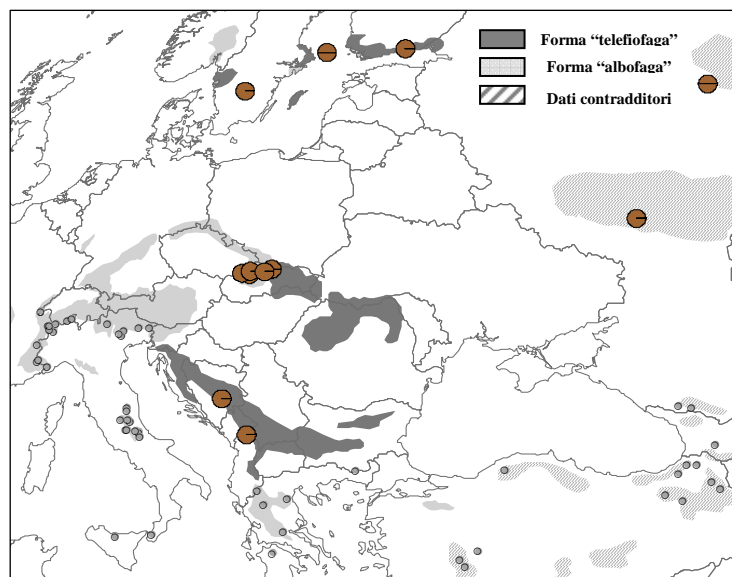


Figura 20. Distribuzione delle diverse forme trofiche (Nakonieczny e Kedziorski, 2005) e dell’apologruppo (E).

Il gruppo Alpi-Appennini

Ipotizzando un'espansione di *P.apollo* dalle Alpi verso gli Appennini (vedi Risultati) è stato calcolato il tMRCA (time to Most Recent Common Ancestor) per tutte le sequenze del gruppo AA (limite superiore) e per le sequenze appenniniche, considerate come gruppo monofiletico (limite inferiore), per ottenere una finestra temporale di tale processo demografico. Si ottiene un ampio intervallo (Fig. 11) compreso tra i 19.000 e 29.000 anni fa (glaciale Würm). Il ritrovamento di un'elevata quantità di pollini di *Artemisia*, una pianta steppica, in Italia centrale (Fig. 15; Allen et al. 2000; Magri et al. 1999), indica che in questa zona in questo periodo c'era una predominanza di ambienti aridi e vegetazione steppica.

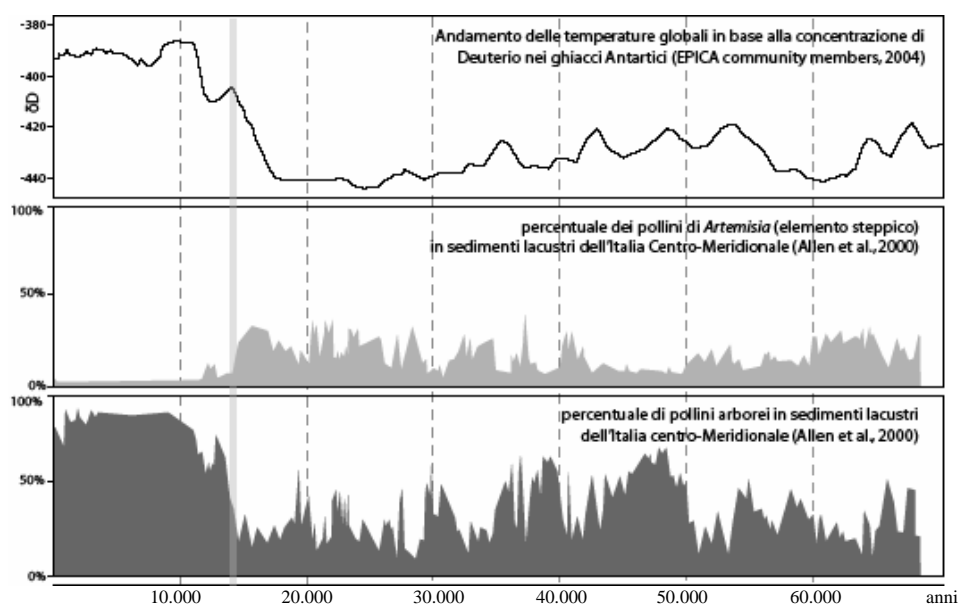


Figura 15. Confronto tra le temperature e la percentuale di pollini di *Artemisia* (pianta steppica) e di piante arboree per l'Italia centro-meridionale, durante il tardo pleistocene.

Ulteriori informazioni sono state ottenute in base al modello di Migrazione con Isolamento (IM). In base a questo modello le popolazioni alpine ed appenniniche formavano un'unica popolazione panmitica che successivamente è andata incontro a divergenza. La stima ottenuta dell'inizio della divergenza è

pari a 14.900 anni fa, ed indica che in questo periodo le popolazioni appenniniche ed alpine erano isolate sulle rispettive catene montuose. Quindi in accordo con i risultati precedenti, *P.apollo* in questo periodo doveva essere già presente in Italia centrale e meridionale.

Storia del popolamento appenninico in P.apollo e P.mnemosyne

Parnassius apollo e *P.mnemosyne*, rappresentano specie paradigmatiche di farfalle a costumi montani. Nonostante le due specie occupino un areale che, su larga scala geografica, è in gran parte sovrapposto (Fig. 16), esse differiscono per le richieste ecologiche. In particolare, le diverse esigenze ecologiche delle larve determinano la preferenza di *P.apollo* per microambienti xerofitici, dove i bruchi si nutrono di Crassulaceae del genere *Sedum* e *Sempervivum* (Nakonieczny et al., 2005). *P.mnemosyne* al contrario si rinviene in ambienti ecotonali di foresta mesofila, dove crescono le piante nutrici del genere *Corydalis* (Fumariaceae) (Konvicka e Kuras, 1999; Bergström, 2005).

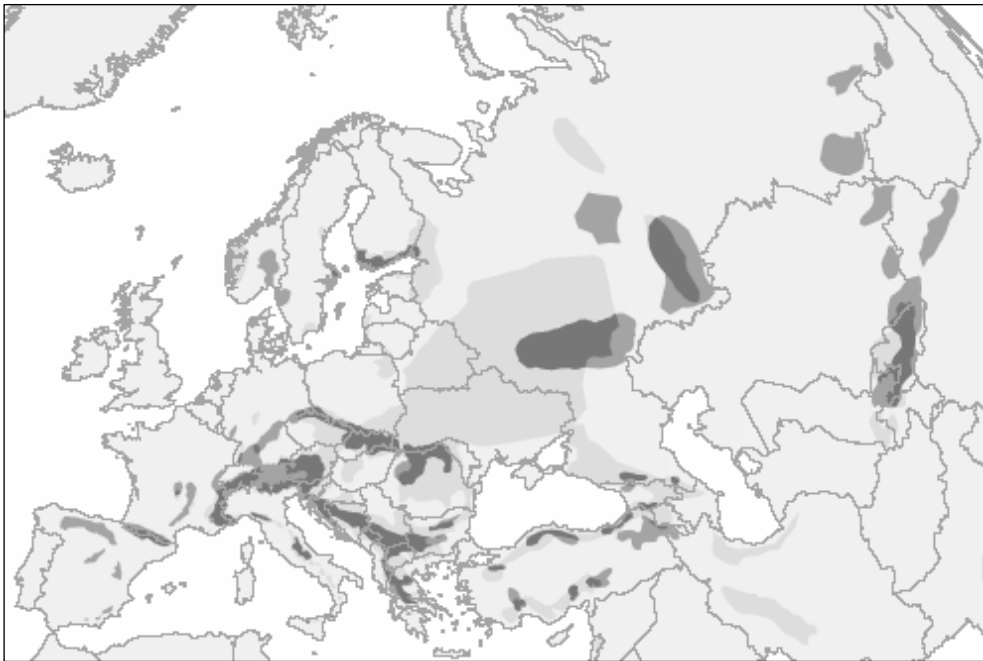


Figura16. Distribuzione di *P.apollo* in grigio e di *P.mnemosyne* in grigio chiaro.

Per cercare di comprendere come le due specie possano aver risposto ai cambiamenti climatici durante il Pleistocene, i parametri demografici ottenuti in questo studio per il *P.apollo* sono stati confrontati con quelli ottenuti da Gratton (2006) per il *P.mnemosyne*.

In Figura 17 sono riportate le mappe con le posizioni geografiche degli aplotipi identificati sia per *P.apollo* che per *P.mnemosyne* (Gratton, 2006), e gli schemi dei network rispettivamente per l'aplogruppo AA (Alpi-Appennini) di *P.apollo* e per l'aplogruppo Im di *P.mnemosyne*, costituito dalle popolazioni alpine ed appenniniche. Confrontando la struttura dei due network e la distribuzione geografica degli aplotipi (Fig. 17), si osserva che in entrambe le specie gli aplogruppi sono costituiti da un aplotipo ancestrale ampiamente distribuito dalle Alpi all'Appennino e una corona di aplotipi discendenti a distribuzione più localizzata. Possiamo però rilevare delle differenze: in *P.apollo* tutte le sequenze appartenenti ai campioni alpini fanno parte dell'aplogruppo AA mentre per quanto riguarda l'Appennino centrale soltanto una parte degli aplotipi trovati rientrano nell'aplogruppo AA, alcune popolazioni possiedono aplotipi appartenenti all'aplogruppo Ap, del tutto distinto rispetto ad AA (Fig.17). Mentre in *P.apollo* la distribuzione della variabilità genetica suggerisce un'espansione dalle Alpi verso gli Appennini in *P.mnemosyne* la situazione sembra essere più complessa. In *P.mnemosyne* infatti sulle Alpi si possono distinguere diverse linee mitocondriali. Le sequenze delle popolazioni del bacino dell'Adige costituiscono un aplogruppo separato, mentre nei campioni delle Alpi occidentali coesistono, accanto all'aplogruppo Im, una seconda linea esclusiva di quest'area e una terza diffusa anche sui Pirenei e sul Massiccio Centrale. Considerando che le popolazioni delle Alpi orientali, Veneto, Friuli, Austria e Slovenia presentano sequenze molto più divergenti rispetto al resto delle Alpi sono state escluse dalla presente analisi.

Applicando ad entrambi gli aplogruppi, AA (*P.apollo*) e Im (*P.mnemosyne*), il modello di rapida espansione demografica e utilizzando il tasso di mutazione pari a $\mu_1=0.08/\text{Ma}$ (Gratton et al., subm.), si ottiene circa 18.000 anni (Tab. 5)

per *P.apollo*, corrispondente all'ultimo massimo glaciale, e 7.700 anni per *P.mnemosyne* che corrisponde alla prima fase dell'Olocene.

Ipotizzando anche per *P.mnemosyne* una colonizzazione dalle Alpi verso gli Appennini, è stato calcolato il tempo di coalescenza per tutto il gruppo di sequenze nell'aplogruppo Im, per stabilire un limite temporale superiore, e il

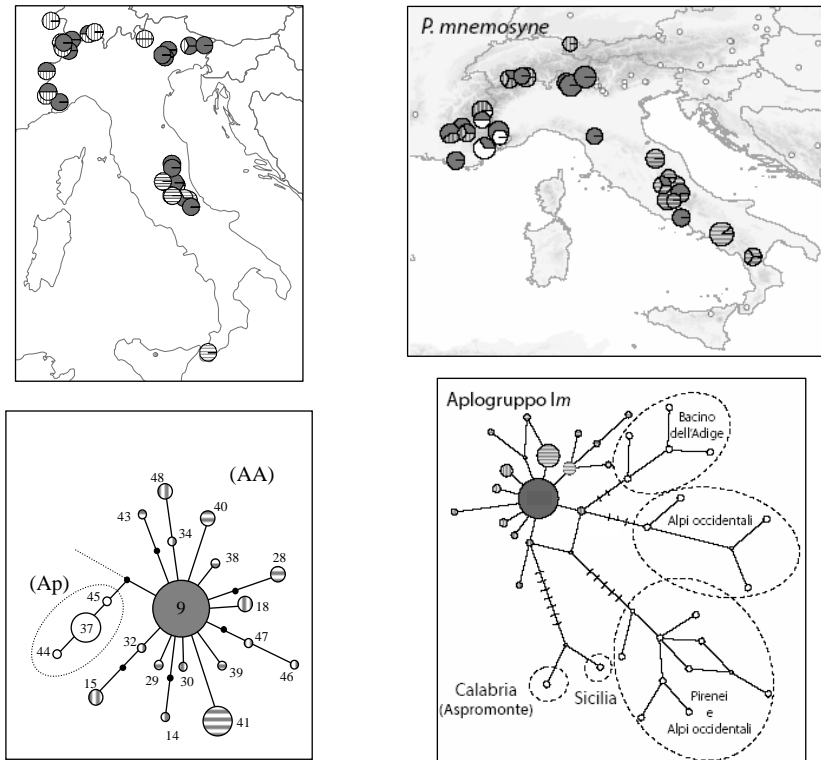


Figura 17. A destra distribuzione degli aplotipi in Italia e network per *P.mnemosyne*, a sinistra per *P.apollo*.

tempo di coalescenza considerando le sequenze appenniniche un gruppo monofiletico, per stabilire un limite temporale inferiore. Come nel modello di rapida espansione demografica si ottengono datazioni diverse per le due specie: per *P.apollo* si ottiene un periodo compreso tra i 19.000 e 29.000 anni fa (glaciale Würm) (Fig. 18); per *P.mnemosyne*, al contrario, l'intervallo temporale è di 13.000 - 20.000 anni fa (Fig. 18).

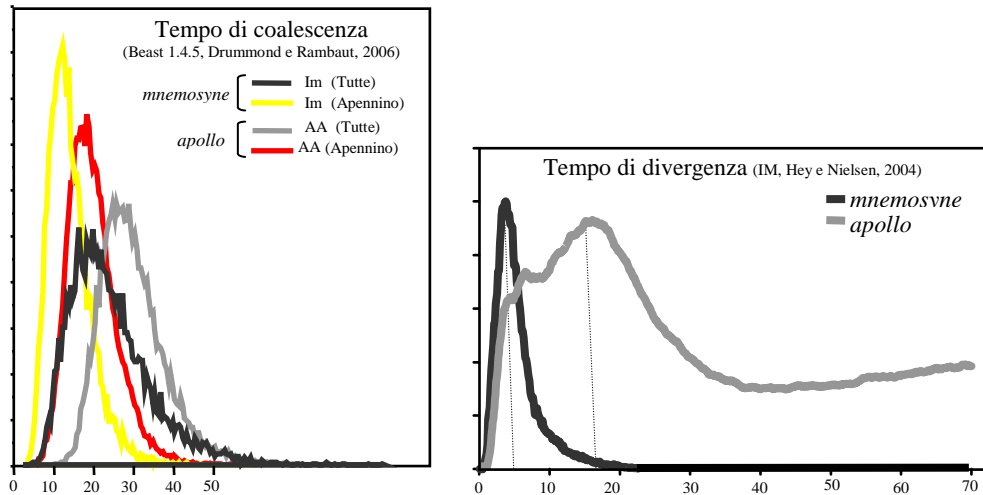


Figura 18. Curve di probabilità a posteriori per *P.apollo* e *P.mnemosyne*, a sinistra la stima del tempo di coalescenza e a destra la stima del tempo di divergenza. Sulle ascisse il tempo in kiloanni e sulle ordinate la P-density.

Quindi si può ipotizzare che l'espansione di *P.apollo* è avvenuta in un periodo compreso nell'ultimo glaciale Würm, mentre *P.mnemosyne* si è espansa in un periodo in cui le temperature erano vicino a quelle oloceniche e le foreste temperate iniziavano la loro espansione post-glaciale nella penisola italiana (Fig. 19 e 15). Infine sul campione di *P.mnemosyne* è stato applicato il modello di Isolamento con Migrazione: il risultato indica che la divergenza tra le popolazioni alpine ed appenniniche è avvenuta con massima probabilità durante l'Olocene (massimo a 3.716 anni fa), mentre per *P.apollo* si otteneva una datazione (14.700 anni fa) compresa nel tardo Pleistocene.

Valutazioni conservazionistiche

L'analisi di 869 bp del gene mitocondriale COI ha permesso di individuare almeno 10 differenti "Evolutionarily Significant Unit" (ESU) nel campione di *P.apollo* analizzato, che potrebbero essere considerate in futuri piani di gestione: Pirenei, Sicilia, Alpi-Appennini, Appennino centrale, Europa centro-

settentrionale, Grecia continentale, Peloponneso, Anatolia, Caucaso e Asia centrale.

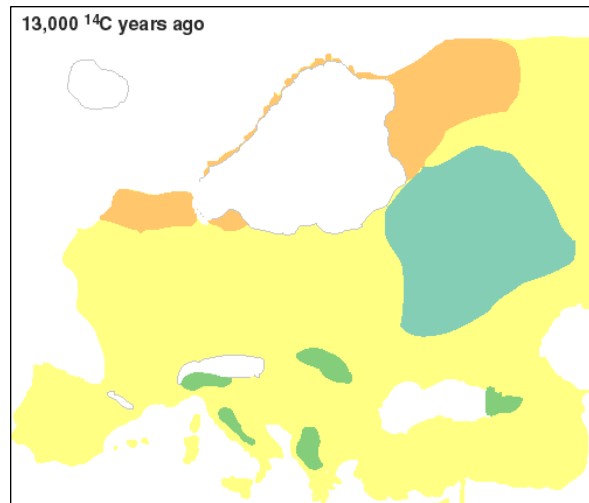


Figura 19. Distribuzione della vegetazione in Europa circa 13.000 anni fa. In giallo la steppa, in bianco i ghiacciai e in verde le foreste temperate (<http://www.esd.ornl.gov/projects/gen/nercEUROPE.html>)

Conclusione

L'analisi di un frammento di 869 bp del gene mitocondriale COI in 201 individui provenienti da 80 popolazioni di *P.apollo* distribuite in gran parte del suo areale, ha rilevato nel complesso una diversità genetica relativamente bassa tra popolazioni anche distanti. Questa differenza emerge in particolare dal confronto con *P. mnemosyne* che presenta un areale largamente sovrapponibile a quello di *apollo*.

L'analisi filogenetica ed il network hanno evidenziato la presenza di un gruppo, indicato come I, distribuito in Grecia continentale, Turchia anatolica ed Europa centro-settentrionale significativo statisticamente e ben strutturato. La distribuzione della variabilità genetica all'interno del gruppo suggerisce che *P.apollo* avrebbe subito una prima espansione verso l'Europa meridionale, in particolare Grecia continentale e Turchia anatolica, durante l'ultimo Massimo Glaciale circa 18.000 anni fa e successivamente con lo scioglimento della calotta glaciale scandinava, 10.000-11.000 anni fa, verso l'Europa settentrionale (penisola scandinava). Le altre popolazioni sono distribuite in diversi aplogruppi più o meno differenziati tra loro e non sempre significativi all'analisi filogenetica, ognuno confinato in un'area geografica più o meno isolata (penisola iberica, Pirenei, Sicilia, Alpi-Appennini, Appennino centrale, Peloponneso, Caucaso, Asia centrale), risultato di un'antica e vasta frammentazione. L'aplogruppo della penisola iberica e quello dei Pirenei sono i gruppi più differenziati e probabilmente rappresentano le linee mitocondriali più antiche.

In Italia, le popolazioni della Sicilia e dell'Appennino centrale presentano aplotipi peculiari. Un unico aplotipo è invece ampiamente distribuito sul Massiccio centrale francese, sulle Alpi, sugli Appennini fino alla Calabria, ed inoltre sulle Alpi e sugli Appennini sono presenti diversi aplotipi poco differenziati rispetto al precedente. La distribuzione della variabilità genetica in Italia suggerisce che *P.apollo* si sia espanso dalle Alpi verso gli Appennini fin in Calabria differenziandosi successivamente in altre linee mitocondriali. Il

periodo in cui è avvenuto tale processo demografico è stato calcolato utilizzando diverse ipotesi e tutti i risultati concordano nel ritenere che la datazione più probabile è circa 18.000 anni fa durante l'ultimo massimo glaciale, fase in cui in Italia centrale e meridionale (Allen et al. 2000; Magri et al. 1999) c'era una predominanza di ambienti aridi e vegetazione steppica.

Le datazioni ottenute in questo studio per i tempi di espansione demografica in *P.apollo* corrispondono sempre ad un periodo glaciale durante il tardo Pleistocene. Questo risultato, in accordo con le esigenze ecologiche di *P.apollo*, suggerisce che durante i periodi glaciali la specie era più ampiamente diffusa e successivamente negli interglaciali le popolazioni limitavano la loro distribuzione ad aree con caratteristiche ecologiche favorevoli, come una montagna o un versante.

Questi risultati sono stati confrontati con quelli precedentemente ottenuti in *P.mnemosyne* da Gratton (2006), per comprendere come le due specie con caratteristiche ecologiche diverse, hanno risposto ai cambiamenti climatici durante il Pleistocene. Le datazioni ottenute per *P.mnemosyne* risalgono ad un periodo più recente circa 13.000 anni fa durante l'Olocene, in cui in Italia le foreste temperate iniziavano la loro espansione post-glaciale nella penisola italiana. Questa discordanza nei tempi di espansione tra le due specie sembra essere in pieno accordo con le esigenze ecologiche xerofile di *P.apollo* e mesofile di *P.mnemosyne*.

La descrizione del pattern filogeografico di *P.apollo* nel presente lavoro ha permesso inoltre di individuare almeno 10 differenti "Evolutionarily Significant Unit" (ESU), che potrebbero essere considerate in futuri piani di conservazione: Pirenei, Sicilia, Alpi-Appennini, Appennino centrale, Europa centro-settentrionale, Grecia continentale, Peloponneso, Anatolia, Caucaso e Asia centrale.

Ringraziamenti

In primis...la persona che si è maggiormente impegnata nel corso degli anni a collezionare un gran numero di campioni di *Parnassiu apollo*, senza i quali questo lavoro non sarebbe stato possibile..... ovviamente il Prof. Valerio Sbordonì.

Ringrazio Tania Deodati e Paolo Gratton per aver partecipato anche loro alla raccolta sul campo e quest'ultimo per aver messo passione nell'aiutarmi all'elaborazione dei risultati e della discussione.

La Prof.ssa Donatella Cesaroni per avermi confortato ed aiutato nei momenti più critici dell'elaborazione di questa tesi.

I miei genitori per avermi supportato economicamente in questi tre anni, le mie due gatte, Molly e Luna, per avermi coccolato con le loro fusa ed infine, ultimi ma non per importanza il mio ragazzo Bruno Mudanò e al mia amica Simona Cafazzo per avermi tollerato in questo periodo.

Bibliografia

Aagaard K., Hindar K., Pullin A.S., James C.H., Hammarstedt O., Balstad T., Hanssen O. (2002). Phylogenetic relationships in brown argus butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae: *Aricia*) from northwestern Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **75**, 27-37.

Ackery P.R. (1975). A guide to the genera and species of Parnassiinae (Lepidoptera: Papilionidae). Bulletin of the British Museum (Natural History) – *Entomology* **31**, 71-105

Allegrucci G., Todisco V., Sbordoni V. (2005). Molecular phylogeography of Dolichopoda cave crickets (Orthoptera: Raphidophoridae): a scenario suggested by mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**, 153-164.

Allen J.R.M., Watts W.A., Huntley B. (2000). Weichselian palynostatigraphy, paleovegetation and paleoenvironments the record from Lago Grande di Monticchio, southern Italy. *Quat. Int.*, **73**, 91-110.

Andersen B.G., Borns Jr H.W. (1997). *The Ice Age World*. Scandinavian University Press, Oslo.

Avice J.C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.

Avice J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York, NY. 511 pp.

Avice J.C., Arnold J., Ball R.M. et al. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.

Baz A. (2002). Nectar plant sources for the threatened Apollo butterfly (*Parnassius apollo* L. 1758) in populations of central Spain. *Biological Conservation* **103**, 277-282.

Bennett, K.J. (1997). *Evolution and Ecology: The Pace of Life* (Cambridge Univ. Press, Cambridge,).

Berezki J., Pecsénye K., Peregovits L., Varga Z. (2005). Pattern of genetic differentiation in the *Maculinea alcon* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **43**, 157-165.

- Bergström A. (2005). Oviposition site preferences of the threatened butterfly *Parnassius mnemosyne*- implications for conservation. *Journal of Insects Conservation* **9**, 21-27.
- Brakefield P.M., Gates J. (1996). Development, plasticity and evolution of butterfly eyespot patterns. *Nature* **384**, 236-242.
- Brookes M.I., Graneau Y.A., King P., Rose O.C., Thomas C.D., Mallet J.L.B. (1997). Genetic analysis of founder bottlenecks in the rare British butterfly *Plebejus argus*. *Conservation Biology*, **11**, 648–661.
- Brower A.V.Z. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 6491-6495.
- Calendini, F., Martin J.F. (2005). PaupUP v1.0.3.1 A free graphical frontend for Paup* Dos software.
- Capdeville P. (1980). Les races géographiques de *Parnassius Apollo* – Die geographischen Rassen von *Parnassius apollo*. Compiègne: *Sciences Naturelles* **6**, 142-191.
- Cassel A., Tammaru T. (2003). Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations of the scarce heath (*Coenonympha hero*: Lepidoptera, Nymphalidae): implications for conservation. *Conservation Genetics* **4**, 83-93.
- Caterino M.S., Sperling F.A.H. (1999). *Papilio* Phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**, 122-137.
- Chen Y. J., Zhang Y.P., Shen F.R., Zhang Y. W., Yang D. R., Nie L., Yang Y. X. (1999). The phylogeny of 5 Chinese peculiar *Parnassius* butterflies using non-invasive sampling mtDNA sequences. *Acta Genetica Sinica* **26**, 203-207.
- Clarke G.M., O'Dwyer C. (2000). Genetic variability and population structure of the endangered golden sun moth, *Synemon plana*. *Biological Conservation*, **92**, 371–381.
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1659.
- Colinvaux, P. A. (1997). An arid Amazon? *Trends in Ecology and Evolution* **12**, 318–319.

Coope, G.R. (1994). The response of insect faunas to glacial-interglacial climatic fluctuations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **344**, 19–26.

DeChaine E.G., Martin A.P. (2004). Historic cycles of fragmentation and expansion in *Parnassius smintheus* (Papilionidae) inferred using mitochondrial DNA. *Evolution* **58**: 113-127.

Deschamps-Cottin M., Barascud B., Aubert J., Descimon H., (2000). Hybridation et introgression entre “bonne especes”: le cas de *Parnassius apollo* et *P.phoebus* (Lepidoptera, Papilionidae). *Compte Rendu de l’Academie des Sciences Peris, Sciences de la Vie/ Life Sciences* **323**, 1-11.

Descimon H. (1995). La conservation des *Parnassius* en France: aspects zoogéographiques, écologiques, démographiques et génétiques. *Rapports d’études de l’OPIE (Vol 1)*, Guyancourt, 54 pp.

Drummond A.J., Rambaut A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214.

Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* **22**, 1185-119

Drummond A.J., Nicholls G.K., Rodrigo A.G., Solomon W. (2002). Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* **161**, 1307-1320.

Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**, 2571-2581.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online* **1**, 47-51.

Excoffier L., Smouse P., Quattro J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.

Farrell B.D. (2001). Evolutionary assembly of the milkweed fauna: cytochrome oxidase I and the age of *Tetraopes* beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**, 467-478.

- Frankham R, Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002). Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.
- Frenzel B. (1973). *Climatic Fluctuations of the Ice Age*. The press of Case western Reserve University, Cleveland and London.
- Fu Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.
- Geiger H., Shapiro A.M. (1992). Genetics, systematics and evolution of holarctic *Pieris napi* species group populations (Lepidoptera, Pieridae). *Zeitschrift für Zoologie, Systematik und Evolutionsforschung*, **30**, 100–122.
- Glassl H. (1993). *P. apollo* – Seine Unterarten, Helmut Glassl, Möhrendorf, 214 pp
- Gratton P., Konopiński M.K., Sbordoni V. (subm.). Pleistocene evolutionary history of *Parnassius mnemosyne* in Central and Eastern Europe: genetic and demographic consequences of climate cycles and support to the “time dependency” of mutation rates.
- Gratton P. (2006). Phylogeography and conservation genetics of *Parnassius mnemosyne* L., 1758 (Lepidoptera, Papilionidae). Tesi Dottorato.
- Guiot J., Pons A., de Beaulieu J.L., Reille M. (1989). A 140,000 year continental climate reconstruction from two European pollen records. *Nature* **338**, 309-313.
- Guthrie R.D. (1982). Mammals of the mammoth steppe as palaeoenvironmental indicators. in; *Palaeoecology of Beringia.*, 307-326 (ed.s D.M. Hopkins, J.V. Matthews Jr, C.E. Schweger & S.B. Young), Academic Press, New York.
- Habel J.C., Schmitt T., Müller P. (2005). The fourth paradigm pattern of post-glacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the marbled white butterfly (Satyrinae, Lepidoptera). *Journal of Biogeography* **32**: 1489-1497.
- Hammouti N. (2006). Molecular phylogeography of the Woodland Ringlet (*Erebia medusa* [Denis and Schiffermüller] 1775) in Europe. Dissertation zur Erlangung des Grades. Doktor der Naturwissenschaften. Am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

- Hewitt G.M. (2004). 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. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hewitt G.M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Molecular genetics in animal ecology* **68**, 87-112.
- Hewitt G.M., (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hey J., Nielsen R. (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* **167**, 747-760.
- Ho S.Y.W., Larson G. (2006). Molecular clocks: when times are a-changin'. *Trends Genetics* **22**, 79-83.
- Ho S.Y.W., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J. (2005). Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Mol Biol Evol* **22**, 1561-1568.
- Hrbek, T., Farias, I.P., Crossa, M., Sampaio, I., Porto, J.I.R., Meyer, A. (2005). Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, **8**: 297-308.
- Huntley M.E., Sykes P., Rohan S., Marin V. (1986). Chemically mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence, and significance. *Mar. Eco. Prog. Ser.* **28**, 105-120.
- Joyce D.A., Pullin A.S. (2001). Phylogeography of the marsh fritillary *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) in the UK. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**, 129-141.
- Jukes T.H., Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro H.N. ed: *Mammalian Protein Metabolism*, 240-252. Academic Press, New York, NY, USA.

Katoh T., Chichvarkin A., Yagi T., Omoto K. (2005). Phylogeny and evolution of butterflies of the genus *Parnassius*: inferences from mitochondrial 16S and ND1 sequences. *Zoological Science* **22** (3), 343-51.

Konopinski M.K. (2007). A set of primers conserved in genus *Parnassius* (Lepidoptera: Papilionidae) for amplification and sequencing of 1016 bp fragment of cytochrome oxidase I from museum specimens. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.020-43.x. *Mol. Ecol. Notes*.

Konvicka M., Kuras T. (1999). Population structure, behaviour and selection of oviposition sites of an endangered butterfly, *Parnassius mnemosyne*, in Litovelske Pomovari, Czech Republic. *Journal of Insects Conservation* **3**, 211-223.

Kostrowicki A.S. (1969). Geography of the palearctic *Papilio noidea* (Lepidoptera). *Zak. Zool. Syst.* Krakow.

Kreuzberg AV.A. (1987). Stenophagy in *Parnassius* (Lepidoptera: Papilionidae) of Central Asia and Altai. *Entomologist's Gazette* **38**, 95-102

Krzywicki M. (1963). Przyczynek do znajomości fauny Rhopalocera Tatr Polskich (Lepidoptera). *Annales Zoologici* **21**, 151-222

Lai G.B., Pullin, A.S. (2004). Phylogeography, genetic diversity and conservation of the large copper butterfly *Lycaena dispar* in Europe. *Journal Of Insect Conservation* **8**: 27-36.

Lewis O.T., Thomas C.D., Hill J.K. *et al.* (1997). Three ways of assessing metapopulation structure in the butterfly *Plebejus argus*. *Ecological Entomology*, **22**, 283–293.

Lunt D.H., Zhang D.X., Szymura, Hewitt G.M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* **5**, 153-165.

Madsen T., Olsson M., Wittzell H. *et al.* (2000). Population size and genetic diversity in sand lizards (*Lacerta agilis*) and adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation*, **94**, 257–262.

Magri D. (1999). Late Quaternary vegetation history at Lagaccione near Lago Bolsena (central Italy). *Rev. Paleobor. Palynol.* **106**, 171-208.

- Margules C.R., Mikovitis G.A., Smith G.T. (1994.) Contrasting the effects of habitat fragmentation on the scorpion *Cercophonius squamata* and amphipod *Arcitalitrus sylvaticus*. *Ecology*, **75**, 2033–2042.
- Martin J.F., Gilles A., Lortscher M., Descimon H. (2002). Phylogenetics and differentiation among the western taxa of the *Erebia tyndarus* group (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **75**, 319-332.
- Moran N.A., Kaplan M.E., Gelsey M.J., Murphey T.G. Scholes E.A. (1999). Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Entomology* **24**, 85-93.
- Moritz C. (1995). Uses of molecular phylogenies for conservation. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **349**, 113-118.
- Moritz C. (1994). Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 373–375.
- Nazari V., Zakharov E.V., Sperling F.A.H. (2007). Phylogeny, historical biogeography, and taxonomic ranking of Parnassiinae (Lepidoptera, Papilionidae) based on morphology and seven genes. *Molecular Phylogenetic and Evolution* **42**, 131-156.
- Nakonieczny M., Michalczyk K., Kędziorski A. (2007). Midgut protease activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*. *Comptes Rendus Biologies* **330**, 126-134.
- Nakonieczny M., Kedziorki A. (2005). Feeding preferences of the Apollo butterfly (*Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*) larvae inhabiting the Pieniny Mts (southern Poland). *C. R. Biol.* **328**, 235-242.
- Napolitano M., Descimon H., Vesco J.P. (1990). La protection des populations de *P.apollo* L. dans le sud de la France: etude génétique préliminaire (Lepidoptera, Papilionidae). *Nota Lepidopterologica* **13**, 160-176.
- Nei M. (1987). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nei M. (1972). Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* **106**, 283-292.
- Nielsen R., Wakeley J. (2001). Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics* **158**, 885-896.

- Nilsson T. (1983). *The Pleistocene: Geology and Life in the Quaternary Ice Age*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Omoto K., Katoh T., Chichvarkin A., Yagi T. (2004). Molecular systematics and evolution of the “Apollo” butterflies of the genus *Parnassius* (Lepidoptera, Papilionidae) based on mitochondrial DNA sequence data. *Gene* **326**, 141-147.
- Panchal M., Beaumont M.A. (2007). The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. *Evolution* **61**, 1466–1480.
- Petit R.J. (2008). The coup de grâce for the nested clade phylogeographic analysis? *Molecular Ecology*, **17**: 516–518.
- Porter A.H., Geiger H. (1995). Limitations to the inference of gene flow at regional geographic scales- an example from the *Pieris napi* group (Lepidoptera: Pieridae) in Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **54**, 329-348.
- Posada D., Crandall K.A., Templeton A.R. (2000). GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* **9**, 487-488.
- Posada D., Crandall K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatic* **14**, 817-818.
- Prior, K.A., Gibbs, H.L., Weatherhead, P.J. (1997). Population genetic structure in the black rat snake: implication for management. *Conserv. Biol.* **11**, 1147–1158.
- Quek S.P., Davies J.S., Itino T., Pierce N.E. (2004). Codiversification in an ant-plant mutualism: stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicinae) in habitants of *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution*, **58**(3), 554–570.
- Racheli T., Cianchi R., Bullini L., (1983). Differenziamento e variabilità genetica in alcune sottospecie di *Parnassius apollo* (Lepidoptera, Papilionidae). *Atti XIII Congr. Naz. It. Ent.*, Sestriere- Torino, 1983.
- Reed D.H., Frankham R. (2003). Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* **17** (1), 230-237.
- Reille M., De Beaulieu J.L., Svobodova H., Andrieu-Ponel V., Goeury C. (1998). Pollen analytical biostratigraphy of the last five climatic cycles from a long continental sequence from the Velay region (Massif Central, France). *Journal of Quaternary Science* **15**, 665 – 685.

Rivoire J. (1998). Les aberrations de *Parnassius apollo* – Description de formes individuelles, leur nom, l’auteur, et quelques synonymes. Available online: <http://j.rivoire.free.fr/tele.htm>.

Rholing R.J. et al. (1998). Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature* **394**, 162–165.

Rozas J., Sanchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.

Saarma U., Ho S.Y.W., Pybus O. G., Kaljuste M., Tumanov I.L., Kojola I., Vorobiev A.A., Markov N.I., Saveljev A.P., Valdmann H., Lyapunova E.A., Abramov A.V., Männil P., Korsten M., Vulla E., Pazetnov S.V., Pazetnov V.S., Putschkovskiy S.V., Rõkov A.M. (2007). Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in north-eastern Europe and a new time-frame for the formation of European brown bear lineages. *Molecular Ecology*, **16**: 401-413.

Schmitt T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, Review 4, 11.

Schmitt T., Hewitt G.M., Müller P. (2006). Disjunct distributions during glacial and interglacial periods in mountain butterflies: *Erebia epiphron* as an example. *J. Evol. Biol.*, **19**,108-113.

Schmitt T., Röber S., Seitz A. (2005). Is the last glaciation the only relevant event for the present genetic population structure of the meadow brown butterfly *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Nymphalidae)? *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 419-431.

Schmitt T., Krauss J. (2004). Reconstruction of the colonization route from glacial refugium to the northern distribution range of the European butterfly *Polyommatus coridon* (Lepidoptera : Lycaenidae). *Diversity and Distributions* **10**, 271-274.

Schmitt T., Hewitt G. M. (2004). The genetic pattern of population threat and loss: a case study of butterflies. *Molecular Ecology* **13**, 21–31.

Schmitt T., Hewitt G.M. (2003). Molecular biogeography of the arctic-alpine disjunct burnet moth species *Zygaena exulans* (Zygaenidae, Lepidoptera) in the Pyrenees and Alps. *Journal of Biogeography* **31** (6), 885-893.

- Schmitt T., Gießl A., Seitz A. (2003). Did *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) have distinct glacial refugia in southern Europe? Evidence from population genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**, 529-538.
- Schmitt T., Seitz A. (2002). Postglacial distribution area expansion of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae) from its Ponto-Mediterranean glacial refugium. *Heredity* **89**, 20-26.
- Schmitt T., Gießl A., Seitz A. (2002) Postglacial colonisation of western Central Europe by *Polyommatus coridon* (Poda, 1761) (Lepidoptera: Lycaenidae): evidence from population genetics. *Heredity* **88**, 26-34.
- Schmitt T., Seitz A. (2001a). Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *Journal of Biogeography* **28**, 1129-1136.
- Schmitt T., Seitz A. (2001b). Intraspecific allozymatic differentiation reveals the glacial refugia and the postglacial expansions of European *Erebia medusa* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **74**, 429–458.
- Schmitt T. (1999). Phylogeographie europäischer Tagfalter basierend auf populations genetischen Analysen unter besonderer Berücksichtigung von *Polyommatus coridon* und *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) sowie *Erebia medusa* und *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Satyrinae). PhD thesis, University of Mainz, Germany.
- Schönswetter P., Stehlik I., Holderegger R., Tribsch A. (2005). Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. *Molecular Ecology* **14**, 3547–3555.
- Sneider S., Excoffier L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites application to human mitochondrial DNA. *Genetics* **152**, 1079-1089.
- Sequeira G.D., Lanteri A.A., Scataglini M.A., Confalonieri V.A., Farrell B.D. (2000). Are flightless *Galapaganus* weevils older than the Galapagos Islands they inhabit? *Heredity* **85**, 20-29.
- Shapiro B., Rambaut A., Drummond A.J. (2006). Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Mol Biol Evol* **23**, 7-9.

- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**, 651-701.
- Sperling F.A.H., Raske A.G., Otvos I.S. (1999). Mitochondrial DNA sequence variation among populations and hosts races of *Lambdina fiscellaria* (G. n.) (Lepidoptera: Geometridae). *Insect Molecular Biology* **8**, 97-106.
- Sperling F.A.H., Landry J., Hickey D.A. (1995). DNA-based identification of introduced ermine moth species in North America (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Annals of the Entomological Society of America* **88**, 155-162.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.E. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Evolution* **7**, 453-464.
- Tajima F. (1989). Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- Tamura K., Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* **10** (3), 512-526.
- Templeton A.R. (2008). Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology* **17**, 1877-1880.
- Templeton A.R. (2004). Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* **13**, 189-809.
- Templeton A.R., Sing C.F. (1993). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* **134**, 659-669.
- Templeton A.R., Boerwinkle E., Sing C.F. (1987). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* **117**, 343-351.
- Thomas J.A. (1995). The conservation of declining butterfly populations in Britain and Europe: priorities, problems and successes. *Biol. J. Linn. Soc.* **56** (suppl.), 55-72.

- Tzedakis P.C., Lawson I.T., Frogley M.R., Hewitt G.M., Preece R.C. (2002). Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science* **297**, 2044-2047.
- Van Andel T.H., Tzedakis P.C. (1996). Paleolithic landscapes of Europe and environs, 150.000-25.000 years ago: an overview. *Quaternary science Reviews* **15**, 481-500.
- Vandewoestijne S., Baguette M., Brakefiel P.M., Saccherib I.J. (2003). Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**, 630-646.
- Vandewoestijne S., Nève G, Baguette M. (1999). Spatial and temporal population genetic structure of the butterfly *Aglais urticae* L. (Lepidoptera, Nymphalidae). *Mol Ecol*, **8**, 1539-1543.
- Van Swaay C.A.M., Warren M.S. (1999). Red Data book of European butterflies (Rhopalocera). *Nature and Environment* **99**, Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- Vila M. (2004). Effects of Environmental Changes during the Quaternary on the Distribution of Extant Species. The Case of the Butterflies *Erebia triaria* and *E. palzarica*. PhD thesis, University of A Coruña, Galicia, Spain.
- Voronoi M.G. (1908). Nouvelles applications des parametres continus a la theorie des formes quadratiques, deuxiuxieme memoire, recherche sur les paralleloedres primitifs. *Journal of Reine Angewandte Mathematik* **134**, 198-287.
- Wahalberg N., Saccheri I. (2007). The effects of Pleistocene glaciations on the phylogeography of *Melitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Eur. J. Entomol.* **104**: 675–684.
- Webb R.S., Rind D.H., Lehman S.J., Healy R.J., Sigman D. (1997). The influence of ocean heat transport on the climate of the last Glacial Maximum. *Nature* **385**, 695–699.
- Williams D., Dunkerley D., DeDecker P., Kershaw P., Chappell M. (1998). *Quaternary Environments*. Arnold, London.
- Xia X., Xie. Z., (2001). DAMBE Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**, 371-373.