



**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE E DELL'UOMO  
UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA ANIMALE  
XVIII CICLO  
(2002 - 2006)**

**Emiliano Mancini**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA  
FILOGENESI ED ECOLOGIA TROFICA  
IN COLEOTTERI ANTOFAGI DEL GENERE MELIGETHES  
(COLEOPTERA, NITIDULIDAE)**

*PhD Dissertation*

*PHYLOGENY AND TROPHIC ECOLOGY  
OF ANTHOPHAGOUS BEETLES OF THE GENUS MELIGETHES  
(COLEOPTERA, NITIDULIDAE)*

**Roma, 2006**



**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE E DELL'UOMO  
UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**BIOLOGIA ANIMALE**

**XVIII CICLO**

**(2002 - 2006)**

**Emiliano Mancini**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**FILOGENESI ED ECOLOGIA TROFICA**

**IN COLEOTTERI ANTOFAGI DEL GENERE MELIGETHES**

**(COLEOPTERA, NITIDULIDAE)**

*PhD Dissertation*

*PHYLOGENY AND TROPHIC ECOLOGY*

*OF ANTHOPHAGOUS BEETLES OF THE GENUS MELIGETHES*

*(COLEOPTERA, NITIDULIDAE)*

**Roma, 2006**



*A Graziano,  
alle sue passioni, alle sue aspirazioni  
fino all'ultimo istante*



# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RIASSUNTO .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1. INTRODUZIONE .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.1 Obiettivi .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>1.2 Conoscenze sistematiche ed ecologiche sulle specie del sottogruppo di <i>Meligethes coracinus</i> .....</b>                                   | <b>23</b> |
| 1.2.1 Famiglia Nitidulidae.....  | 23        |
| 1.2.2 Cenni su biologia ed etologia .....  | 23        |
| 1.2.3 Sottofamiglia Meligethinae .....   | 24        |
| 1.2.4 Il genere <i>Meligethes</i> Stephens, 1830 .....   | 25        |
| 1.2.5 Il gruppo di <i>Meligethes aeneus</i> (Fabricius, 1787) .....  | 25        |
| <b>1.3 Status tassonomico ed evolutivo del sottogruppo di specie di <i>Meligethes coracinus</i> Sturm, 1845 .....</b>                                | <b>29</b> |
| <b>2. MATERIALI .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.1 Scelta del materiale di studio .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.2 Raccolte sul campo di materiale entomologico e conservazione dei campioni.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3. METODI .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>3.1 La Regione di Controllo del DNA mitocondriale negli insetti.....</b>  | <b>43</b> |
| 3.1.1 Cenni su funzione e struttura: dati disponibili per gli insetti.....   | 43        |
| 3.1.2 Caratteristiche molecolari ed evolutive della Regione di Controllo negli insetti: vantaggi e svantaggi per l'utilizzo in studi evolutivi. .... | 48        |
| <b>3.2 Procedure sperimentali.....</b>   | <b>50</b> |
| 3.2.1 Estrazione del DNA .....   | 50        |
| 3.2.2 Tecniche di PCR e <i>Long PCR</i> .....  | 50        |
| 3.2.3 Clonaggio .....  | 53        |
| 3.2.4 Sequenziamento .....   | 54        |
| <b>3.3 Metodi di analisi molecolare e filogenetica .....</b>   | <b>56</b> |
| 3.3.1 Allineamento delle sequenze.....   | 56        |
| 3.3.2 Analisi della variabilità mediante <i>sliding windows</i> .....  | 57        |
| 3.3.3 Analisi molecolare delle sequenze .....  | 58        |
| 3.3.4 Scelta dei modelli di evoluzione molecolare.....   | 59        |
| <b>3.4 Metodi di ricostruzione filogenetica .....</b>  | <b>62</b> |
| 3.4.1 Neighbor-Joining (NJ).....   | 63        |
| 3.4.2 Massima Parsimonia (MP) .....  | 63        |
| 3.4.3 Massima Verosimiglianza (ML) .....   | 66        |
| 3.4.4 Analisi Bayesiana.....   | 67        |
| 3.4.5 <i>Bootstrap</i> .....   | 68        |
| 3.4.6 Ricostruzioni evolutive tramite <i>network</i> di Parsimonia statistica.....   | 69        |
| <b>3.5 Confronto tra i marcatori molecolari: Regione di Controllo e COI.....</b>   | <b>71</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4. RISULTATI</b> .....  | <b>73</b>  |
| 4.1 Caratteristiche della Regione di Controllo nei <i>Meligethes</i> .....                                 | 73         |
| 4.2 Analisi e confronto delle sequenze di Regione di Controllo dei <i>Meligethes</i> .....                 | 77         |
| 4.3 Confronto del grado di polimorfismo tra Regione di Controllo e COI .....                               | 83         |
| 4.4 Risultati delle analisi filogenetiche .....  | 85         |
| 4.5 Risultati delle analisi di <i>network</i> (TCS).....   | 94         |
| <b>5. DISCUSSIONE</b> .....  | <b>97</b>  |
| <b>6. CONCLUSIONI</b> .....  | <b>107</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....   | <b>111</b> |
| <b>8. APPENDICI</b> .....  | <b>129</b> |
| APPENDICE I A - Sequenze nucleotidiche – REGIONE DI CONTROLLO “porzione TM” .....                          | 129        |
| APPENDICE I B - Sequenze nucleotidiche – REGIONE DI CONTROLLO “porzione SR” .....                          | 132        |
| APPENDICE I C - Sequenze nucleotidiche – REGIONE DI CONTROLLO (A).....                                     | 135        |
| APPENDICE I D - Sequenze nucleotidiche – REGIONE DI CONTROLLO (B).....                                     | 139        |
| APPENDICE II A - Procedure sperimentali – Estrazione del DNA .....   | 140        |
| APPENDICE II B - Procedure sperimentali – Reazione a catena della polimerasi (PCR e <i>Long PCR</i> )..... | 140        |
| APPENDICE II C - Procedure sperimentali – Clonaggio (T/A cloning) .....                                    | 142        |
| APPENDICE II D - Procedure sperimentali – Sequenziamento .....   | 143        |
| APPENDICE III A - File Nexus per Paup* 4b10 per la Regione di Controllo.....                               | 144        |
| APPENDICE III B - File Nexus per Paup* 4b10 per la COI.....  | 146        |
| APPENDICE IV - Distribuzione geografica delle specie del sottogruppo di <i>M. coracinus</i> .....          | 148        |



## RIASSUNTO

Il sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus* Sturm (Coleoptera: Nitidulidae), compreso nel vasto gruppo di *M. aeneus*, include tutte specie antofaghe associate per lo sviluppo larvale alla famiglia delle Brassicaceae.

Le relazioni filogenetiche tra la maggior parte delle specie sinora descritte per questo sottogruppo (*M. coracinus*, *M. longulus*, *M. matronalis*, *M. erysimicola*, *M. thalassophilus*, *M. arankae*) e di queste con due possibili “forme” di incerto inquadramento sistematico (*M. sp. cfr. coracinus*, *M. sp. 2 cfr. longulus*) sono state analizzate mediante il confronto di sequenze nucleotidiche corrispondenti alla Regione di Controllo del DNA mitocondriale, un marcatore generalmente caratterizzato da alti tassi di evoluzione (e potenzialmente utile per analisi filogenetiche tra taxa di recente origine o per studi di genetica di popolazione), ma raramente utilizzato per studi evolutivi negli insetti a causa di difficoltà di tipo tecnico legate al suo isolamento e sequenziamento.

Il frammento corrispondente all’intera Regione di Controllo è stato amplificato *in vitro* mediante PCR e completamente sequenziato (a meno di una relativamente limitata porzione centrale) per alcuni individui di *Meligethes thalassophilus*. Sulla base di un’analisi della variabilità nucleotidica lungo l’intera Regione di Controllo è stata selezionata e successivamente amplificata e sequenziata per tutti i campioni, una porzione di 798 paia di basi caratterizzata da un livello di variabilità genetica ritenuto adatto ai fini di una ricostruzione filogenetica.

Le sequenze sono state quindi allineate, confrontate tra loro e sottoposte ad una serie di analisi statistiche per il calcolo di alcuni parametri di descrizione della variabilità genetica. Mediante l’uso di alcuni modelli evolutivi sono stati calcolati i valori di distanza intra- ed inter-specifica. Sono state quindi condotte sia ricostruzioni filogenetiche mediante quattro differenti metodi (Neighbor-Joining, Massima Parsimonia, Massima Verosimiglianza e Analisi Bayesiana), sia ricostruzioni delle relazioni evolutive tra alcuni aplotipi tramite *network* di Parsimonia Statistica. Sono stati infine operati alcuni confronti con i valori di distanza genetica e con i risultati delle ricostruzioni filogenetiche ottenute attraverso l’uso del gene mitocondriale della COI sulla base di dati già disponibili per questo marcatore.

La Regione di Controllo nei *Meligethes* presenta una lunghezza variabile dalle 5500 alle 6000 paia di basi ed un tasso di sostituzione che sembra promettente per condurre studi evolutivi a vari livelli tassonomici. Alcune porzioni specifiche di questo marcatore mostrano infatti livelli di variabilità potenzialmente adatti persino per condurre studi di genetica di popolazione o di tipo filogeografico. Tuttavia, malgrado l’elevato tasso evolutivo rilevato per la porzione selezionata di Regione di Controllo (fino a tre volte superiore rispetto a quello della COI), i risultati delle ricostruzioni

filogenetiche per il sottogruppo-*coracinus* ottenute attraverso l'uso di questo marcatore mettono di nuovo in luce le problematiche relative all'incongruenza tra le evidenze molecolari e morfologiche già rilevate da studi precedenti. I risultati mettono infatti in evidenza una condizione apparentemente "polifiletica" per gran parte delle specie esaminate, dal momento che spesso esemplari attribuibili con certezza su base morfologica ad una medesima specie non si riuniscono in uno stesso clade, ma prendono posto all'interno di raggruppamenti in cui possono invece risultare inclusi individui assegnati ad una o a più specie morfologicamente ben distinte. In particolare le topologie degli alberi filogenetici presentano due principali raggruppamenti: un "clade orientale", comprendente la quasi la totalità dei campioni (ascritti anche a differenti specie) originari delle aree medio-orientali, e un "clade occidentale", in cui sono invece compresi gran parte degli individui, una parte dei quali eterospecifici, provenienti principalmente da Italia e Spagna.

L'evoluzione del sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus* sembra essere il risultato di una sovrapposizione di molteplici fenomeni storici e microevolutivi più o meno correlati e interdipendenti tra loro che potrebbero fare riferimento alla presenza di polimorfismi genetici ancestrali ancora condivisi tra le specie esaminate, a fenomeni di ibridazione interspecifica, e a differenti velocità evolutive tra caratteri morfologici e molecolari. La condizione "polifiletica" rilevata per la gran parte delle specie e il raggruppamento di taxa di medesima origine geografica è molto probabilmente un risultato che riflette la complessa storia evolutiva delle popolazioni delle specie esaminate, per cui la condivisione di aplotipi a livello locale potrebbe, ad esempio, essere la conseguenza di una strutturazione genetica delle popolazioni legata ai cicli delle glaciazioni pleistoceniche. Le specie del sottogruppo-*coracinus* sarebbero andate incontro a fenomeni di speciazione in tempi molto recenti a seguito, presumibilmente, di una rapida radiazione adattativa promossa da meccanismi di *host shift*: in effetti il sottogruppo-*coracinus*, da ritenere tuttora in piena evoluzione e differenziamento, probabilmente si è originato alla fine del Pliocene, a seguito di processi di specializzazione e generalizzazione trofica, in associazione con diversi generi di Brassicaceae, in Europa centro-meridionale e nelle aree anatolico-caucasiche. Al momento non è tuttavia possibile assegnare una posizione filogenetica definitiva per buona parte delle specie esaminate, né tanto meno chiarire definitivamente le apparenti contraddizioni nelle possibili interpretazioni tassonomiche derivanti dall'uso di diversi insiemi di caratteri (morfologici, ecologici e molecolari) sinora utilizzati. Il quadro tassonomico e filogenetico del sottogruppo dovrà senz'altro essere studiato e approfondito in chiave filogeografica, nel tentativo di ricostruire la storia filogenetica degli aplotipi presenti nel *pool* genico delle specie del sottogruppo di *M. coracinus* sull'intera estensione del loro complessivo areale geografico.

## **ABSTRACT**

*Meligethes coracinus* species subgroup (Coleoptera: Nitidulidae), belonging to the wide Holarctic *M. aeneus*-group, includes all antophagous species of pollen beetles associated with members of the plant family Brassicaceae (including Capparaceae) and distributed from the W-Mediterranean areas to Eastern Siberia. Species belonging to this subgroup are very similar morphologically but show markedly different levels of feeding specialization: some species appear to be strictly monophagous (using a single host plant species), while others feed on different species (up to three or more related genera of the same botanical family).

Previous reconstructions of evolutionary relationships by means of different molecular markers (COI, COII and ITS2) did not support the traditional morphologically based taxonomy of the *M. coracinus* species-subgroup, showing a lack of resolution at least for species that are probably in phase of present day rapid evolution.

A molecular phylogeny was constructed for the *Meligethes coracinus* species subgroup by means of mitochondrial Control Region, a potentially useful genetic markers for evolutionary studies of recently divergent taxa although rarely used because of its high AT content and structural features (such as secondary structures, homopolymers and tandem repeats) which pose technical and analytical problems. To assess the intraspecific levels of variation, the whole Control Region was PCR-amplified and completely sequenced (except for a relatively small central portion) for some specimens of *Meligethes thalassophilus*. A 798 bp fragment of Control Region was then amplified and sequenced for 50 samples belonging to most of the species included in the *M. coracinus* subgroup. Sequence data were analyzed to compare different models of DNA substitution in a hierarchical hypothesis-testing framework, and an evolutionary model was selected. The phylogenetic relationships among all tested individuals were then analyzed by the Neighbor-Joining, the Maximum likelihood, the Maximum Parsimony methods and by the Bayesian analysis. Genealogical relationships among some haplotypes were reconstructed by means of statistical parsimony networks. Finally, a comparison between CR and COI phylogenetic signals was carried out.

The length of the mtDNA Control Region for *Meligethes* is about 5500-6000 bp: this represents one of the longest control region ever sequenced for coleopterans thus far. Our analyses allowed us to identify portions of the *Meligethes* Control Region with enough variation for phylogenetic reconstructions and even for population genetic and phylogeographic studies. Despite the high evolutionary rate of substitution assessed (nearly three times faster than COI) phylogenetic relationships inferred by Control Region did not consistently differ from that obtained by previous

*molecular phylogenetic studies. Trees topologies showed a polyphyletic status for most of the examined taxa and two main clades - highly supported by bootstrap values – were obtained: the “Eastern Clade”, mainly including samples of different species coming from the middle and eastern areas of the species distribution ranges, and the “Western Clade”, including most of the heterospecific individuals sampled in Italy and Spain. The incongruence between the recovered gene trees and the current taxonomic classification can be explained through incomplete sorting of ancestral polymorphism in diverging lineages, horizontal transfer of haplotypes perhaps due to local hybridization within glacial refuges, or different evolution of morphological and molecular characters. Species belonging to coracinus-subgroup may have experienced recent speciation events following an adaptative radiation promoted by host shift mechanisms. Diversification of coracinus-subgroup is probably to date at the end of Pliocene in the Middle and Southern Europe or in Anatolic areas. Specialization for trophic associations with host-plants belonging to different genera of Brassicaceae may have encouraged diversification and speciation events. In this framework it is not possible to assign a phylogenetic status for most of the taxa included in the M. coracinus subgroup or definitely clarify the high discordance among morphological and molecular data. Therefore, in order to better understand the evolutionary processes that occurred within the M. coracinus species-subgroup, it will be necessary to investigate this problem deeply by means of fast nuclear molecular markers or by a phylogeographical approach.*

# 1. INTRODUZIONE

Le specie di coleotteri fitofagi molto affini da un punto di vista filogenetico sorprendentemente differiscono spesso in maniera sostanziale nei legami trofici con le rispettive piante ospiti e per la scelta degli habitat (Farrell & Mitter, 1990; Funk *et al.*, 1995; Futuyma, 1999, 2000). E' spesso difficile indicare con chiarezza le dinamiche evolutive che sono alla base di queste differenziazioni di natura ecologica e scegliere una delle possibili ipotesi in grado di spiegare le rilevanti differenze nella selezione degli habitat (Futuyma, 2000; Drès & Mallet, 2002; Janz *et al.*, 2006).

Tuttavia uno studio che approfondisca le relazioni evolutive mediante un'analisi di filogenesi molecolare con un buon grado di risoluzione delle relazioni tra specie molto affini più o meno specializzate - affiancato a dati provenienti da rilevazioni su campo dell'ecologia delle specie in questione - può costituire un buon punto di partenza per ricostruire uno scenario evolutivo verosimile, mediante lo studio e la successiva scelta di modelli di speciazione che meglio interpretino i risultati delle analisi filogenetiche.

I coleotteri Nitidulidi del genere *Meligethes* sono molto abbondanti, popolano una gran quantità di ambienti terrestri, soprattutto nelle regioni Palearctica ed Afrotropicale, e specie filogeneticamente molto affini (*sister species*) mostrano spesso livelli molto eterogenei di specializzazione con le piante ospiti. I *Meligethes*, infatti, allo stadio larvale (con la sola eccezione della specie afrotropicale *M. heteropus* legata a Graminaceae) si sviluppano sui fiori di alcune famiglie di piante dicotiledoni e spesso presentano forti eterogeneità nei livelli di specializzazione trofica (Audisio, 1993a). Si conoscono più di 500 specie di *Meligethes*, oltre a circa 120 specie inedite del Continente Africano e dal Subcontinente Indiano che attendono ancora una descrizione formale. Tutte queste specie sono raggruppate in alcuni sottogeneri - formalmente descritti - e in una serie di gruppi naturali, sottogruppi e complessi di specie, la gran parte dei quali associati a diverse famiglie di piante.

Uno dei raggruppamenti più ampi è quello di *Meligethes aeneus*, comprendente una quarantina di entità palearctiche e due nearctiche strettamente associate allo stadio larvale con piante della famiglia vegetale delle Brassicaceae (incluse le "Capparaceae", come suggerito da Judd 1994) e distribuite perlopiù nelle aree del Mediterraneo settentrionale e dell'Asia meridionale (Audisio & Spornraft, 1990; Audisio, 1993a; Audisio & De Biase, 1999; Audisio, Jelínek & Stevanovic, 1999; Ericson, 1999; Audisio *et al.*, 2001a; 2001b; 2002; 2003; 2005a; 2005b; 2006; De Biase *et al.*, 2003). Il gruppo di *M. aeneus* include sia specie strettamente monofaghe, sia largamente polifaghe, con molte specie che hanno sviluppato una relativamente stretta oligofagia (ovvero, uno sviluppo larvale condotto su una o un piccolo numero di piante appartenenti allo stesso genere o a generi

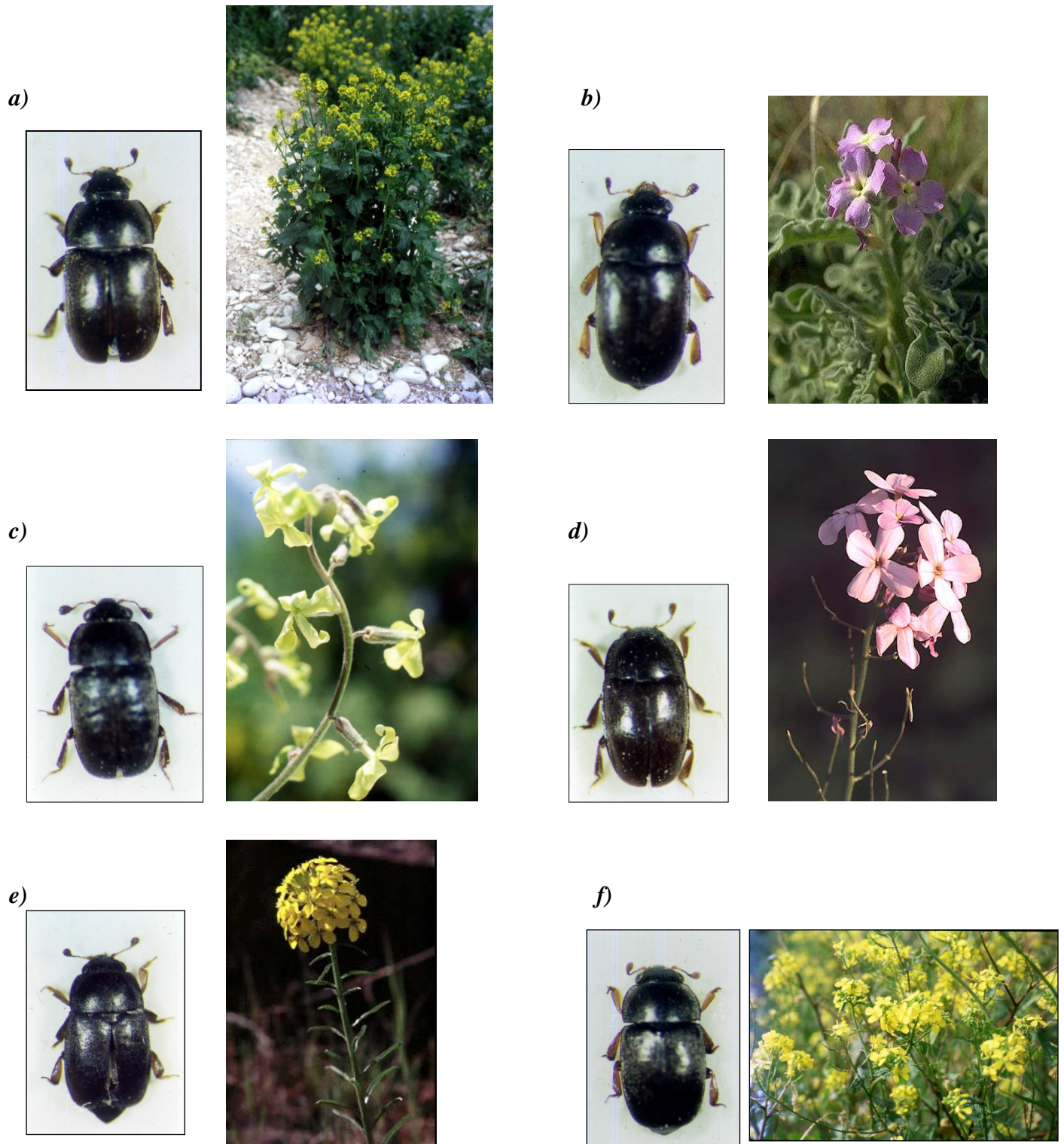
molto affini). Le specie appartenenti al gruppo di *M. aeneus* sono suddivise in vari sottogruppi e complessi la cui classificazione è spesso incerta, tanto che non è un evento raro la scoperta di nuove *sibling species* (Audisio *et al.*, 2005a).

Il presente studio si è proposto di affinare le conoscenze tassonomiche, filogenetiche ed ecologiche del sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus*, il più ampio sottogruppo all'interno del gruppo di *Meligethes aeneus*.

Il sottogruppo di *Meligethes coracinus* include specie di modeste dimensioni (da 1 a circa 3 mm in lunghezza), poco appariscenti, di aspetto piuttosto omogeneo, sovente distinguibili sulla base di minute differenze esoscheletriche e, inequivocabilmente, solo mediante il confronto di una serie di caratteri relativi agli apparati genitali maschili e femminili.

Il sottogruppo formalmente comprende le seguenti specie: *M. subaeneus* Sturm, 1845, *M. coracinus* Sturm, 1845, *M. longulus* Schilsky, 1894, *M. erysimicola* Audisio & De Biase, 2001, *M. matronalis* Audisio & Spornraft, 1990, *M. thalassophilus* Audisio & De Biase, 2005 e *M. arankae* Audisio & De Biase, 2005. A questo sottogruppo possono essere attribuite anche alcune specie più isolate, provenienti dalle aree del Mediterraneo occidentale, dell'Asia Centrale, della Grecia e della Turchia orientale, quali *M. epeirosi* Audisio, Mancini & De Biase 2006, *M. fulvipes* C. Brisout De Barneville, 1863, *M. cristofaroi* Audisio & De Biase, 2005, *M. explanatus* Reitter, 1900 e *M. accentus* Kirejtshuk, 1978. Il sottogruppo di *Meligethes coracinus* quasi certamente comprende anche un certo numero di specie "criptiche" e specie "sorelle" non ancora descritte, differenziabili solamente per minime differenze morfologiche, e che tuttavia presentano tra loro delle differenze molto marcate per quanto riguarda gli ambienti popolati e la scelta delle piante ospiti.

Alcuni rappresentanti del sottogruppo di *M. coracinus* (e le corrispondenti piante ospiti) sono mostrati in *figura 1*, mentre una sintesi dei dati tassonomici, zoogeografici ed ecologici riguardanti l'insieme delle specie ad esso appartenenti è riportata in *tabella 1*. In appendice IV, infine, vengono riportate le cartine degli areali di distribuzione delle specie esaminate per questo studio.



**Figura 1 – Rappresentanti di alcune delle specie comprese nel sottogruppo di *M. coracinus* (a sinistra) e rispettive piante ospiti (a destra): a) *M. coracinus* e *Barbarea* sp.; b) *M. thalassophilus* e *Matthiola sinuata*; c) *M. arankae* ed *Hesperis laciniata*; d) *M. matronalis* ed *Hesperis matronalis*; e) *M. erysimicola* e *Erysimum* sp. f) *M. fulvipes* e *Brassica* sp.**

*Figure 1 – Specimens of some of the M. coracinus-subgroup species (left) with their own host plants (right): a) M. coracinus and Barbarea sp.; b) M. thalassophilus and Matthiola sinuata; c) M. arankae and Hesperis laciniata; d) M. matronalis and Hesperis matronalis; e) M. erysimicola and Erysimum sp. f) M. fulvipes and Brassica sp.*

**Tabella 1 - Sintesi dei dati tassonomici, zoogeografici ed ecologici dei taxa del sottogruppo di *M. coracinus*.**

*Table 1 – Taxonomical, zoogeographical and ecological data for M. coracinus-subgroup species*

| Specie   | Distribuzione *  | Habitat  | Altitudine   | Piante ospiti  | Regime trofico          |                                |
|--|--|--|--------------|--|-------------------------|--------------------------------|
| <i>M. coracinus</i><br>Sturm, 1845                     | Europa, Anatolia, Asia centrale, Siberia (a)   | Ambienti umidi e freddi di bassa e media quota anche ad influenza antropica e campi coltivati a Brassicaceae | 0-2500 m     | <i>Brassica</i> spp.,<br><i>Sinapis</i> spp. (Brassicaceae),<br><i>Barbarea</i> spp. (Arabideae),<br><i>Sisymbrium</i> spp. (Sisymbriaceae)  | polifaga                | complesso<br><i>coracinus</i>  |
| <i>M. erysimicola</i><br>Audisio & De Biase, 2001      | Europa meridionale, Turchia, Caucaso e Iran (b)  | Ambienti rupestri xerici, brecciai e macereti montani e submontani   | 200-2200 m   | <i>Erysimum</i> spp. (Hesperideae)   | oligofaga               |                                |
| <i>M. sp. cfr. coracinus</i>                           | Anatolia orientale (c)   | Margini xerici di ambienti nemorali con affioramenti rocciosi  | 1300-1900 m  | sconosciuta, adulti raccolti su <i>Arabis</i> sp. cfr. <i>hirsuta</i> (Arabideae) e su <i>Erysimum</i> sp. (Hesperideae)   | monofaga ?              |                                |
| <i>M. longulus</i><br>Schilsky, 1894                   | Turchia orientale, Aree Pontiche ? (d)   | Ambienti suberemici terroso-rocciosi   | 1400-1600 m  | <i>Matthiola odoratissima</i> (Bieb.) R. Br. (Hesperideae)   | monofaga                | complesso<br><i>longulus</i>   |
| <i>M. sp. 1 cfr. longulus</i>                          | Tadjikistan  | Ambienti xerici montani  | 2000 m       | sconosciute  | sconosciuto             |                                |
| <i>M. sp. 2 cfr. longulus</i>                          | Turchia orientale (e)  | Ambienti xerici, brecciai e macereti montani   | 1200-2200 m  | <i>Tchihatchewia isatidea</i> (Lunariaceae)<br><i>Hesperis</i> spp. (eccetto <i>H. matronalis</i> L.): ad es. <i>H. laciniata</i> All., <i>H. tristis</i> L., <i>H. bicuspidata</i> (Willd.) Poiret, <i>H. pendula</i> DC. (Hesperideae) | monofaga                |                                |
| <i>M. arankae</i><br>Audisio & De Biase, 2005          | Europa centro-orientale e meridionale, aree anatolico-caucasiche (f)   | Ambienti xerici e rupestri montani, macereti e brecciai calcarei   | 0-2400 m     | <i>Matthiola</i> spp.: <i>M. incana</i> (L.) R. Br., <i>M. sinuata</i> (L.), <i>M. fruticulosa</i> (L.) Maire, e <i>M. perennis</i> P. Conti (Hesperideae)   | oligofaga               |                                |
| <i>M. thalassophilus</i><br>Audisio & De Biase, 2005   | Aree cantabriche della Penisola Iberica ed aree costiere tirreniche dell'Italia centrale, Puglia e Sicilia (g) | Dune litoranee, faraglioni a picco sul mare, macereti e brecciai calcarei                                    | 0-700 m      |  |                         |                                |
| <i>M. subaeneus</i><br>Sturm, 1845                     | Europa centrale, meridionale e Caucaso settentrionale (h)  | Ambienti nemorali mesofili con affioramenti rocciosi   | 0-1700 m     | <i>Cardamine</i> spp.,<br><i>Cardaminopsis</i> spp. (Arabideae) e<br><i>Sisymbrium irio</i> L. (Sisymbriaceae)   | oligofaga?/<br>polifaga | complesso<br><i>subaeneus</i>  |
| <i>M. matronalis</i><br>Audisio & Spornraft, 1990      | Europa, Turchia e Azerbaijan (i)   | Ambienti idrofilo con boschi mesofili di latifoglie  | 0-1800 m     | <i>Hesperis matronalis</i> L. (Hesperideae)  | monofaga                |                                |
| <i>M. epeirosi</i><br>Audisio, Mancini & De Biase 2006 | Grecia settentrionale (l)  | Margini di boschi in ambienti rupestri ombreggiati   | ?1500-1600 m | <i>Cardamine</i> (s. str.) <i>glauca</i> Sprengel (Arabideae)  | monofaga ?              |                                |
| <i>M. cristofaroi</i><br>Audisio & De Biase, 2005      | Turchia meridionale (m)  | Affioramenti calcarei, ambienti rupestri umidi   | 1500-1600 m  | <i>Arabis</i> sp. cfr. <i>caucasica</i> (Arabideae)  | monofaga?               | complesso<br><i>fulvipes</i>   |
| <i>M. fulvipes</i><br>C. Brisout de Barneville, 1863   | Europa occidentale e Africa settentrionale maghrebina (n)  | Ambienti ruderali xerici e terreni coltivati a Brassicaceae  | 0-2000 m     | <i>Sinapis</i> spp. e <i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae)  | polifaga                |                                |
| <i>M. explanatus</i><br>Reitter, 1900                  | Uzbekistan, SE Kazakistan, Turkmenistan, Siria   | Ambienti suberemici  | 200-1200 m   | <i>Crambe</i> spp. (Brassicaceae)  | oligofaga               | complesso<br><i>explanatus</i> |
| <i>M. accentus</i><br>Kirejtshuk, 1978                 | Tadjikistan  | Ambienti montani xerici  | 2000-2200 m  | sconosciute  | sconosciuto             |                                |

(\*) le lettere corrispondono alle cartine di distribuzione riportate in Appendice IV



Il quadro tassonomico del sottogruppo di *M. coracinus* è stato in passato soggetto a notevoli variazioni legate ad errori di identificazione e a differenti valutazioni sinonimiche di alcune specie ad esso attribuite, a causa di un'oggettiva difficoltà di orientamento tra le molteplici e differenti interpretazioni tassonomiche delle varie entità in qualche modo riconoscibili, ulteriormente aggravata dalle caratteristiche intrinseche dei taxa coinvolti: modeste dimensioni, aspetto d'insieme omogeneo, minute differenze esoscheletriche ed ampia variabilità nei livelli di specializzazione trofica. Inoltre la scoperta negli ultimi anni di alcune nuove probabili *sibling species* ha reso necessarie periodiche rielaborazioni, ed una continua messa in discussione del quadro tassonomico.

Nonostante tali difficoltà, grazie soprattutto agli studi specialistici di Jelínek (1981, 1997), Audisio (1976a, 1976b, 1976c, 1977a, 1977b, 1978, 1983, 1986, 1988, 1993a, 1993b), Spornraft (1967, 1987, 1992), Audisio & Spornraft (1990) e Kirejtshuk (1987), negli ultimi trent'anni le conoscenze sistematiche e nomenclatoriali relative al gruppo di specie di *M. aeneus*, cui il sottogruppo di *Meligethes coracinus* fa parte, sono state migliorate, con allestimento di chiavi per il riconoscimento delle specie note, descrizione di nuove entità, nuovi dati sulla loro distribuzione geografica e sulle loro associazioni con le piante ospiti.

Inoltre, una serie di contributi circoscritti al solo sottogruppo-*coracinus* ha migliorato e chiarito sostanzialmente il quadro tassonomico delle specie coinvolte (Audisio & Spornraft, 1990; Audisio, 1993a; Antonini, 1999; Audisio *et al.*, 2001a, 2001b, 2002; De Biase, 2000; Audisio *et al.*, 2003; Audisio *et al.*, 2006). In particolare, nuovi dati sono pervenuti da un approccio multimetodo che ha utilizzato cinque diverse e indipendenti serie di dati: sono state effettuate raccolte sul campo al fine di ottenere un'accurata caratterizzazione del materiale di studio sotto il profilo bionomico; questi dati di campo sono stati quindi integrati con altri provenienti da diverse collezioni museologiche. Mediante l'uso del S.E.M. (Microscopio Elettronico a Scansione) si sono potuti evidenziare particolari caratteri, difficili o impossibili da esaminare con la microscopia ottica. Tecniche di analisi multivariata applicata a studi biometrici hanno permesso di studiare in dettaglio i caratteri esoscheletrici e gli apparati genitali (Antonini, 1999; Audisio *et al.*, 2001b). Va detto, tuttavia, che non è stato possibile effettuare alcuna analisi cladistica sulla base dei caratteri morfologici studiati, in quanto la maggior parte di quelli distintivi mostra un tipico andamento quantitativo lungo una sorta di *continuum* morfometrico, che mal si presta alla codifica necessaria per questo tipo di analisi, dove si privilegiano di norma caratteri di tipo meristico, o comunque con stati discreti.

Attraverso l'elettroforesi dei sistemi gene-enzima sono stati poi condotti i primi studi sulla variabilità genetica in relazione all'ampiezza di nicchia trofica, ed effettuate delle stime di

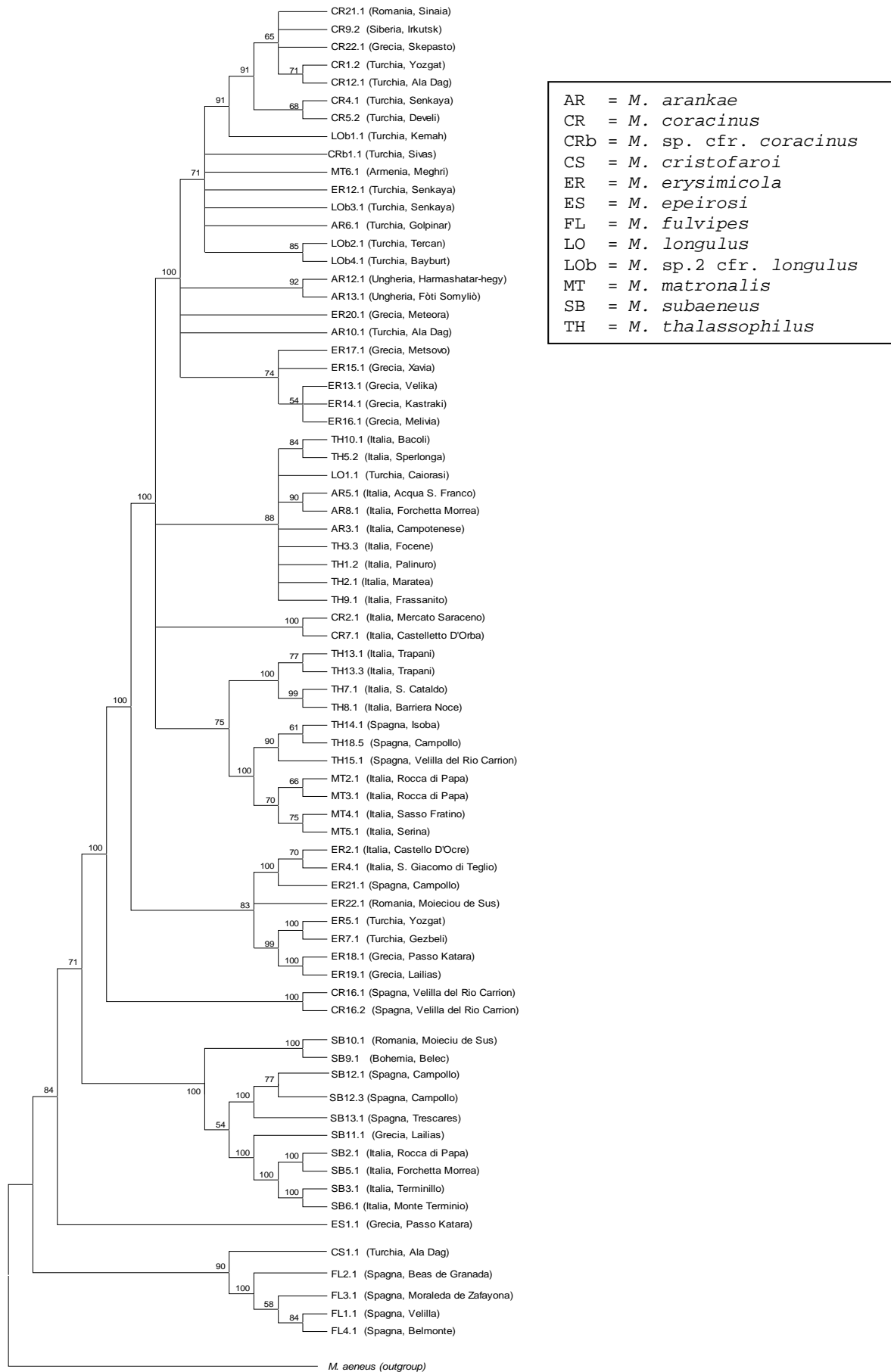
differenziamento genetico di popolazioni appartenenti ad alcune delle specie prese in esame (De Biase, 2000; Audisio *et al.*, 2002).

Negli ultimi cinque anni le relazioni evolutive tra le specie e “morfospecie” del sottogruppo di *M. coracinus* sono state analizzate mediante il confronto di sequenze nucleotidiche di marcatori mitocondriali (citocromo C subunità I [COI] e II, [COII]) e nucleari ribosomiali (secondo spaziatore trascritto interno [ITS2]), largamente utilizzati per la ricostruzione di relazioni evolutive tra taxa molto affini (Antonini, 2004; Audisio *et al.*, 2005a; Audisio *et al.*, 2005b; Audisio *et al.*, 2006). Tra i marcatori utilizzati per le ricostruzioni filogenetiche, l’ITS2 si è rivelato del tutto inadeguato per risolvere i rapporti tra la maggior parte delle specie studiate, a parte il caso di quelle manifestamente isolate ed in posizione filogeneticamente basale. La base dei dati relativa ai geni mitocondriali, e in particolare quella proveniente dal gene della COI su cui è stato condotto uno studio più completo (comprendente, cioè, un maggior numero di campioni), ha mostrato invece un segnale filogenetico sufficientemente capace di risolvere le relazioni di parentela almeno per le specie a probabile differenziamento pliocenico o del basso Pleistocene, ma ha fornito nello stesso tempo dei risultati particolarmente difficili da interpretare e, in molti casi, fortemente contrastanti con le conoscenze morfologiche ed ecologiche ad oggi disponibili sulle specie esaminate. In particolare, nel caso di molte specie ben identificabili morfologicamente, i campioni di varia provenienza geografica analizzati per un singolo taxon, invece di raggrupparsi in modo univoco in un clade omogeneo e mostrare quindi un basso livello di divergenza genetica - come ci si attende dal confronto di esemplari attribuibili morfologicamente allo stesso taxon - si posizionano spesso in cladi anche molto distanti tra loro, all’interno dei quali sono compresi esemplari attribuibili a taxa nettamente distinti dal punto di vista morfologico ma sorprendentemente, in molti casi, di simile o di identica provenienza geografica (*figura 2*).

Sono state quindi avanzate alcune ipotesi per tentare di conciliare l’insieme dei risultati ottenuti e per cercare di risolvere le apparenti contraddizioni che scaturiscono dal confronto delle interpretazioni tassonomiche derivanti dall’analisi di uno solo dei diversi insiemi di caratteri di natura morfologica, ecologica e molecolare. E’ stata così ipotizzata, in prima istanza, l’eventuale esistenza per alcune linee filetiche di polimorfismi genetici ancestrali ancora condivisi (ovvero, geni o varianti alleliche di un antenato comune ancora oggi presenti nei suoi diretti discendenti; Pamilo & Nei, 1988; Avise, 1994), una condizione che può presentarsi a causa di eventi di *incomplete lineage sorting* che si manifestano nel caso di discrepanze tra i tempi di divergenza del marcatore (numero di mutazioni accumulate nell’unità di tempo) e i tempi di speciazione dei taxa analizzati. Il

risultato di un simile evento è che alcuni polimorfismi ereditati da un antenato comune possono presentarsi immutati nelle linee filetiche derivate. Questo evento ha come conseguenza che i rappresentanti di specie ben distinte a livello tassonomico possono risultare, in un'analisi filogenetica molecolare, riuniti all'interno dello stesso clade per il fatto che il marcatore genetico utilizzato possiede un tasso di evoluzione “troppo lento” rispetto alla velocità di speciazione dei taxa in esame.

Altre interpretazioni proposte fanno invece riferimento all'evenienza in tempi passati di fenomeni di ibridazione interspecifica, all'effettiva esistenza in alcuni casi di vere *sibling-species* non distinguibili morfologicamente o ad una differente velocità evolutiva tra i caratteri morfologici e molecolari.



**Figura 2 – Sottogruppo di *M. coracinus*: albero filogenetico di consenso (50% majority rule) ottenuto mediante bootstrap su NJ per le sequenze di COI (indici di bootstrap riportati sopra i nodi)**

**Figure 2 – *M. coracinus* subgroup: NJ 50% bootstrap consensus tree for COI sequences (bootstrap values on nodes)**

## 1.1 Obiettivi

Come già introdotto, gran parte delle specie appartenenti al sottogruppo di *M. coracinus* sono estremamente simili a livello morfologico, tanto da differenziarsi, in alcuni casi, solo in base a pochi caratteri esoscheletrici molto minuti, ma, inequivocabilmente, sulla base di alcune caratteristiche relative agli organi genitali maschili e femminili. Le analisi filogenetiche condotte finora mediante l'utilizzo di diversi marcatori molecolari hanno fornito un quadro evolutivo molto complesso e difficilmente conciliabile con le conoscenze bionomiche e morfologiche del sottogruppo. La problematicità di queste ricostruzioni filogenetiche potrebbe essere collegata ai fenomeni microevolutivi già accennati nell'introduzione (eventi di *incomplete lineage sorting*, fenomeni di ibridazione interspecifica, presenza di vere *sibling-species* non discriminabili morfologicamente, differenze nell'evoluzione dei caratteri morfologici e molecolari) o ad una interazione a reticolo di questi eventi.

In generale, l'incongruenza di una ricostruzione filogenetica proveniente dall'analisi di dati molecolari rispetto ad un quadro filogenetico suggerito da evidenze di altra natura (morfologica e/o ecologica) può essere dovuta sia a *fattori stocastici*, ricollegabili cioè ad una inadeguatezza dei dati molecolari e/o dei metodi utilizzati ai fini di una ricostruzione filogenetica, sia a *fattori biologici* riconducibili, invece, a reali processi biologici, come, ad esempio, la perdita o l'acquisizione in alcune popolazioni conspecifiche di particolari alleli o lo scambio di materiale genetico per ibridazione tra esemplari di differenti specie (Nakhleh *et al.*, 2005). Nel caso in cui si voglia tentare di riconciliare le evidenze molecolari con quelle morfologiche ed ecologiche, occorre in primo luogo valutare l'entità dei fattori stocastici e, per quanto possibile, tentare di eliminare l'influenza di tali fattori nei successivi studi di filogenesi molecolare (Nakhleh *et al.*, 2005).

Come già detto, nel caso delle ricostruzioni filogenetiche effettuate per il sottogruppo di *M. coracinus*, una delle ipotesi di incongruenza tra i dati molecolari e morfologici fa riferimento alla possibile esistenza di polimorfismi genetici ancestrali condivisi tra le specie a causa di fenomeni di *incomplete lineage sorting* dei marcatori utilizzati (COI, COII, ITS2), aventi, probabilmente, un tasso evolutivo troppo lento rispetto alla velocità di speciazione del sottogruppo.

Questo lavoro si è quindi preposto come obiettivo principale quello di chiarire le relazioni evolutive tra i taxa del sottogruppo di *M. coracinus* tentando di eliminare l'influenza di un possibile fattore stocastico corrispondente alla scelta di un marcatore con un tasso di sostituzione non adeguato per

risolvere le relazioni evolutive tra i taxa in esame. Si è tentato quindi di ricostruire la filogenesi del sottogruppo-*coracinus* utilizzando come marcatore molecolare la Regione di Controllo del DNA mitocondriale.

E' noto infatti che la Regione di Controllo del DNA mitocondriale negli insetti presenta generalmente un elevato tasso di evoluzione, sia in termini di sostituzioni nucleotidiche, sia in termini di inserzioni e delezioni (Moritz *et al.*, 1987), sebbene per alcuni gruppi di insetti esistano delle eccezioni al riguardo (Zhang & Hewitt, 1997). La Regione di Controllo è stata utilizzata come marcatore genetico per studi di genetica di popolazione o per analisi filogenetiche tra taxa molto affini (McMillan & Palumbi, 1997; Rüber *et al.*, 2001). La variabilità di questo marcatore a vari livelli tassonomici è stata esaminata in particolare in alcuni coleotteri crisomelidi, ed una porzione di questa Regione è stata utilizzata come marcatore molecolare in studi di filogeografia e di genetica di popolazione (Mardulyn, 2001; Mardulyn *et al.*, 2005).

Un confronto tra i risultati di uno studio così condotto con quelli delle precedenti ricostruzioni filogenetiche molecolari dovrebbe consentire di chiarire secondo quale misura le incongruenze tra i dati genetici e quelli morfologici-ecologici ad oggi disponibili siano effettivamente da attribuire ad una scelta inadeguata dei marcatori molecolari e di mettere meglio in luce, di conseguenza, i possibili “fattori biologici” alla base dell’evoluzione del sottogruppo-*coracinus*. Inoltre, i dati provenienti dal sequenziamento e dall’analisi della variabilità della Regione di Controllo in un nuovo taxon costituiranno senz’altro un importante contributo sia per quanto riguarda la conoscenza delle caratteristiche molecolari di questa porzione non codificante del DNA mitocondriale (ad oggi ancora molto limitata per gli insetti), sia per quanto concerne le potenzialità del suo utilizzo come marcatore per studi evolutivi negli insetti, un tema che rimane tuttora controverso (Zhang & Hewitt, 1997; Vila & Björklund, 2004).

I risultati ottenuti, interpretati ed inquadrati alla luce delle differenti teorie sui rapporti evolutivi tra insetti fitofagi e piante ospiti, potranno essere infine utili alla comprensione di fenomeni più generali, quali la sequenza dei fenomeni speciativi, la polarità degli eventi di specializzazione delle nicchie trofiche larvali, l’eventuale coevoluzione o evoluzione sequenziale tra coleotteri fitofagi e piante ospiti.

## 1.2 Conoscenze sistematiche ed ecologiche sulle specie del sottogruppo di

### *Meligethes coracinus*

Per meglio collocare sistematicamente il sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus* Sturm, 1845, è opportuno fornire un inquadramento tassonomico generale sulla famiglia dei Nitidulidae, sul genere *Meligethes* e sul gruppo di specie di *Meligethes aeneus*.

#### 1.2.1 Famiglia Nitidulidae

La famiglia Nitidulidae appartiene, insieme ai Kateretidae, ai Cybocephalidae e agli Smicripidae, alla superfamiglia Nitiduloidea. L'analisi del complessivo insieme di caratteri manifestati da larve e adulti di un grande numero di specie appartenenti all'intera superfamiglia dei Nitiduloidea, ha ormai suggerito con una certa evidenza (Audisio, 1993a) come essa rappresenti un ceppo piuttosto isolato nell'ambito dei Coleoptera Polyphaga (Crowson, 1955). Questo taxon dovrebbe quindi rappresentare il probabile *sister-group* di almeno una parte della non ancora omogenea superfamiglia Cucujioidea, come intesa da Lawrence (1982) (=Clavicornia sensu Crowson, 1955).

La famiglia Nitidulidae è attualmente suddivisa in Calonecrinae, Carpophilinae, Epuraeinae, Mystropinae, Meligethinae, Cillaeinae, Nitidulidinae, Cryptarchinae e Maynipeplinae.

Il genere *Meligethes* (Coleoptera, Nitidulidae) fa parte della sottofamiglia Meligethinae; questa comprende anche i generi *Pria* Stephens, *Meligethinus* Grouvelle, *Microporum* C.O. Waterhouse, *Metapria* Grouvelle, *Cyclogethes* Kirejtshuk, *Kabakovia* Kirejtshuk, *Anthystrix* Kirejtshuk & Easton, *Chryptarchopria* Jelínek e *Ekubania* Jelinek.

#### 1.2.2 Cenni su biologia ed etologia

Il regime trofico dei Nitidulidae è quanto mai variato; nonostante ciò, per sommi capi, si può comunque individuare un primo raggruppamento, senz'altro il più vasto ed eterogeneo, comprendente generi fitosaprofagi (in prevalenza intertropicali), ed un secondo di generi antofagi a livello preimaginale e in larga misura anche immaginale, comprendente tutte le Meligethinae, tutti i rappresentanti neotropicali del così detto "*Mystrops-complex*", e poche specie di alcuni generi tropicali di Carpophilinae e di Cillaeinae. In ogni modo, quasi solo nelle Meligethinae e nel "*Mystrops-complex*" si assiste a marcati fenomeni di specializzazione che portano gli stadi larvali della maggior parte delle specie ad essere strettamente associati agli organi fiorali (polline, stami, antere) di una sola specie vegetale o al massimo di pochi generi strettamente affini. Non mancano infine casi di micetofagia, fitosaprofagia, carprofagia, fillofagia e melittofagia o addirittura di zoosaprofagia, di regolare mirmecofilia o termitofilia più o meno specializzata.

La sex ratio è di norma di 1:1 nella quasi totalità delle specie.

I cicli biologici dei Nitidulidae sono di norma relativamente semplici: lo sviluppo, nella gran parte delle specie, avviene attraverso 3 stadi larvali, ma la variabilità da genere a genere e da specie a specie nella durata del ciclo stesso e nelle modalità di impupamento è molto grande, e per tale ragione non è facile fare in proposito delle generalizzazioni. Per sommi capi si può dire che le specie fitofaghe presentano di norma cicli monovoltini (per lo più primaverili-estivi) o bivoltini (primaverili ed autunnali alle nostre latitudini), frequentemente con parziale sovrapposizione dei cicli stessi nei periodi favorevoli. Analoghe abitudini presentano anche molte specie micetofaghe più specializzate, mentre le specie fitosaprofaghe e zoosaprofaghe meno specializzate (perlopiù Carpophilinae, Nitidulinae, Cillaeinae e alcune Cryptarchinae) presentano cicli polivoltini soprattutto in aree tropicali, ma anche nei settori più meridionali dell'Europa, del Mediterraneo e dell'Italia.

Anche dal punto di vista etologico è difficile tentare una generalizzazione; si tratta perlopiù di coleotteri dotati di scarsa agilità, con l'esclusione di alcune Meligethinae - soprattutto alcuni *Meligethes* del gruppo di *M. aeneus* (Fabricius) - e di molte Carpophilinae, molto attive almeno in presenza di forte irraggiamento solare.

La copula è solitamente molto semplice, dorsale in tutti i gruppi, talvolta di lunga durata, spesso preceduta da semplici e brevi atteggiamenti di antennazione.

I Nitidulidae si possono realisticamente definire come un gruppo presente ovunque, dalla tundra artica alle foreste tropicali pluviali, caratteristica che li rende fra l'altro particolarmente adatti per analisi biogeografiche di aree estese ed ecologicamente diversificate.

### **1.2.3 Sottofamiglia Meligethinae**

Le Meligethinae contano circa 700 specie distribuite prevalentemente nella Regione Palearctica, in quella Afrotropicale e nel Subcontinente Indiano, con relativamente marginali presenze nel resto della regione Orientale, in quella Neartica e in Australasia. Tutte le specie di questa sottofamiglia di cui siano note le esigenze ecologiche sono, senza eccezioni, strettamente antofaghe e più o meno specializzate sia allo stadio larvale che imaginale. Alcuni generi, soprattutto tropicali e subtropicali, sono legati alle spate di Monocotiledoni della famiglia Arecaceae (= Palmae), mentre la maggior parte delle specie, perlopiù appartenenti al genere *Meligethes* Stephens, sono strettamente legate a fiori ed infiorescenze di molte famiglie di Angiosperme Dicotiledoni, di cui le larve si nutrono.



#### 1.2.4 Il genere *Meligethes* Stephens, 1830

Come accennato precedentemente, questo genere comprende circa 600 specie, per la maggior parte distribuite nelle Regioni Palearctica (soprattutto nelle aree euro-mediterranee s.l.), Orientale (in particolare nella sottoregione Indiana) ed Afrotropicale.

Tutti i *Meligethes* oloartici la cui biologia sia nota sono antofagi specializzati, legati strettamente a parti fiorali (nettari, antere, stami e petali) di Angiosperme Dicotyledones, a spese delle quali le larve si alimentano attraverso due stadi. Con una sola possibile eccezione (*M. aeneus*, Fabricius) tra le specie oloartiche, ciascun *Meligethes* è legato a una o poche specie affini di vegetali ospiti, o al massimo a differenti generi, sempre nell'ambito di una medesima famiglia. E' inoltre importante evidenziare l'esistenza di un'eccellente corrispondenza tra gruppi di specie e la dipendenza, almeno allo stadio larvale, da piante di una medesima famiglia. Molte specie sono strettamente monofaghe allo stadio larvale; gli adulti sono al contrario più o meno ampiamente polifagi, almeno nei periodi precedenti o seguenti l'antesi delle rispettive piante ospiti larvali.

Tra i *Meligethes* oloartici, le famiglie vegetali attaccate sono, in ordine di importanza, le Lamiaceae, le Brassicaceae, le Boraginaceae, le Fabaceae, le Rosaceae, le Cistaceae e le Campanulaceae.

#### 1.2.5 Il gruppo di *Meligethes aeneus* (Fabricius, 1787)

Il gruppo, il più numeroso del genere nell'ambito paleartico dopo quello di *M. difficilis* Heer, include una quarantina di specie relativamente omogenee in termini di caratteristiche esoscheletriche. Tutte le specie sono caratterizzate da corpo subdepresso o poco convesso, margine anteriore del clipeo troncato in linea retta, terzo antennumero molto allungato, angoli posteriori del pronoto retti o appena ottusi, quasi sempre molto distinti, protibie piuttosto lunghe e strette, solo molto finemente e piuttosto omogeneamente denticolate lungo buona parte del margine esterno. Per quanto riguarda i caratteri degli apparati genitali maschili, tutte le specie del gruppo presentano un tegmen con più o meno larga e profonda incisione a "V"; mentre nelle femmine gli ovopositori sono di norma larghi e triangolari, con distinti stili subdistali.

Questo gruppo risulta piuttosto isolato rispetto agli altri gruppi palearatici (forse è più affine a quello di *M. atratus* Olivier, che include specie associate a Rosaceae), ma con strette affinità con il gruppo Afrotropicale di *M. sjoestedti* Grouvelle (che include specie associate ad Asteraceae). Tranne la già menzionata possibile eccezione di *M. aeneus* Fabricius, che in Nord America può svilupparsi anche su alcune specie di Capparaceae (ma potrebbe trattarsi di popolazioni attribuibili ad una specie biologica distinta, endemica dei settori occidentali degli Stati Uniti), tutti i *Meligethes* di questo gruppo sono legati a Brassicaceae per il loro sviluppo larvale. Brassicaceae e Capparaceae sono state peraltro riunite recentemente in un'unica famiglia (Judd *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 2002)

condividendo, fra l'altro, larga parte dei loro metaboliti secondari (essenzialmente glicosidi), alcuni dei quali sono di norma utilizzati dagli insetti fitofagi specializzati per il riconoscimento e la ricerca delle piante ospiti.

All'interno del gruppo di *M. aeneus* Fabricius si possono riconoscere alcuni sottogruppi e una serie di complessi di specie. Per ogni sottogruppo e complesso vengono qui di seguito elencate le specie finora descritte o note:

### **1. Complesso di *M. viridescens***

*M. viridescens* (Fabricius, 1787). Europa, Nord Africa ed aree turaniche.

*M. czwalinai* Reitter, 1871. Europa centro-meridionale.

*M. lunariae* Audisio & De Biase, 1999. Italia centro-meridionale, Peloponneso.

### **2. Complesso di *M. simplipes***

*M. simplipes* Easton, 1947. Stati Uniti.

*M. prometheus* Jelínek, 1982. Turchia settentrionale e Caucaso.

### **3. Complesso di *M. aeneus***

*M. aeneus* (Fabricius, 1775). Europa, Africa settentrionale, Asia centrale, Siberia, Stati Uniti (settori occidentali) e Messico (settori Nord-occidentali).

*M. cleominis* Easton, 1959. Stati Uniti e Canada (settori occidentali).

*M. gracilis* C. Brisout de Barneville, 1863. Europa sud occidentale.

*M. affinis* Jelínek, 1982. Cina.

*M. audisioi* Jelínek, 1997. Cina.

*M. salvan* Audisio, De Biase & Antonini, 2003. Sud Europa (Alpi Marittime).

*M. humerosus* Reitter, 1871. Europa centrale.

### **4. *Meligethes haroldi* Reitter, 1877. Siberia orientale e Giappone.**

**[Sottogruppo di *M. coracinus*]**

**5. Complesso di *M. coracinus***

*M. coracinus* Sturm, 1845. Europa, Anatolia, Asia orientale, Siberia.

*M. erysimicola* Audisio & De Biase, 2001. Europa, Anatolia.

**6. Complesso di *M. longulus***

*M. longulus* Schilsky, 1894. Sud Europa, Anatolia, Caucaso.

*M. arankae* Audisio & De Biase, 2005. Europa sud-orientale, Caucaso.

*M. thalassophilus* Audisio & De Biase, 2005. Europa sud-occidentale.

**7. Complesso di *M. subaeneus***

*M. subaeneus* Sturm, 1845. Europa, Caucaso.

*M. matronalis* Audisio & Spornraft, 1990. Europa, Caucaso.

*M. epeirosi* Audisio, Mancini & De Biase, 2006. Grecia settentrionale.

**8. Complesso di *M. fulvipes***

*M. fulvipes* C. Brisout de Barneville, 1863. Europa occidentale, Nord Africa.

*M. cristofaroi* Audisio & De Biase, 2003. Turchia meridionale.

**9. Complesso di *M. explanatus***

*M. explanatus* Reitter, 1900. Asia Centrale, Siria.

*M. accentus* Kirejtshuk, 1978. Asia Centrale (Tadjikistan).

**[Sottogruppo di *M. coeruleovirens*]**

**10. Complesso di *M. anthracinus***

*M. anthracinus* C. Brisout de Barneville, 1863. Europa meridionale ed aree turaniche.

*M. primoriensis* Kirejtshuk, 1987. Siberia orientale.

*M. reitteri* Schilsky, 1894. Europa meridionale, Turchia e Siberia orientale.

**11. Complesso di *M. coeruleovirens***

*M. coeruleovirens* Förster, 1849. Europa centrale e settentrionale.

*M. spornrafti* Audisio, 1977. Italia e Serbia.

*M. praetermissus* Easton, 1957. Siberia orientale, Cina Nord-orientale e Giappone.

*M. sp. n. cfr. praetermissus*. Cina Sud-orientale.

**12. Complesso di *M. simplex***

*M. simplex* Kraatz, 1858. Grecia meridionale.

*M. bithynicus* Audisio, 1988. Turchia settentrionale.

**13. Complesso di *M. squamosus***

*M. squamosus* Jelínek & Marek, 1966. Bulgaria.

*M. carpathicus* Audisio, Jelínek & Stevanovic, 1999. Romania (Carpazi meridionali).

*M. armeniacus* Audisio, Jelínek & Stevanovic, 1999. Turchia settentrionale e Caucaso.

*M. mirae* Audisio, Jelínek & Stevanovic, 1999. Montenegro.

### **1.3 Status tassonomico ed evolutivo del sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus* Sturm, 1845**

Come già accennato, l'analisi dell'insieme dei dati disponibili ha evidenziato numerose difficoltà interpretative sullo *status* tassonomico del sottogruppo di specie di *M. coracinus*. Si è reso quindi necessario affrontare un esame critico dell'intero insieme di dati, allo scopo di fornire delle chiavi di lettura che potessero aiutare a comprendere quale dei vari fenomeni possibili siano alla base delle discrepanze tra le evidenze molecolari e i dati di tipo morfologico ed ecologico, focalizzando un quadro di riferimento peculiare per ciascuna specie e morfospécie del sottogruppo.

Il “conflitto” tra le evidenze filogenetiche suggerite dai dati molecolari e il quadro delle relazioni evolutive dedotto su base morfologica ed ecologica potrebbe teoricamente essere originato dalla combinazione di una serie di eventi, tra cui a) una convergenza o parallelismo dei caratteri morfologici ed ecologici; b) un certo livello di omoplasia nei dati di sequenza; c) tassi evolutivi dei caratteri di natura molecolare, morfologica ed ecologica molto differenti, indipendenti ed “allometrici”, associati a locali e veloci *shift* di nicchia trofica con l'acquisizione di nuove e isolate piante ospiti larvali; d) possibili fenomeni di introgressione e di ibridazione avvenuti nel passato tra popolazioni di specie affini; e) problemi legati a fenomeni di “*lineage sorting*”, ovvero alla possibile presenza di aplotipi ancestrali condivisi tra specie, con la possibilità dell'eventuale presenza di aplotipi multipli all'interno della stessa linea evolutiva o di uno stesso aplotipo all'interno di linee evolutive molto differenti (occorre sottolineare, infatti, che un'ampia diffusione geografica di alcuni aplotipi di DNA mitocondriale in alcune popolazioni potrebbe mascherare la realtà biologica che queste stesse siano effettivamente attribuibili alla stessa specie, mentre, al contrario, la presenza di aplotipi sostanzialmente identici in organismi morfologicamente ed ecologicamente ben distinti non implica affatto che essi appartengano effettivamente alla stessa specie); f) la potenziale esistenza di “vere” specie criptiche morfologicamente indistinguibili; g) la non-indipendenza di alcuni dei caratteri analizzati.

E' verosimile che alcuni, se non la totalità degli eventi sopra elencati possano essersi verificati contemporaneamente durante l'evoluzione, comunque recente, del sottogruppo di *M. coracinus* nelle Aree Euro-mediterranee e in quelle dell'Asia Occidentale, e potrebbero quindi essere la causa principale delle difficoltà interpretative dell'insieme dei dati.

Sulla base di queste considerazioni si è tentato di ricostruire, indipendentemente per ciascuna delle linee filetiche identificate su base morfologica, uno scenario evolutivo quanto più verosimile considerando tutti gli aspetti sopra elencati come possibili cause dell'evoluzione di ciascun taxon, per tentare di trovare un “accordo” tra i dati morfologici e le evidenze evolutive suggerite dai dati

molecolari. Questo processo di “ripartizione del problema” e di analisi “taxon per taxon” ha permesso finora di avanzare delle ipotesi, tenendo in considerazione tutti i dati finora disponibili, riguardo la storia evolutiva dell’intero sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus* durante gli ultimi due - tre milioni di anni (per gli ipotetici scenari evolutivi che vengono di seguito discussi per ciascun taxon, per quanto riguarda il dato genetico - se non altrimenti specificato - si può fare sostanzialmente riferimento all’albero filogenetico molecolare ottenuto dall’analisi del marcatore della COI riportato in *figura 2*)

### **Complesso di *Meligethes subaeneus***

- *Meligethes subaeneus*: questa specie, distribuita in gran parte dell'Europa, dalla Penisola Iberica al Caucaso settentrionale (Appendice IV, h), occupa verosimilmente una posizione basale rispetto al sottogruppo di *M. coracinus*, come risulta da tutte le analisi condotte sui dati di sequenza provenienti dai geni mitocondriali. L’insieme dei dati morfologici, ecologici e molecolari suggerisce che questa specie sia suddivisa in tre principali gruppi di popolazioni europee: un primo gruppo distribuito nelle Aree cantabriche della Penisola Iberica e associato a *Sysimbrium irio* (Sisymbrieae), il secondo gruppo diffuso nell’Europa centrale e meridionale, dai Pirenei fino al Caucaso settentrionale e associato a *Cardamine* spp. (Arabideae), e il terzo gruppo presente nell’Europa sud-orientale e centro-orientale, associato a *Cardaminopsis* spp. (Arabideae). Le popolazioni delle aree Cantabriche, oltre alla particolare associazione trofica con *Sysimbrium irio*, presentano un moderato grado di differenziazione morfologica e cromatica rispetto al resto delle popolazioni europee di *M. subaeneus*; queste caratteristiche peculiari lasciano supporre che tali popolazioni possano effettivamente rappresentare un taxon distinto: probabilmente a seguito dei cicli glaciali pleistocenici l’isolamento delle popolazioni europee di *M. subaeneus* in differenti aree rifugiali dell’Europa meridionale (Aree iberiche, italiane e balcaniche; Hewitt, 1999), da un lato nelle aree cantabriche e, dall’altro nelle aree italiane, potrebbe aver favorito l’accumulo di differenziazioni morfologiche ed ecologiche a carico di questi due gruppi di popolazioni tali da permetterne un’eventuale classificazione in *host-races* (secondo i criteri suggeriti da Drès & Mallet, 2002), o in specie distinte. Ad ogni modo, data la prevalente associazione per lo sviluppo larvale con piante della sottofamiglia delle Arabideae, è ragionevole supporre che le stesse Arabideae (in particolare i generi *Cardamine*, *Arabis*, *Barbarea*, o generi affini) rappresentino le piante ospiti ancestrali dell’intero sottogruppo di *M. coracinus*.

- *Meligethes epeirosi*: questa specie, scoperta solo di recente nelle aree montane nella Grecia settentrionale (Audisio *et al.*, 2006) (Appendice IV, l), e ascritta al complesso di *M. subaeneus*,

occupa anch'essa una posizione filogenetica basale. Infatti, escludendo i complessi ben distinti e isolati di *M. explanatus* e *M. fulvipes*, *M. epeirosi* rappresenta la linea più ancestrale alla base del clade che include il resto dei taxa compresi nel sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus*. La posizione basale di *M. epeirosi* e la sua stretta associazione trofica per lo sviluppo larvale con la rara *Cardamine* (s. str.) *glauca* della sottofamiglia delle Arabideae, rafforza l'ipotesi che le Arabideae possano, come già detto, effettivamente rappresentare le piante ospiti ancestrali dell'intero sottogruppo-*coracinus*.

- *Meligethes matronalis*: questa specie monofaga, associata alla pianta ospite *Hesperis matronalis*, è presente nella maggior parte dei paesi europei ed è distribuita dal nord della Spagna fino al Caucaso meridionale (Appendice IV, i). Anche questa specie si trova in una posizione filogenetica piuttosto isolata e basale, e presenta molte caratteristiche morfologiche comuni con *M. subaeneus*. *Meligethes matronalis* risulta tuttavia, dalle analisi molecolari condotte su geni mitocondriali e su allozimi (De Biase, 2000; Audisio *et al.*, 2001), più affine dal punto di vista genetico ad alcuni membri del complesso di *M. longulus*. Questa similarità genetica, fortemente in conflitto con le evidenze morfologiche, potrebbe essere interpretata supponendo che *M. matronalis* rappresenti un "elemento fondatore" del sottogruppo-*coracinus* e che quindi esso, portatore di molti caratteri morfologici ancestrali condivisi con la linea filetica di *M. subaeneus*, abbia subito in tempi passati uno *shift* di nicchia trofica dalle Arabideae verso le Hesperideae, acquisendo così l'attuale stretta associazione con la pianta ospite *Hesperis matronalis*. Questo scenario evolutivo è avvalorato anche dal fatto che *Hesperis matronalis* è sostanzialmente la sola specie vegetale della sottofamiglia delle Hesperideae che viva in ambienti ombreggiati e umidi, tipicamente occupati da membri della sottofamiglia delle Arabideae. Infatti, la maggior parte delle Hesperideae è associata generalmente ad habitat steppici o parasteppici in ambienti aridi rupestri, dove la maggior parte dei membri del sottogruppo di *M. coracinus* (eccetto *M. coracinus*) sono presenti in associazione con alcuni generi e specie di Hesperideae. Il diretto antenato di *M. matronalis* potrebbe dunque aver promosso una successiva radiazione sulle Hesperideae, dando luogo all'attuale diffusa associazione di numerosi elementi del sottogruppo di *M. coracinus* con questa sottofamiglia di Brassicaceae in ambienti rupestri e xerici. Uno scenario alternativo potrebbe prevedere eventi di ibridazione tra maschi di un membro ancestrale appartenente alla linea filetica *epeirosi-subaeneus* e femmine di un antenato di tipo-*coracinus* separatosi in tempi antecedenti. Questo evento avrebbe prodotto una prole fertile portatrice di DNA mitocondriale di tipo-*coracinus* (acquisito per eredità mitocondriale materna) che avrebbe poi sperimentato uno *shift* di nicchia trofica su *Hesperis matronalis* e sulle Hesperideae in genere. Come già accennato, anche

utilizzando geni nucleari ad elevato tasso evolutivo come l'ITS2, le sequenze ottenute risultano essere purtroppo quasi invariante all'interno delle linee filetiche *M. coracinus/subaeneus*, e al momento non sono quindi disponibili informazioni su eventuali differenze tra il segnale molecolare di geni nucleari e geni mitocondriali, utili per avvalorare l'eventualità di fenomeni di ibridazione. D'altra parte i risultati preliminari provenienti da un campionamento sostanzialmente casuale sull'intero genoma, come quelli relativi alle precedenti analisi su allozimi (De Biase, 2000; Audisio *et al.*, 2001) sono concordi con uno scenario che abbia coinvolto un'estesa introgressione di alleli da parte di una specie affine a *M. matronalis*, ma da essa ben distinta.

### **Complesso di *Meligethes coracinus***

- *M. coracinus*: questa specie, distribuita dalla Penisola Iberica settentrionale all'Asia Minore a Sud-Est, fino alla Mongolia e alla Siberia orientale a Nord-Est (Appendice IV, a), sulla base dei dati provenienti dalle analisi molecolari sulla COI risulta geneticamente frammentata, con raggruppamenti degli esemplari in *cluster* distinti che rispecchiano sostanzialmente la provenienza geografica dei campioni analizzati. In particolare, gli esemplari di *M. coracinus* originari della Spagna settentrionale occupano una posizione basale all'interno del clade che include tutte le specie del sottogruppo di *M. coracinus*, ad eccezione di *M. epeirosi*, *M. subaeneus* e *M. fulvipes*; gli esemplari italiani occupano invece una posizione "intermedia", ma abbastanza isolata rispetto agli individui dell'Europa centrale e meridionale, dell'Anatolia, del Caucaso e della Siberia; questi ultimi invece risultano molto più affini ai membri del complesso di *M. longulus* provenienti dalle stesse aree, pur essendo da questi morfologicamente molto distinti. *M. coracinus* risulta tuttavia morfologicamente omogeneo in tutto l'areale di distribuzione, a meno di una esigua variabilità riferibile solamente ad un moderato sviluppo allometrico di alcuni caratteri sessuali (Audisio *et al.*, 2001), presente tuttavia anche a livello dei membri di una stessa popolazione. Non esiste quindi alcuna differenziazione morfologica apprezzabile a livello geografico concordante con i dati genetici, e peraltro per tutti gli esemplari di *M. coracinus* risultano invariante una serie di caratteri esoscheletrici discriminanti (tra cui alcuni tratti caratteristici dell'edeago dei maschi) che ne permettono una facile identificazione e distinzione dagli esemplari di tutte le specie affini (Audisio *et al.*, 2005a). Da un punto di vista ecologico, gran parte delle popolazioni europee (provenienti da Spagna, Italia, Francia, Germania meridionale, ecc.) risultano sempre associate con piante appartenenti ai generi *Brassica* o *Sinapis*, mentre la quasi totalità delle popolazioni esaminate dell'Europa centro-orientale, così come quelle di Anatolia, Caucaso, e Siberia presentano un'associazione



trofica con il genere *Barbarea* in ambienti umidi, o con il genere *Sysimbrium* in ambienti rupestri e ombreggiati. Tuttavia, a questa differenziazione ecologica non sembra corrispondere un differenziamento morfologico o genetico, almeno sulla base dei dati di cui disponiamo relativi ad esemplari sintopici raccolti in Turchia orientale su *Barbarea* e su *Sysimbrium*: questi, infatti, malgrado il differente legame trofico con le piante ospiti, non presentano alcuna diversità né dal punto di vista morfologico, né tanto meno da quello genetico.

Si osserva invece una netta differenziazione genetica tra le popolazioni delle penisole sud-occidentali dell'Europa e un "gruppo orientale" di popolazioni: questo dato suggerisce la possibilità di un lungo isolamento tra i principali gruppi di popolazioni euro-asiatiche, avvenuto probabilmente in aree rifugiali pleistoceniche durante le glaciazioni. Anche in questo caso è verosimile che fenomeni di *lineage sorting* abbiano giocato un ruolo fondamentale, e che eventi indipendenti di questo tipo a livello geografico, che avrebbero coinvolto alcune popolazioni fondatrici di *M. coracinus*, poi ampiamente diffuse, abbiano potuto portare alla situazione attuale.

- *M. sp. 2* cfr. *coracinus*: si tratta di nuova specie forse associata alla pianta ospite *Arabis hirsuta* (L.) e fino ad ora nota solo di Turchia Nord-orientale nelle aree tra Sivas ed Erzurum (Appendice IV, c). Al di là di una relazione genetica stretta con esemplari di specie e morfospécie endemiche della Turchia orientale, contrapposta a differenze morfologiche ed ecologiche più o meno sostanziali rispetto a quest'ultime, le relazioni evolutive di questo taxon all'interno del sottogruppo non sono del tutto chiare.

- *M. erysimicola*: questa specie oligofaga, descritta morfologicamente e caratterizzata bionomicamente solo in tempi recentissimi (Audisio *et al.*, 2001b), è associata a numerose piante del genere *Erysimum* L. ed è distribuita in Europa meridionale dalla Penisola Iberica settentrionale fino all'Anatolia e all'Iran (Audisio *et al.*, 2000, 2001b) (Appendice IV, b). Gli esemplari esaminati di Romania, Spagna e Italia mostrano una stretta affinità genetica e occupano una posizione piuttosto basale rispetto a tutte le rimanenti specie del sottogruppo di *M. coracinus*. Un discorso a parte meritano invece gli esemplari provenienti da varie località della Grecia settentrionale e della Turchia, i quali presentano delle differenziazioni morfologiche, minute ma ben evidenti, rispetto agli individui del resto dell'Europa, e che risultano del tutto simili agli individui provenienti della Turchia orientale. Dal punto di vista genetico, tuttavia, solo una parte di questi esemplari si posiziona all'interno di un *cluster* relativamente isolato in cui è compreso anche l'unico individuo saggiato della Turchia orientale, mentre il resto degli esemplari risulta più affine geneticamente agli altri individui di provenienza europea. Questa situazione lascia supporre che per queste popolazioni vi siano dei

meccanismi di speciazione ancora in atto, in cui cioè la separazione di due specie incipienti risulta ancora incompleta. I risultati delle analisi filogenetiche molecolari condotte finora per questa specie potrebbero riflettere una classica situazione in cui il cosiddetto “*gene tree*”, ovvero le relazioni evolutive ricostruite mediante il marcatore molecolare prescelto - che raccontano di fatto la storia evolutiva del marcatore stesso - non corrispondano allo “*species tree*”, ossia alla storia evolutiva dei taxa esaminati, obiettivo ultimo di ogni ricostruzione filogenetica e che quindi esistano, per i geni analizzati, polimorfismi ancestrali ancora condivisi tra le due specie.

### **Complesso di *Meligethes longulus***

- *M. longulus*: questa specie è stata ritrovata soltanto di recente (Audisio *et al.*, 2005b) in ambienti suberemici terroso-rocciosi della Valle dell’Aras (Turchia orientale, Armenia ex sovietica, vedi Appendice IV, d). Gli individui raccolti risultano del tutto identici all’olotipo maschio di *M. longulus* descritto di "Araxestal" (= Valle dell’Aras, tra Turchia Orientale e Armenia, Schilsky, 1894). *M. longulus* è associato alla rarissima *Matthiola odoratissima* (Bieb.) R. Br. distribuita negli ambienti suberemici delle aree circumpontiche. Questa specie occupa una posizione filogenetica molto chiara all’interno del sottogruppo, mostrando una stretta affinità genetica con alcuni esemplari appartenenti alle specie *M. thalassophilus* e *M. arankae*.

- *M. thalassophilus*: si tratta di una specie ovest-mediterranea (Appendice IV, g) molto affine a *M. longulus*, ma facilmente distinguibile da quest’ultimo sulla base di una serie di caratteri discriminanti. *M. thalassophilus* è una specie associata a piante del genere vegetale *Matthiola* R. Br.: le popolazioni che vivono in ambienti dunali lungo le coste tirreniche dell’Italia occidentale e meridionale si trovano associate a *M. sinuata* (L.) R. Br., mentre altre popolazioni, probabilmente conspecifiche, sono legate ad ambienti rupestri delle aree costiere all’interno dello stesso ambito geografico e si trovano associate con *M. incana* ssp. *rupestris* (Rafin.) Nyman. Gli esemplari provenienti dalla Penisola Iberica settentrionale (Aree Cantabriche) e dalla Sicilia centrale mostrano invece delle significative differenze genetiche dalle popolazioni “tipiche” e sono associate a *M. fruticulosa* (L.) Maire e a *M. perennis* (P. Conti). L’insieme delle popolazioni delle aree del Mediterraneo occidentale rappresentano molto probabilmente la *sister species* allopatrica di *M. longulus*, come confermano anche i dati di distanza genetica basati sulle analisi di COI e COII. La posizione tassonomica invece delle popolazioni presenti nelle aree cantabriche della Spagna e in Sicilia è ancora incerta, data la loro consistente distanza genetica nei confronti delle popolazioni tirreniche, sebbene da queste ultime siano difficilmente o quasi per nulla distinguibili dal punto di vista morfologico.

- *M. arankae* : questa specie, associata a diverse specie vegetali del genere *Hesperis* L. (in particolare *H. laciniata* All., *H. tristis* L., *H. bicuspidata* (Willd.) Poiret, *H. pendula* DC.), è distribuita in Italia peninsulare, nelle aree Dinariche e Ponto-Pannoniche, e in Anatolia. *M. arankae* (Appendice IV, f) è molto affine a *M. longulus* della Turchia orientale, ma presenta caratteristiche morfologiche ben distinte. Le analisi filogenetiche molecolari hanno messo in evidenza una consistente diversità genetica di *M. arankae* dalle popolazioni turche, simpatriche e sintopiche, di *M. longulus*, mentre le popolazioni di *M. arankae* provenienti dalle aree montane dell'Italia centrale e meridionale mostrano una più stretta affinità genetica con le popolazioni di *M. thalassophilus* delle coste dell'Italia occidentale, piuttosto che con gli esemplari ungheresi di *M. arankae* e con gli esemplari apparentemente conspecifici della Turchia orientale, pur non mostrando rispetto a questi ultimi significative differenze morfologiche o ecologiche. Questa situazione è complicata dal fatto che le popolazioni italiane di *M. arankae* e di *M. thalassophilus*, ben differenziabili sia a livello morfologico che a livello ecologico, non mostrano livelli di differenziazione genetica apprezzabili: questi due taxa in queste aree sembrano corrispondere alla categoria di *host races* secondo i criteri recentemente stabiliti da Drès & Mallet (2002). Inoltre rimangono da chiarire le rispettive relazioni evolutive di entrambi i taxa con *M. longulus*.

- *M. sp. 1 cfr. longulus* : si tratta di una forma ritrovata in Tadjikistan, morfologicamente affine a *M. longulus*, di cui tuttavia è ignota la pianta ospite e il regime trofico, e di cui non si dispone attualmente di alcun dato ecologico e genetico.

- *M. sp. 2 cfr. longulus* : si tratta di una forma strettamente associata alla rara e localizzata *Tchihatchewia isatidea* Boiss (Brassicaceae, Lunarieae), distribuita almeno in Turchia orientale e in Armenia occidentale (Appendice IV, e). Così come per altri taxa di provenienza orientale le relazioni evolutive di questo taxon all'interno del sottogruppo non sono del tutto chiare, probabilmente a causa di una sovrapposizione di fenomeni di ibridazione interspecifica, condivisione di antichi polimorfismi nucleotidici e/o variazioni genetiche lungo un cline geografico.

### **Complesso di *Meligethes fulvipes***

- *Meligethes fulvipes*: è una specie piuttosto isolata e associata a diversi generi e specie vegetali (*Brassica*, *Sinapis*, e generi vicini) della famiglia delle Brassicaceae, distribuita in Europa occidentale e Nord Africa (Audisio, 1993a) (Appendice IV, n). Si distingue facilmente per i genitali maschili e femminili molto caratteristici. La posizione piuttosto isolata e basale di *M. fulvipes* all'interno del sottogruppo di *M. coracinus* viene confermata anche dalle analisi

filogenetiche molecolari. Questa specie potrebbe quindi essere considerata l'effettiva *sister-species* delle altre specie del sottogruppo.

- *Meligethes cristofaroi*: questa specie è stata scoperta solo negli ultimi anni nel Parco Nazionale dell'Ala Dag in Turchia sud-orientale (Audisio *et al.*, 2005b) (Appendice IV, m) e presenta come pianta ospite *Arabis* sp. cfr. *caucasica*. Malgrado il suo aspetto esteriore presenti delle similarità con quello di *M. simplex*, alcuni dettagli morfologici permettono di assegnare questa specie al sottogruppo di *M. coracinus*; in particolare alcuni caratteri dei genitali maschili sono confrontabili con quelli di *M. fulvipes*, seppure si tratti di due specie morfologicamente molto distinte. Le analisi filogenetiche molecolari condotte mediante il gene della COI confermano una posizione basale ed evidentemente isolata di questo taxon nei confronti del resto delle specie del sottogruppo di *M. coracinus*.

### **Complesso di *Meligethes explanatus***

Due specie sono incluse in questo complesso: *M. explanatus* è una specie piuttosto isolata associata al genere vegetale *Crambe* L. (dall'Asia minore al Deserto Siriano: Audisio *et al.*, 2000), e probabilmente molto prossima ad una seconda specie dell'Asia Centrale, *M. accentus* Kirejtshuk, 1978. *M. explanatus* e *M. accentus* differiscono fortemente dalle altre specie del sottogruppo per la forma del corpo appiattita e per i genitali maschili ampiamente distinti (Kirejtshuk, 1978). Finora le evidenze disponibili sono solamente di tipo morfologico ed ecologico.

## 2. MATERIALI

### 2.1 Scelta del materiale di studio

Per ogni taxon appartenente al sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus* sono stati selezionati da uno a tredici individui, in gran parte corrispondenti per numero e per provenienza geografica ai campioni già esaminati nelle analisi filogenetiche condotte con il marcatore mitocondriale COI. Di conseguenza, così come nel caso della COI, anche per la Regione di Controllo il grado di variabilità genetica intraspecifico è stato valutato, per quanto possibile, mediante un campionamento su ampia scala geografica, necessario al fine di evitare errori di interpretazione dei risultati delle analisi filogenetiche (Funk, 1999) dovuti, in caso di un limitato campionamento, ad una ridotta possibilità di individuare introgressioni di aplotipi causati da eventi di ibridazione interspecifica (Avise, 1994; Boyce *et al.*, 1994; Odorico & Miller, 1997; Futuyma, 1998) o polimorfismi ancestrali condivisi tra le specie (Neigel & Avise, 1986; Pamilo & Nei, 1988). Inoltre un campionamento così condotto permette di mettere in evidenza le variazioni clinali nella distribuzione dei caratteri genetici che si modificano in un *continuum* geografico in maniera più o meno graduale. La corrispondenza dei campioni analizzati con quelli già esaminati in precedenti analisi filogenetiche molecolari permette, infine, di mettere a confronto il grado di risoluzione del segnale filogenetico proveniente dalla Regione di Controllo con quello dei marcatori finora utilizzati, e, in particolare, con quello proveniente dal gene mitocondriale della Citocromo Ossidasi I (COI).

In alcuni casi, come per *M. sp. cfr. coracinus*, *M. longulus*, *M. epeirosi* e *M. cristofaroi*, si disponeva di un solo esemplare conservato per le analisi molecolari, mentre per *M. sp.1 cfr. longulus* non si disponeva di alcun campione. Per *M. explanatus* e *M. accentus* non è stato in alcun modo possibile ottenere del materiale opportunamente conservato per le analisi genetiche, poiché a causa delle locali situazioni politiche e logistiche non è stato possibile raccogliere materiale in Asia Centrale, area in cui sono distribuite entrambe le specie. Tuttavia, trovandosi *M. explanatus* e *M. accentus* presumibilmente in una posizione quanto mai isolata rispetto alle altre specie appartenenti al sottogruppo (si tratta infatti di taxa ben distinti per la forma del corpo appiattita e per i peculiari genitali maschili), non se ne rendeva strettamente necessario l'esame alla luce degli obiettivi prestabiliti. Per tutti gli esemplari di *M. subaeneus*, sebbene il materiale entomologico fosse disponibile, alcune difficoltà tecniche verificatesi durante le fasi di clonaggio (vedi oltre) e difficilmente superabili non hanno permesso di ottenere alcun dato di sequenza per questi campioni, così come per gli esemplari sottoposti ad analisi di *M. aeneus*, il taxon utilizzato come *outgroup* nei precedenti studi filogenetici molecolari. Le difficoltà tecniche relative alle fasi di clonaggio potrebbero essere legate a caratteristiche peculiari riguardanti la natura degli elementi ripetitivi o

degli omopolimeri presenti all'interno dei frammenti PCR ottenuti per questi campioni: è stato recentemente osservato, infatti, che la presenza di omopolimeri particolarmente lunghi o di numerosi elementi ripetitivi palindromici può annullare l'efficienza del clonaggio in cellule batteriche di *Escherichia coli*, rendendo necessario in alcuni casi l'utilizzo in alternativa di cellule di organismi eucarioti (ad esempio *Saccaromices cerevisiae*) (Ratray, 2004; Lewis *et al.*, 2005). Poiché la Regione di Controllo è un marcatore estremamente variabile, non è inverosimile che proprio per questi due taxa filogeneticamente molto isolati rispetto alle altre specie del sottogruppo possano essersi riscontrate difficoltà legate ad una peculiare struttura degli elementi ripetitivi o degli omopolimeri non incontrate, invece, per il clonaggio di altri campioni. Sarà dunque necessario in futuro accertarsi delle effettive problematiche legate a questi campioni e fare ricorso in caso a nuove metodologie molecolari al fine di clonare e sequenziare con successo la Regione di Controllo anche per esemplari appartenenti a questi taxa.

La *tabella 2* riporta gli esemplari appartenenti al sottogruppo di *M. coracinus* sui quali è stato condotto il presente studio tassonomico e filogenetico sulla base del marcatore molecolare Regione di Controllo.

**Tabella 2 – Individui del sottogruppo di specie di *M. coracinus* analizzati con il marcatore Regione di Controllo**

*Table 2 – Species and specimens analysed by means of mitochondrial Control Region*

| <b>Specie</b>                         | <b>Sigla</b>   | <b>Popolazione</b>   |
|---------------------------------------|----------------|--|
| <i>Meligethes sp. cfr. coracinus</i>  | <b>CRb1.1</b>  | TURCHIA (Sivas), 130 Km a Est di Yozgat, m 1350-1400, 12.05.1999                   |
| <i>Meligethes coracinus</i>           | <b>CR 1.2</b>  | TURCHIA (Sivas), 130 Km a E di Yozgat, m 1350-1400, 12.05.1999                     |
|                                       | <b>CR 2.1</b>  | ITALIA (Emilia Romagna), Mercato Saraceno (FO), m 150, 9.06.2001                   |
|                                       | <b>CR 7.1</b>  | ITALIA (Piemonte), Castelletto d'Orba (AL), m 300, 12.05.2002                      |
|                                       | <b>CR 9.2</b>  | SIBERIA (Turskaya) 30 Km NE Irkutsk, m 550, 4.07.2002                              |
|                                       | <b>CR 12.1</b> | TURCHIA, (Nidge) Ala-Dag National Park, m 1700, 9.05.2003                          |
|                                       | <b>CR 16.1</b> | SPAGNA (Cantabria), Velilla del Rio Carrion, m 800, 31.05.2003                     |
|                                       | <b>CR 16.2</b> | SPAGNA (Cantabria), Velilla del Rio Carrion, m 800, 31.05.2003                     |
|                                       | <b>CR 21.1</b> | ROMANIA (Prahova), pressi di Sinaia, 800 m, 25.05.2004                             |
|                                       | <b>CR 22.1</b> | GRECIA (Macedonia), dintorni di Skepato, 800 m, 31.05.2005                         |
| <i>Meligethes erysimicola</i>         | <b>ER 2.1</b>  | ITALIA (Abruzzo), Castello D'Ocre (AQ), m 850, 12.05.1998                          |
|                                       | <b>ER 4.1</b>  | ITALIA (Lombardia), S. Giacomo di Teglio (SO), m 260, 19.06.2000                   |
|                                       | <b>ER 5.1</b>  | TURCHIA (Sivas), 130 Km a Est di Yozgat, m 1350-1400, 12.05.1999                   |
|                                       | <b>ER 7.1</b>  | TURCHIA (Kayseri), Gezbeli Geçidi, m 1450, 7.05.2000                               |
|                                       | <b>ER 12.1</b> | TURCHIA (Senkaya), strada per Aksar, m 500, 6.05.2003                              |
|                                       | <b>ER 13.1</b> | GRECIA (Tessaglia), Velika, m 150, 15.04.2003                                      |
|                                       | <b>ER 14.1</b> | GRECIA (Tessaglia), Kastraki, m 150, 13.04.2003                                    |
|                                       | <b>ER 15.1</b> | GRECIA (Tessaglia), Monte Pelion, Passo a N. di Xavia, m 1500, 29.05.2005          |
|                                       | <b>ER 16.1</b> | GRECIA (Tessaglia), Monte Ossa, Melivia, m 500, 28.05.2005                         |
|                                       | <b>ER 17.1</b> | GRECIA (Epiro), Metsovo, m 750, 30.05.2005   |
|                                       | <b>ER 18.1</b> | GRECIA (Tessaglia), Passo Katara, m 1200, 30.05.2005                               |
|                                       | <b>ER 19.1</b> | GRECIA (Macedonia), tra Serres e Lailias, m 1500, 31.05.2005                       |
|                                       | <b>ER 20.1</b> | GRECIA (Tessaglia), Meteora (tra Kalambaka e Vlahava), m 800, 29.05.2005           |
| <i>Meligethes fulvipes</i>            | <b>FL 4.1</b>  | SPAGNA, (Cantabria), Belmonte, m 1000, 30.05.2003                                  |
| <i>Meligethes arankae</i>             | <b>AR 2.4</b>  | ITALIA (Calabria), Campotenese (CS), m 850, 11.04.2001 <i>deme 1</i>               |
|                                       | <b>AR 3.1</b>  | ITALIA (Calabria), Campotenese (CS), m 850, 11.04.2001 <i>deme 2</i>               |
|                                       | <b>AR 5.1</b>  | ITALIA (Abruzzo), Acqua S. Franco (AQ), m 1350, 20.05.2000                         |
|                                       | <b>AR 6.1</b>  | TURCHIA (Maras), Puren Geçidi, SE di Golpınar, m 1400, 7.05.2000                   |
|                                       | <b>AR 8.1</b>  | ITALIA (Abruzzo), Forchetta Morrea (AQ), m 1400, 22.05.2001                        |
|                                       | <b>AR 10.1</b> | TURCHIA (Nidge), Ala-Dag National Park, m 1700, 9.05.2003                          |
|                                       | <b>AR 12.1</b> | UNGHERIA (Budapest), Hármashátar-hegy, 7.05.2004                                   |
|                                       | <b>AR 13.1</b> | UNGHERIA (County Pest) Fót, Fóti Somlyó, m 1000, 19.05.2004                        |
| <i>Meligethes sp. 2 cfr. longulus</i> | <b>LOb 1.1</b> | TURCHIA (Erzincan), 20 Km a S di Kemah, m 1740, 10.05.2001                         |
|                                       | <b>LOb 2.1</b> | TURCHIA (Erzincan), 17 Km a N di Tercan, m 1800, 11.05.2000                        |
|                                       | <b>LOb 3.1</b> | TURCHIA (Erzurum), 4.3 Km prima di Senkaya, m 1754, 9.06.2001                      |
| <i>Meligethes matronalis</i>          | <b>MT 4.1</b>  | ITALIA (Emilia Romagna), La Lama, Sasso Fratino (FO), m 800, 19.06.2001            |
|                                       | <b>MT 5.1</b>  | ITALIA (Lombardia), Serina (BG), m 800, 17.06.2001                                 |
| <i>Meligethes thalassophilus</i>      | <b>TH 1.2</b>  | ITALIA (Campania), Palinuro (SA), Spiaggia di Caprioli, m 0, 10.04.2001            |
|                                       | <b>TH 3.3</b>  | ITALIA (Lazio), Focene (RM), m 0, 13.06.2001                                       |
|                                       | <b>TH 5.2</b>  | ITALIA (Lazio), Sperlonga (LT), Torre Capo Vento, m 30, 12.03.2002                 |
|                                       | <b>TH 5.3</b>  | ITALIA (Lazio), Sperlonga (LT), Torre Capo Vento, m 30, 12.03.2002                 |
|                                       | <b>TH 7.1</b>  | ITALIA (Sicilia), tra S. Caterina Villaerrosa e S. Cataldo (CL), m 600, 20.04.2002 |
|                                       | <b>TH 8.1</b>  | ITALIA (Sicilia), Barriera Noce (CL), m 700, 20.04.2002                            |
|                                       | <b>TH 9.1</b>  | ITALIA (Puglia), Frassanito (LE), 11 km N di Otranto, m 0, 26.07.2002              |
|                                       | <b>TH 10.1</b> | ITALIA (Campania), Baia di Bacoli (NA), m 10, 21.03.2003                           |
|                                       | <b>TH 13.1</b> | ITALIA (Sicilia) Riserva dello Zingaro (TP), m 50, 22.03.2003                      |
|                                       | <b>TH 13.3</b> | ITALIA (Sicilia) Riserva dello Zingaro (TP), m 50, 22.03.2003                      |
|                                       | <b>TH 14.1</b> | SPAGNA (Cantabria), Isoba, m 1500, 31.05.2003                                      |
|                                       | <b>TH 15.1</b> | SPAGNA (Cantabria), Velilla del Rio Carrion, m 800, 31.05.2003                     |
|                                       | <b>TH 18.5</b> | SPAGNA (Cantabria), Campollo, m. 650, 31.05.2003                                   |
| <i>Meligethes cristofaroi</i>         | <b>CS 1.1</b>  | TURCHIA (Nidge), Ala-Dag National Park, m 1700, 9.05.2003                          |
| <i>Meligethes longulus</i>            | <b>LO 1.1</b>  | TURCHIA (Aras Valley), presso Çaiarası, m 1400, 4.05.2003                          |
| <i>Meligethes epeirosi</i>            | <b>ES 1.1</b>  | GRECIA (Tessaglia), Passo Katara, m 1600, 30.05.2005                               |

Nota: a ciascun individuo è stato assegnato un codice di due lettere corrispondente alla sigla della specie seguito da due cifre: la prima cifra identifica la popolazione di origine, la seconda assegna un numero d'ordine all'individuo esaminato nell'ambito della popolazione di appartenenza

Nelle analisi filogenetiche precedentemente condotte utilizzando i marcatori COI, COII e ITS2, oltre ad esemplari appartenenti alle specie del sottogruppo di *M. coracinus*, sono stati saggiati anche alcuni individui di *Meligethes aeneus* Fabricius, 1775, una specie molto comune a distribuzione oloartica, ampiamente polifaga, in grado di svilupparsi su qualsiasi genere e specie della famiglia delle Brassicaceae e generalmente abbondante su specie coltivate dei generi *Brassica* e *Sinapis*. Come già accennato, in tali analisi *M. aeneus* è stato utilizzato come taxon di riferimento e confronto (*outgroup*) (figura 2).

Come già detto, nel caso della Regione di Controllo non è stato possibile ottenere alcuna sequenza per *M. aeneus*. In ogni caso, come verrà discusso in seguito, dal momento che le sequenze di Regione di Controllo ottenute per gli esemplari di *M. cristofaroi*, *M. epeirosi* e *M. fulvipes* non presentano alcuna omologia né tra loro, né con le sequenze ottenute per tutti gli altri esemplari del sottogruppo di *M. coracinus*, ed essendo queste specie rispetto a *M. aeneus* molto più affini al resto dei taxa ascritti al sottogruppo-*coracinus*, è verosimile supporre che anche una eventuale sequenza di Regione di Controllo di *M. aeneus* risulterebbe egualmente non confrontabile. In una analisi filogenetica mediante questo marcatore, dunque, *M. aeneus* risulterebbe, per ovvie ragioni, del tutto inadeguato come taxon di riferimento. Inoltre, dato l'estremo grado di divergenza della Regione di Controllo rilevato nei suddetti taxa, non è stato possibile identificare nessun altro taxon "esterno" al sottogruppo di *M. coracinus* che potesse possedere secondo questo marcatore un livello di divergenza tale da permetterne un uso come *outgroup* in questo studio.



## **2.2 Raccolte sul campo di materiale entomologico e conservazione dei campioni**

Una parte del materiale entomologico era già disponibile da raccolte sul campo precedenti a questo studio. Alcuni campionamenti condotti negli ultimi tre anni hanno permesso tuttavia di rilevare nuovi taxa (*M. cristofaroi*, *M. epeirosi*) attribuibili morfologicamente al sottogruppo di specie di *M. coracinus*. Per altre specie già note sono stati aggiunti campioni provenienti da nuove località permettendo di ampliare il numero di campioni all'interno degli areali di distribuzione geografica e di ampliare i dati autoecologici sui taxa in studio.

Le raccolte sono state effettuate sia per mezzo del retino da sfalcio, sia attraverso la raccolta diretta sui fiori mediante l'utilizzo di un aspiratore entomologico.

Tutti i campioni sono stati fissati in provette contenenti acetone puro per analisi verificandone senza dubbio le migliori proprietà nella conservazione a lungo termine del DNA di insetti (Fukatsu, 1999) e conservati a + 4°C per le successive analisi molecolari.

In un secondo momento, tutto il materiale raccolto è stato identificato sulla base di differenze morfologiche esoscheletriche e degli apparati genitali maschili, prima di essere destinato alle analisi molecolari.



## 3. METODI

### 3.1 La Regione di Controllo del DNA mitocondriale negli insetti

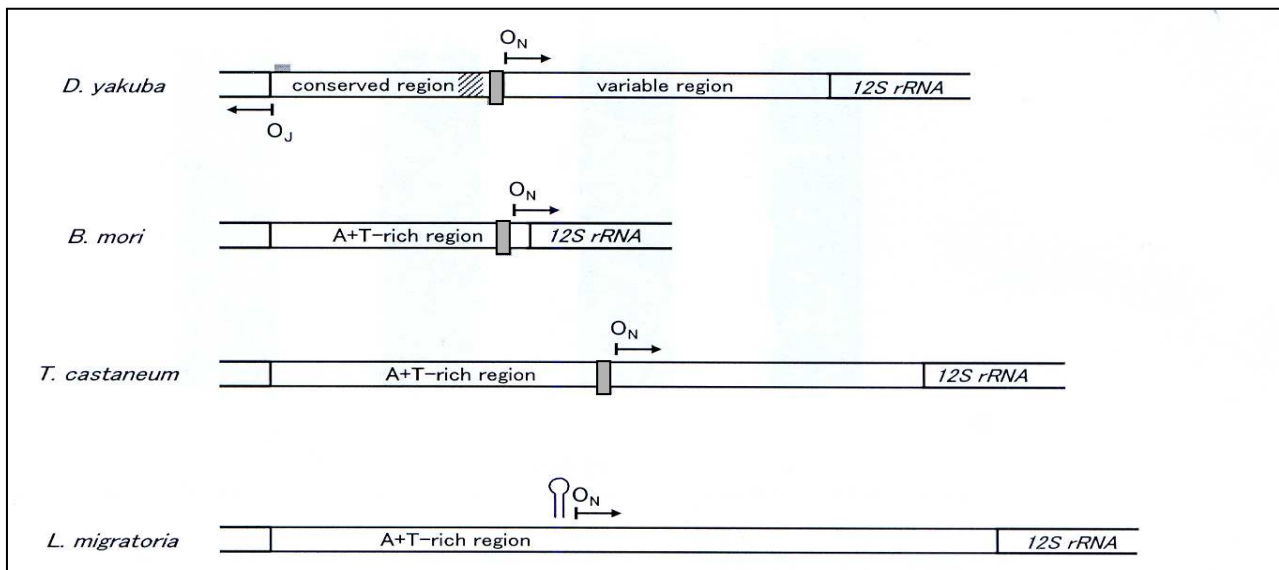
#### 3.1.1 Cenni su funzione e struttura: dati disponibili per gli insetti

La maggior parte dei marcatori utilizzati in filogenesi molecolare per lo studio di taxa separatisi in tempi relativamente recenti, o per studi di variabilità intraspecifica, sono di origine mitocondriale. Il DNA mitocondriale (mtDNA) presenta infatti notevoli vantaggi, essendo abbondante nei tessuti degli organismi, facile da manipolare ed ereditato in singola copia per via materna (Harrison, 1989; Avise, 1994; Simon *et al.*, 1994; Caterino *et al.*, 2000), sebbene in studi recenti siano stati messi in evidenza rari fenomeni di ricombinazione, eteroplasmia, *paternal leakage* (Buroker *et al.*, 1990; Awadalla *et al.*, 1999; Macaulay *et al.*, 1999; Hey, 2000; Birky, 2001; Nardi *et al.*, 2001) ed esistenza di pseudogeni nucleari di origine mitocondriale (Zhang & Hewitt, 1996; Bensasson *et al.*, 2001; Williams & Knowlton, 2001). Il tasso di mutazione dei marcatori mitocondriali, nei vertebrati almeno dieci volte maggiore rispetto a quello dei geni nucleari, risulta invece negli insetti di poco più elevato rispetto a quello dei marcatori nucleari (Powell, 1997; Ballard & Dean, 2001).

La porzione non codificante più estesa del DNA mitocondriale negli organismi animali viene denominata Regione di Controllo (CR, “*Control Region*”). Alcuni studi suggeriscono che la Regione di Controllo abbia un ruolo fondamentale nel controllo della duplicazione e della trascrizione del DNA mitocondriale (Shadel & Clayton, 1997; Taanman, 1999). Nei vertebrati la Regione di Controllo, anche detta “D-loop”, presenta al suo interno delle sequenze “regolatrici” (CSBs, “*conserved sequence blocks*”) ben caratterizzate e conservate, che si pensa siano responsabili dell’inizio della trascrizione e della replicazione della “catena pesante” (*H-strand*) del DNA mitocondriale (Clayton, 1982; Shadel & Clayton, 1997; Taanman, 1999). Negli insetti la Regione di Controllo viene comunemente denominata “*AT-rich region*” (Fauron & Wolstenholme, 1976) a causa dell’elevato contenuto in residui di adenina e timina. Tuttavia negli insetti le sequenze regolatrici del processo di duplicazione non sono state identificate con chiarezza, e per tale motivo il meccanismo di replicazione del DNA mitocondriale è ancora poco conosciuto in questi organismi. Alcune analisi comparative tra le sequenze di Regioni di Controllo di insetti appartenenti a diversi ordini (Zhang & Hewitt, 1997) hanno permesso di evidenziare la presenza di blocchi di sequenze di elementi ripetitivi, di omopolimeri e di strutture secondarie relativamente conservate che potrebbero effettivamente rivestire un ruolo importante nella regolazione dei processi di duplicazione. Tali blocchi di sequenze e strutture secondarie differiscono tuttavia per moltissimi aspetti da quelle individuate nei vertebrati, e numerose incertezze persistono sul loro effettivo ruolo (Zhang *et al.*, 1995; Zhang & Hewitt, 1997; Saito *et al.*, 2005). Dal punto di vista

strutturale si possono individuare due tipologie di Regione di Controllo, di cui una tipologia (Regioni di Controllo del *Gruppo 1*) comune a tutte le specie di *Drosophila* finora esaminate ed una seconda condivisa invece da tutti gli altri insetti (*Gruppo 2*) (Zhang & Hewitt, 1997). Le Regioni di Controllo del *Gruppo 1* sono suddivisibili in due parti secondo il grado di conservazione della sequenza nucleotidica (Clary & Wolstenholme, 1987; Monforte *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1994): normalmente è presente una zona molto conservata vicina al blocco dei geni per i tRNA, ed una zona a ridosso del 12S che presenta, invece, un'elevata variabilità nucleotidica e di lunghezza (Monforte *et al.*, 1993). In entrambe queste zone sono presenti lunghi tratti contenenti elementi ripetitivi (Solignac *et al.*, 1986; Lewis *et al.*, 1994) che si contraddistinguono in elementi ripetitivi di *tipo I* collocati all'interno della zona variabile, e in elementi ripetitivi di *tipo II* disposti, invece, nella porzione conservata. Il *Gruppo 2* include le Regioni di Controllo di Coleotteri, Ortotteri, alcuni altri Ditteri e Lepidotteri; queste, a differenza di quelle appartenenti al *Gruppo 1*, non sono suddivisibili in una zona conservata e in una zona variabile, ma lungo la sequenza della Regione, senza una precisa collocazione, sono presenti sia brevi tratti conservati, sia zone ad alta variabilità costituite da elementi ripetitivi (Zhang & Hewitt, 1997).

Zone estremamente conservate della Regione di Controllo negli insetti consistono in omopolimeri di timine (*poly-thymidine stretch* o *T-stretch*) che sembrano essere direttamente coinvolti nel controllo dell'inizio della sintesi del DNA mitocondriale (Zhang & Hewitt, 1997; Saito *et al.*, 2005). Nella maggior parte dei casi un omopolimero di timine molto conservato si trova in prossimità del gene per il tRNA dell'isoleucina (Zhang & Hewitt, 1997). In altri casi, come nel coleottero *Tribolium*, un omopolimero di timine si trova al centro della Regione, mentre nel lepidottero *Bombyx morii* esso si trova nella zona della Regione prossima al gene per il 12S; in entrambi i casi questo omopolimero potrebbe avere un ruolo nell'inizio della sintesi del filamento minore (Saito *et al.*, 2005). In *Drosophila* esistono due omopolimeri di timine che probabilmente rivestono un ruolo funzionale: l'uno, molto prossimo al gene del tRNA per l'isoleucina, e l'altro in una zona più centrale: questi sembrano essere responsabili rispettivamente dell'inizio della replicazione del filamento maggiore ( $O_J$ ) e del filamento minore ( $O_N$ ). Negli ortotteri non sono invece presenti omopolimeri di timine; tuttavia una struttura a forcina localizzata solitamente nella parte più centrale della Regione di Controllo di questi insetti potrebbe effettivamente avere un ruolo nell'inizio della duplicazione (Saito *et al.*, 2005) (*fig. 3*).



**Figura 3 – Posizione delle origini di replicazione sulla Regione di Controllo per insetti appartenenti a quattro diversi ordini. Rettangolo scuro = omopolimero di timine;  $O_N$  = origine di replicazione del filamento minore,  $O_J$  = origine di replicazione del filamento maggiore; struttura a forcina indicata poco prima dell' $O_N$  per *L. migratoria* (da Saito *et al.* 2005)**

Figure 3 – Positions of replication origins in mtDNA Control Region for insects belonging to four different orders. Shaded boxes = T-stretch;  $O_N$  = replication origin for (-) strand;  $O_J$  = replication origin for (+) strand; stem-loop structure is indicated immediately upstream of the  $O_N$  of *L. migratoria* (from Saito *et al.*, 2005)

Gli studi sulla Regione di Controllo degli insetti non sono tuttavia numerosi ed esistono al momento pochi dati relativi a questo marcatore, sia per quanto riguarda le sue caratteristiche molecolari, sia per ciò che concerne le sue potenzialità di utilizzo ed applicazione in studi evolutivi (tabella 3). Questo marcatore è stato infatti isolato e sequenziato completamente solo in poche specie, appartenenti ad alcuni ordini di insetti tra cui Ditteri (Clary & Wolstenholme, 1985; Beard *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1995; Lessinger *et al.*, 2000; Spanos *et al.*, 2000; Brehm *et al.*, 2001; Tsujino *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2003; Junqueira, 2004), Lepidotteri (Taylor *et al.*, 1993; Yukuhiro *et al.* 2002; Vandewoestijne *et al.*, 2004; Vila & Björklund, 2004), Ortoteri (Flook *et al.*, 1995; Zhang *et al.* 1995; Zhang & Hewitt, 1996a; Kim *et al.*, 2005), Plecotteri (Schultheis *et al.*, 2002a), Imenotteri (Crozier & Crozier, 1993), Emitteri (Dotson & Beard, 2001), Ptiratteri (Renfu *et al.*, 2001), Psocotteri (Shao *et al.*, 2003), Tisanotteri (Shao & Barker, 2003) e Tisanuri (Nardi *et al.*, 2003). L'utilità della Regione di Controllo per studi di filogenesi a livello di specie o per studi di genetica di popolazione rimane controversa (Taylor *et al.*, 1993; Zhang & Hewitt, 1997; Caterino *et al.*, 2000). Ad oggi esistono pochi studi di filogenesi molecolare o di filogeografia condotti mediante l'uso dell'intera Regione di Controllo o di sequenze parziali di essa (Lepidotteri:

Vandewoestijne *et al.*, 2004; Vila & Björklund, 2004; Ditteri: Brehm *et al.*, 2001; Brehm *et al.* 2004), ed esistono al momento soltanto sei studi di genetica di popolazione condotti per mezzo di questo marcatore (McKechnie *et al.*, 1993a, b; Zhang & Hewitt, 1996; Atkinson & Adams, 1997; Mardulyn *et al.*, 2001; Schultheis *et al.*, 2002b).

Per quanto riguarda i Coleotteri, i primi dati riguardanti la lunghezza e la struttura della Regione di Controllo provengono dalle analisi con enzimi di restrizione condotte sul DNA mitocondriale di *Pysodes* spp. (Boyce *et al.*, 1989). I dati di sequenziamento completo del marcatore finora disponibili riguardano solamente sei specie di coleotteri: per tre specie (*Crioceris duodecimpunctata*, *Pyrocoelia rufa* e *Tribolium castaneum*) questi derivano dal sequenziamento dell'intero genoma mitocondriale (Friedrich & Muquim, 2003; Stewart & Beckenbach, 2003; Bae *et al.*, 2004), mentre per i coleotteri crisomelidi *Gonioctena olivacea*, *G. pallida* e *Chrysomela lapponica* le sequenze complete di Regione di Controllo provengono da un recente lavoro mirato ad approfondire la variabilità e le potenzialità di utilizzo del marcatore per studi evolutivisti a vari livelli tassonomici (Mardulyn *et al.*, 2003). Infine, esistono finora solamente due studi, condotti sempre su coleotteri crisomelidi del genere *Gonioctena*, in cui una porzione del marcatore è stata utilizzata con successo per analisi di filogeografia e di genetica di popolazioni (Mardulyn, 2001, Mardulyn *et al.*, 2005).

**Tabella 3 – Regioni di Controllo interamente sequenziate negli insetti**

Table 3 – Insect mitochondrial control regions sequenced in their entirety

| <i>Taxon</i>                      | <i>Lunghezza<br/>A+T rich region</i> | <i>Fonte</i>                        |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Ditteri</b>                    |                                      |                                     |
| <i>Drosophila yakuba</i>          | 1077 bp                              | Clary & Wolstenholme, 1985          |
| <i>Drosophila virilis</i>         | 1029 bp                              | Clary & Wolstenholme, 1987          |
| <i>Drosophila teissieri</i>       | 1091 bp                              | Clary & Wolstenholme, 1985          |
| <i>Drosophila melanogaster</i>    | 4601 bp                              | Lewis <i>et al.</i> , 1995          |
| <i>Drosophila subobscura</i>      | 940 bp                               | Brehm <i>et al.</i> , 2001          |
| <i>Bactrocera oleae</i>           | 949 bp                               | Nardi <i>et al.</i> , 2003          |
| <i>Anopheles gambiae</i>          | 519 bp                               | Beard <i>et al.</i> , 1993          |
| <i>Anopheles quadrimaculatus</i>  | 625 bp                               | Mitchell <i>et al.</i> , 1993       |
| <i>Ceratitis capitata</i>         | 1004 bp                              | Spanos <i>et al.</i> , 2000         |
| <i>Cochliomyia hominivorax</i>    | 1178-1179 bp                         | Lessinger <i>et al.</i> , 2000      |
| <i>Chrysomya putoria</i>          | 1008 bp                              | Junqueira, 2004                     |
| <b>Lepidotteri</b>                |                                      |                                     |
| <i>Bombyx mori</i>                | 494 bp                               | Yukuhiro <i>et al.</i> 2002         |
| <i>Bombyx mandarina</i>           | 747 bp                               | Yukuhiro <i>et al.</i> 2002         |
| <i>Antheraea pernyi</i>           | 552 bp                               | Liu <i>et al.</i> (non pubblicato)  |
| <i>Erebia</i> (10 specie)         | 377-413 bp                           | Vila & Björklund, 2004              |
| <i>Coenonympha</i> (4 specie)     | 407-411 bp                           | Vila & Björklund, 2004              |
| <i>Parnassius apollo</i>          | 504-505 bp                           | Vila & Björklund, 2004              |
| <i>Melitaea</i> (2 specie)        | 343-345 bp                           | Vila & Björklund, 2004              |
| <i>Inachis io</i>                 | 338 bp                               | Vila & Björklund, 2004              |
| <i>Aglais urticae</i>             | 719 bp                               | Vandewoestijne <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Jalmenus</i> (6 specie)        | ca. 350 bp                           | Taylor <i>et al.</i> , 1993         |
| <b>Plecopteri</b>                 |                                      |                                     |
| <i>Peltoperla tarteri</i>         | 1270 bp                              | Schultheis <i>et al.</i> , 2002     |
| <b>Coleotteri</b>                 |                                      |                                     |
| <i>Pyrocoelia rufa</i>            | 1522 bp                              | Bae <i>et al.</i> , 2004            |
| <i>Tribolium castaneum</i>        | 1240 bp                              | Friedrich & Muquim, 2003            |
| <i>Crioceris duodecimpunctata</i> | 1220 bp                              | Stewart & Beckenbach, 2003          |
| <i>Pissodes</i> (3 specie)        | 9.000-13.0000 bp                     | Boyce <i>et al.</i> , 1989          |
| <i>Gonioctena pallida</i>         | 3417-3701 bp                         | Mardulyn <i>et al.</i> , 2003       |
| <i>Gonioctena olivacea</i>        | 3172-3296 bp                         | Mardulyn <i>et al.</i> , 2003       |
| <i>Chrysomela lapponica</i>       | 4640-5276 bp                         | Mardulyn <i>et al.</i> , 2003       |
| <b>Imenotteri</b>                 |                                      |                                     |
| <i>Apis mellifera</i>             | 827 bp                               | Crozier & Crozier, 1993             |
| <b>Emitteri</b>                   |                                      |                                     |
| <i>Triatoma dimidiata</i>         | 2165 bp                              | Dotson & Beard, 2001                |
| <i>Philaneus spumarius</i>        | 1835 bp                              | Stewart & Beckenbach (non pub)      |
| <b>Ortotteri</b>                  |                                      |                                     |
| <i>Locusta migratoria</i>         | 875 bp                               | Flook <i>et al.</i> , 1995          |
| <i>Schistocerca gregaria</i>      | 762 bp                               | Zhang <i>et al.</i> , 1995          |
| <i>Chorthippus parallelus</i>     | 1512 bp                              | Zhang <i>et al.</i> , 1995          |
| <i>Grillotalpa orientalis</i>     | 920 bp                               | Kim <i>et al.</i> , 2005            |
| <b>Ptiratteri</b>                 |                                      |                                     |
| <i>Heterodoxus macropus</i>       | 47-73 bp                             | Renfu <i>et al.</i> , 2001          |
| <b>Psocotteri</b>                 |                                      |                                     |
| <i>Lepidopsocid</i> gen.          | 2120 bp                              | Shao <i>et al.</i> , 2003           |
| <b>Tisanotteri</b>                |                                      |                                     |
| <i>Thrips imaginis</i>            | 440-460 bp                           | Shao & Barker, 2003                 |
| <b>Tisanuri</b>                   |                                      |                                     |
| <i>Tricholepidion gertschi</i>    | 397 bp                               | Nardi <i>et al.</i> , 2003          |

### **3.1.2 Caratteristiche molecolari ed evolutive della Regione di Controllo negli insetti: vantaggi e svantaggi per l'utilizzo in studi evolutivi.**

I pochi dati di letteratura ad oggi disponibili forniscono solo una serie di indicazioni per quanto riguarda le caratteristiche molecolari della Regione di Controllo condivise dai vari ordini di insetti (Zhang & Hewitt, 1997).

Oltre all'elevato contenuto in adenine e timine (comunemente tra l'85 e il 96%, da cui il nome di "AT-rich region"), la Regione di Controllo negli insetti presenta un'estrema variabilità per quanto riguarda la lunghezza, ovvero nel numero di nucleotidi di cui essa è composta (dalle ca. 350 alle 13.000 bp, vedi *tabella 3*). Un elevato grado di polimorfismo di lunghezza del marcatore è stato rilevato anche tra specie molto affini tra loro, o addirittura, tra individui appartenenti a diverse popolazioni di una stessa specie (Boyce *et al.*, 1989; Mardulyn, 2001; Mardulyn *et al.*, 2003) e si pensa che sia dovuto principalmente ad una estrema variabilità in lunghezza e nel numero di copie di elementi ripetitivi (principalmente unità ripetitive in "tandem") che si trovano più o meno dispersi all'interno della sequenza nucleotidica. Si suppone che la variabilità nel numero di copie degli elementi ripetitivi della Regione di Controllo sia responsabile anche di un fenomeno chiamato *eteroplasmia di lunghezza*, già osservato in alcuni organismi animali (Rand, 1993), per cui un singolo individuo può essere portatore di due o più genomi mitocondriali che differiscono esclusivamente per la lunghezza della Regione di Controllo. Casi di eteroplasmia di lunghezza sono stati osservati nei maggiori gruppi di insetti, come Ortotteri e Ditteri, e nei Coleotteri curculionidi, in cui quasi tutti gli individui analizzati (circa 219) sono risultati eteroplasmici (Boyce *et al.*, 1989). Rispetto al DNA mitocondriale dei vertebrati, negli insetti (e negli invertebrati, in genere) le ripetizioni in tandem tendono ad essere più estese e a ricorrere con un numero di copie più elevato, dando luogo più frequentemente a tali fenomeni di eteroplasmia di lunghezza.

Un certo grado di variabilità esiste anche per quanto riguarda la posizione relativa della Regione di Controllo rispetto ai geni codificanti del DNA mitocondriale posizionati alle sue estremità. Solitamente negli insetti la Regione di Controllo è localizzata tra il gene codificante per la subunità ribosomale minore (12S) ed un blocco più o meno numeroso di geni che trascrivono per alcuni tRNA, in cui il tRNA per la metionina è di solito contenuto. In particolare, la localizzazione della Regione di Controllo nei confronti dei geni per i tRNA può variare notevolmente a causa dei fenomeni di trasposizione all'interno del DNA mitocondriale che interessano questi geni con una frequenza piuttosto elevata negli artropodi (Roehrdanz *et al.*, 2002).



Contrariamente a quanto avviene per i geni codificanti del DNA mitocondriale, se si confronta la sequenza primaria dei nucleotidi della Regione di Controllo di esemplari appartenenti a diversi ordini di insetti si rileva un elevatissimo grado di divergenza, ed è ormai abbastanza chiaro che eventi di inserzione, duplicazione e delezione di basi o di interi tratti di sequenza abbiano avuto un ruolo importante nell'evoluzione della Regione di Controllo ad alti livelli tassonomici. Tuttavia, il confronto di sequenze di esemplari appartenenti a specie molto affini tra loro rileva in alcuni casi livelli di variabilità equiparabili con quelli provenienti da geni mitocondriali codificanti (Monnerot *et al.* 1990; Taylor *et al.*, 1993; Caccone *et al.*, 1996; Vila & Björklund, 2004), mentre in altri casi, come nei coleotteri crisomelidi, il grado di variabilità, anche a livello intraspecifico, risulta molto più elevato (Mardulyn, 2001; Mardulyn *et al.*, 2003). Questi risultati suggeriscono una differente evoluzione del marcatore a diversi livelli tassonomici e a seconda del taxon che si prende in esame. Per quanto detto e data la scarsità di dati disponibili, nel caso si intenda utilizzare questo marcatore per studi evolutivi su esemplari appartenenti a taxa mai esaminati, risulta di fondamentale importanza condurre uno studio preliminare sulla variabilità di questo marcatore a diversi livelli tassonomici (Mardulyn *et al.*, 2003).

Se le caratteristiche molecolari finora elencate rendono la Regione di Controllo del DNA mitocondriale un marcatore potenzialmente utile per studi evolutivi su taxa estremamente affini, queste costituiscono nello stesso tempo un aspetto che ne rende tecnicamente difficile l'isolamento e il sequenziamento, anche in una prospettiva di utilizzo diffuso e di *routine* in studi di sistematica molecolare.

L'isolamento della Regione di Controllo tramite tecniche di PCR e il successivo sequenziamento in nuovi taxa presentano infatti notevoli difficoltà dal punto di vista metodologico.

Innanzitutto la variabilità del posizionamento della Regione di Controllo nei confronti del blocco dei geni per i tRNA rende complicata la progettazione di *primer* esterni che permettano di amplificare agevolmente l'intera regione, poiché a causa della carenza di dati di sequenza sulle zone adiacenti al marcatore è sempre necessario uno studio preliminare volto alla conoscenza delle regioni limitrofe.

La totale assenza di informazioni *a priori* sulla lunghezza del marcatore da amplificare, data l'estrema variabilità e nessuna indicazione su quest'ultima quando si intraprende lo studio su un nuovo taxon, costituisce un'ulteriore difficoltà per l'ottimizzazione dei parametri fondamentali della tecnica di PCR o di *Long PCR*. Inoltre, la presenza di elementi ripetitivi, omopolimeri, strutture secondarie, e l'eventualità di fenomeni di eteroplasmia di lunghezza, oltre a rappresentare difficoltà aggiuntive per il successo delle reazioni di PCR, danno luogo a problematiche tecniche per quanto

riguarda la successiva fase di sequenziamento del marcatore: infatti gli elementi ripetitivi e gli *stretch* omopolimerici causano lo scivolamento o il blocco dell'enzima DNA polimerasi in fase di sequenziamento, rendendo molto difficile, se non impossibile, l'interpretazione e la lettura dei cromatogrammi (*figura 7a, c*). Per superare tali difficoltà è necessario in moltissimi casi ricorrere a tecniche di clonaggio, orientate all'introduzione del frammento amplificato del marcatore in un plasmide batterico. La tecnica di clonaggio sembra facilitare il sequenziamento della Regione di Controllo, o di parti di essa, soprattutto nel caso di sequenze nucleotidiche estremamente lunghe e/o complesse dal punto di vista strutturale, probabilmente a causa di una maggiore stabilità termodinamica della molecola circolare di acido nucleico ricombinante prodotta dall'inserzione della Regione di Controllo in un vettore plasmidico.

## **3.2 Procedure sperimentali**

### **3.2.1 Estrazione del DNA**

La maggior parte dei campioni biologici sono stati sottoposti all'estrazione del DNA per mezzo di un protocollo standard mediante l'utilizzo di Fenolo/Cloroformio: Acido Isoamilico 1:24 (Sambrook & Russell, 2000). Nei casi in cui per le successive reazioni di amplificazione fosse necessario disporre di un DNA di maggiore qualità e purezza è stato adottato un protocollo di estrazione mediante l'uso di CTAB (Sambrook & Russell, 2000), o è stato utilizzato un kit commerciale di estrazione di acidi nucleici (PureGene, Gentra *Tissue & Cell Kit*). Date le piccole dimensioni dei *Meligethes*, e di conseguenza la modesta quantità totale di tessuti disponibile, si è deciso di condurre la lisi cellulare utilizzando tutti i tessuti dei campioni, e quindi l'animale intero è stato sottoposto al processo.

I protocolli di lisi e di estrazione del DNA sono descritti in Appendice II A.

### **3.2.2 Tecniche di PCR e Long PCR**

La tecnica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986) viene correntemente utilizzata per isolare ed amplificare segmenti di DNA mediante una serie di reazioni di sintesi a catena catalizzate da un enzima termostabile di DNA polimerasi (*Taq polymerase*), secondo un particolare ciclo termico che prevede diverse temperature e tempi per le tre fasi fondamentali, che consistono: 1) nella denaturazione del DNA che funge da stampo, 2) nel legame con i *primer*, e 3) nell'estensione delle catene nascenti.

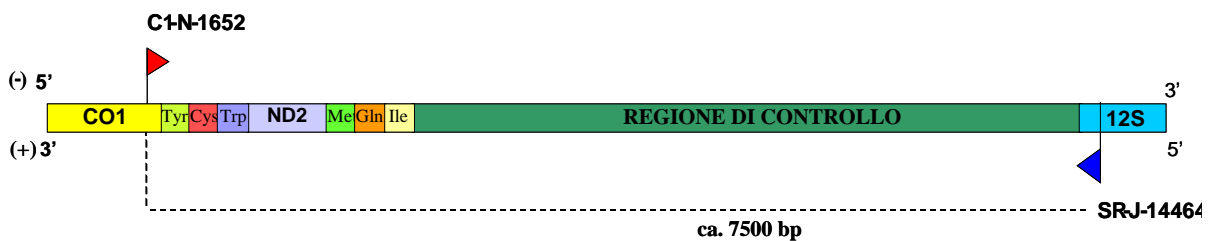
I requisiti fondamentali affinché una reazione di PCR avvenga con successo consistono principalmente nella conoscenza quantomeno parziale della sequenza delle regioni fiancheggianti la

zona di interesse e della lunghezza del frammento che si intende amplificare. Il primo requisito è indispensabile poiché sulla base delle sequenze fiancheggianti vengono progettati i due oligonucleotidi (*primer*) che fungono da iniziatori della reazione, mentre il secondo dato permette di agevolare la programmazione delle temperature e dei tempi del ciclo termico, in particolare quelli di estensione dei frammenti. La tecnica di PCR permette mediante l'uso di una *Taq* polimerasi *standard* di amplificare frammenti di 1-2 Kb in lunghezza, ma molto difficilmente o per nulla frammenti più estesi. Tra le cause di questo limite nell'attività della *Taq* polimerasi ha probabilmente grande rilevanza l'incorporazione di basi "errate" in posizione 3' del filamento in crescita e l'assenza di un'attività di riparazione esonucleasica: questo provocherebbe un distacco prematuro dell'enzima dal filamento stampo, e dunque un limite nella polimerizzazione di prodotti PCR di maggiore lunghezza. Questo ostacolo tecnico può essere superato usando in reazione una miscela di due enzimi di DNA polimerasi, uno dei quali efficiente come una normale *Taq* nel catalizzare la reazione di polimerizzazione, ma privo di attività "riparativa" (*non-proofreading*), l'altro che invece provvede essenzialmente attraverso un'attività esonucleasica 3'-5' (*proofreading*) ad eliminare i nucleotidi "errati" permettendo al primo enzima di reintrodurre il nucleotide "corretto", complementare, cioè, al filamento stampo. Queste miscele di *Taq* polimerasi a diversa attività permettono di amplificare frammenti molto lunghi (fino a ca. 50.000 bp) e sono quindi utilizzate in reazioni PCR particolari dette *Long PCR*. Sebbene i principi e i parametri fondamentali da considerare per il successo delle reazioni di *Long PCR* siano essenzialmente gli stessi di quelli di una normale reazione PCR, occorre esaminare alcuni aspetti fondamentali: 1) innanzitutto lunghi frammenti possono essere amplificati solamente da DNA nativo di buona qualità, da cui l'esigenza di una preparazione molto più accurata dell'estratto di DNA 2) nel caso delle *Long PCR* il grado di specificità dell'amplificazione va tenuto sotto stretto controllo ed è quindi fondamentale disegnare *primer* molto specifici per il frammento che si intende isolare; 3) i tempi, ma soprattutto le temperature del ciclo termico possono variare sensibilmente da quelle previste da una procedura standard di reazione PCR, ed è quindi necessario un maggiore sforzo di ottimizzazione dei parametri in questione.

A causa delle difficoltà tecniche appena menzionate, l'amplificazione e il sequenziamento dell'intera Regione di Controllo nei *Meligethes* ha richiesto un notevole sforzo sperimentale. Le condizioni sperimentali ottimali utilizzate per l'amplificazione e il sequenziamento dell'intera Regione di Controllo, o di parti di essa, sono riportate in Appendice II B.

Allo scopo di progettare dei *primer* specifici per l'amplificazione della Regione di Controllo, data la carenza di informazioni sull'esatta localizzazione della Regione soprattutto rispetto al blocco dei

geni per i tRNA (Met, Gln e Ile), e l'assenza di dati di sequenza per i *Meligethes* dei geni immediatamente adiacenti al marcatore, si è dovuto procedere inizialmente all'amplificazione e al sequenziamento con *primer* universali (ossia *primer* che consistono di sequenze ampiamente conservate anche in taxa molto distanti filogeneticamente e che permettono l'amplificazione di frammenti provenienti da entità di gruppi tassonomici anche molto eterogenei) di due geni quanto più possibile prossimi alla Regione di Controllo, sia a monte che a valle della stessa, facilmente sequenziabili e con un posizionamento relativo all'interno del DNA mitocondriale dei coleotteri che risultasse ben conservato. In conformità a queste caratteristiche si è quindi deciso di isolare e sequenziare dei tratti di gene relativi alla citocromo ossidasi I (COI) e alla subunità minore del RNA ribosomale (12S). Sulla base delle sequenze dei frammenti di COI e 12S è stata quindi disegnata una coppia di *primer* specifica per i *Meligethes* (C1-N-1652 / SR-J-14464) che è stata utilizzata successivamente per amplificare l'intera Regione di Controllo mediante *Long PCR* utilizzando un kit commerciale di miscela di enzimi (*Expand Long Template PCR System Roche*) (figura 4).



**Figura 4 – Primer utilizzati in una prima fase per l'amplificazione dell'intera Regione di Controllo**  
 Figure 4 – Schematic diagram showing the position of the primers used for the first amplification of the whole Control Region

Data la totale assenza di informazioni sulla lunghezza del frammento, si è tentato inizialmente di amplificare l'intera Regione di Controllo modificando gradualmente i valori di temperatura e i tempi del ciclo termico nelle reazioni di *Long PCR*. Solo dopo numerose prove sperimentali è stato isolato con successo un frammento di ca. 7500 bp e, acquisita quindi l'informazione necessaria sulla lunghezza attesa del prodotto di amplificazione, sono stati ottimizzati i parametri di reazione.

Data la necessità di ridurre la lunghezza del frammento amplificato all'estremità 5', in modo da rendere più agevole l'amplificazione e poter iniziare la successiva fase di sequenziamento - mediante *primer walking* - quanto più possibile a ridosso del marcatore, si è provato ad utilizzare un *primer* disegnato specificatamente per *Gonioctena* (Mardulyn *et al.*, 2003) sul gene del tRNA per la metionina (TM-N-204). Questo *primer*, in coppia con il *primer* SR-J-14464, ha fornito degli ottimi risultati ed è stato quindi utilizzato per le successive amplificazioni: in tal modo è stato possibile

ottenere per otto esemplari di *Meligethes thalassophilus* un frammento di ca. 5500-6000 bp, corrispondente quasi esclusivamente all'intera Regione di Controllo (figura 5).



**Figura 5 – Primer utilizzati definitivamente per l'amplificazione dell'intera Regione di Controllo**  
 Figure 5 – Schematic diagram showing the position of the primers definitely used for the amplification of the whole Control Region

Sulla base di un'analisi della variabilità dell'intera Regione di Controllo (vedi risultati) è stata selezionata e successivamente amplificata per gran parte dei campioni - mediante la coppia di primer SR-N-04/SR-J-01 (vedi tabella 4) - una porzione di circa 1800 bp, caratterizzata da un livello di divergenza genetica appropriato ai fini di una ricostruzione filogenetica (figura 6).

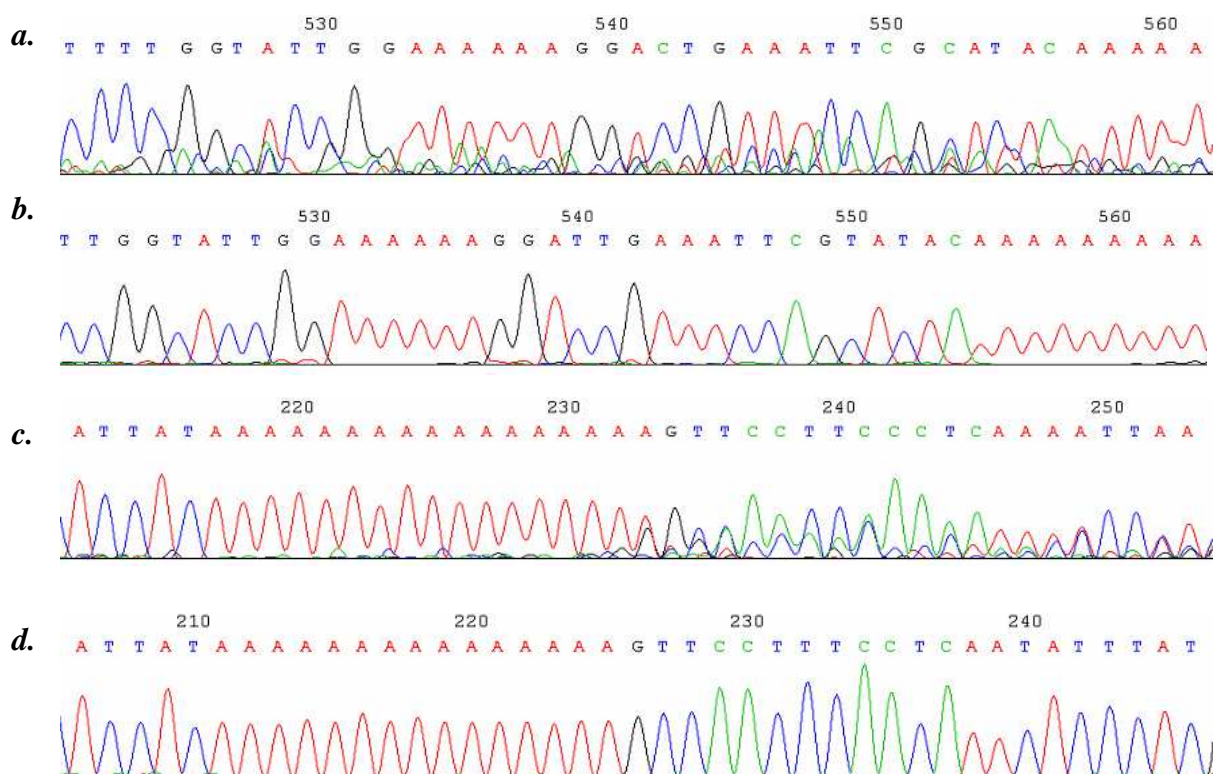
Per altri individui per i quali l'amplificazione di 1800 paia di basi non forniva risultati soddisfacenti, di questa porzione sono state amplificate solamente 800 paia di basi mediante la coppia di primer SR-N-03/SR-J-01 (vedi tabella 4, figura 6).



**Figura 6 – Primer utilizzati per l'amplificazione di una porzione di Regione di Controllo**  
 Figure 6 – Schematic diagram showing the position of the primers used for the amplification of a small portion of Control Region

### 3.2.3 Clonaggio

Dal momento che il sequenziamento diretto dei prodotti PCR provenienti dall'isolamento della Regione di Controllo non forniva cromatogrammi leggibili e facilmente interpretabili (figura 7 a, c) dovuti, come già accennato, a problemi legati a fenomeni di scivolamento e/o blocco della polimerasi in fase di sequenziamento, si è reso necessario introdurre in vettori plasmidici mediante clonaggio tutti i frammenti amplificati relativi sia all'intera Regione di Controllo, sia delle porzione prescelta per le analisi filogenetiche (figura 7 b, d). Il procedimento di clonaggio (T/A cloning) è riportato in Appendice II C.



**Figura 7 – Cromatogrammi risultanti da: a) sequenziamento diretto di un prodotto PCR; b) sequenziamento di un prodotto PCR dopo l'introduzione nel plasmide; c) sequenziamento diretto di un prodotto PCR in prossimità di un omopolimero; d) sequenziamento di un prodotto PCR in prossimità di un omopolimero dopo l'introduzione in un plasmide.**

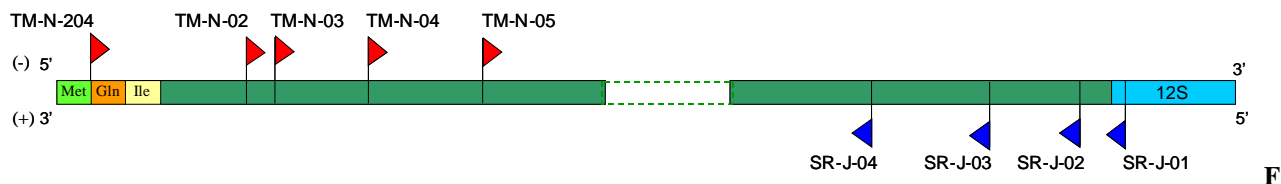
Figure 7 – Chromatograms showing a) direct sequencing of a PCR product; b) sequencing of a PCR product following its introduction into a plasmid vector; c) direct sequencing of a PCR product close to a homopolymer stretch; d) sequencing of a PCR product close to a homopolymer stretch following its introduction into a plasmid vector.

### 3.2.4 Sequenziamento

Il sequenziamento è stato eseguito presso il Centro di Sequenziamento BMR dell'Università di Padova utilizzando un procedimento automatizzato multicapillare (modello *Applied Biosystem Hitachi 3100 Genetic Analyzer*) che fa uso di un'analisi mediante fluorescenza di frammenti di oligonucleotidi prodotti con il metodo classico dei dideossinucleotidi descritto in Appendice II D (Maxam & Gilbert, 1977; Hillis & Moritz, 1990).

La sequenza completa della Regione di Controllo per otto campioni di *M. thalassophilus* è stata ottenuta attraverso la sovrapposizione di nove sequenze parziali risultanti dal sequenziamento mediante *primer walking* del singolo frammento corrispondente all'intera Regione di Controllo del campione precedentemente incluso mediante clonaggio in un plasmide. La *tabella 4* riporta i *primer* utilizzati per il sequenziamento dell'intera Regione di Controllo, mentre in *figura 8* è rappresentata la loro posizione.

Per tutte le specie del sottogruppo di *M. coracinus* il sequenziamento dei frammenti di interesse ai fini delle analisi filogenetiche è stato condotto con il *primer* SR-J-01, già utilizzato in fase di amplificazione.



**figura 8 – Primer utilizzati per il sequenziamento tramite *primer walking* dell’intera Regione di Controllo**

Figure 8 – Schematic diagram showing the position of the primers used for sequencing the entire Control Region by means of “primer walking” method.

Per quanto riguarda la zona centrale della Regione di Controllo (indicata in *figura 7* con un rettangolo tratteggiato) non è stato possibile ottenere alcun dato di sequenza: le regioni fiancheggianti, infatti, sono costituite esclusivamente da elementi ripetitivi molto estesi su cui non è in alcun modo possibile disegnare *primer* di sequenziamento funzionanti.

**Tabella 4 – Primer utilizzati per l’amplificazione e il sequenziamento della Regione di Controllo nei *Meligethes***

Table 4 – Primers used for amplification and sequencing of mitochondrial Control Region in *Meligethes*

| <i>Sigla</i>   | <i>Sequenza</i>              | <i>Fonte e sigla originale</i>          |
|--|------------------------------|---|
| <b>Primer specifici per l’amplificazione dell’intera Regione di Controllo</b>        |                              |   |
| C1-N-1652  | 5’ GCATGAGCAGTAACAATAAC 3’   | Progettato per questo studio            |
| SR-J-14464   | 5’ CTGGTATAACTTATTGTGGG 3’   | Progettato per questo lavoro            |
| TM-N-01  | 5’TAACCTTYATAAATGGGGTATG 3’  | Mardulyn <i>et al.</i> , 2003; TM-N-204 |
| <b>Primer specifici per l’amplificazione di una porzione di Regione di Controllo</b> |                              |   |
| SR-J-01  | 5’ GAAACTCAATACATAAGCTAG 3’  | Progettato per questo studio            |
| SR-N-04  | 5’ GATTCTACCAATTCATAGG 3’    | Progettato per questo studio            |
| SR-N-03  | 5’ GTTGATTGAAATTAGTGGG 3’    | Progettato per questo studio            |
| <b>Primer per il sequenziamento della Regione di Controllo</b>                       |                              |   |
| TM-N-01  | 5’ TAACCTTYATAAATGGGGTATG 3’ | Mardulyn <i>et al.</i> , 2003; TM-N-204 |
| TM-N-02  | 5’ ACAGAGAGAGCGGTAAGC 3’     | Progettato per questo studio            |
| TM-N-03  | 5’ ATATCATACTTAATAGCAAC 3’   | Progettato per questo studio            |
| TM-N-04  | 5’ ATTTGATTTGTATTTCTATTCG 3’ | Progettato per questo studio            |
| TM-N-05  | 5’ TTTGTAGGGTTTATTTAGCC 3’   | Progettato per questo studio            |
| SR-J-01  | 5’ GAAACTCAATACATAAGCTAG 3’  | Progettato per questo studio            |
| SR-J-02  | 5’ TTCGGGTATGATTAGGATTC 3’   | Progettato per questo studio            |
| SR-J-02 mod  | 5’ TATGATTAGGATTCCTTGG 3’    | Progettato per questo studio            |
| SR-J-03  | 5’ ATGATTCCGATTTACTAGC 3’    | Progettato per questo studio            |
| SR-J-04(+)   | 5’ ATCGAACCTATGAAATTGG 3’    | Progettato per questo studio            |

### 3.3 Metodi di analisi molecolare e filogenetica

#### 3.3.1 Allineamento delle sequenze

Uno dei problemi di base dell'analisi di sequenze nucleotidiche o aminoacidiche consiste nel determinare se esse siano correlate, ovvero se è plausibile ipotizzare la discendenza da un antenato comune attraverso una serie di processi che abbiano coinvolto fenomeni di mutazione e selezione. In altre parole, il primo passo di ogni analisi filogenetica consiste nello stabilire un'ipotesi di omologia tra i caratteri che verranno utilizzati per la ricostruzione della storia evolutiva dei taxa in studio.

L'allineamento delle sequenze è essenzialmente un metodo attraverso il quale si possono riconoscere le potenziali omologie tra i nucleotidi o tra le posizioni aminoacidiche (Needelman & Wunsch, 1970; Smith *et al.*, 1981; Hillis & Moritz, 1990; Nei & Kumar, 2000; Phillips *et al.*, 2000; Page & Holmes, 1998).

L'allineamento segue un criterio di ottimalità che si basa sull'attribuzione di un punteggio (*score*) tanto più elevato quanto maggiore è la similarità tra le sequenze, e dove è inoltre richiesto un modello probabilistico per la valutazione di ciascun punteggio.

La possibilità di inserzioni e delezioni fa sì che nell'allineamento vi possano essere dei vuoti (*gap*). L'introduzione di un *gap* corrisponde all'attribuzione di eventi di delezione di basi in una sequenza ed è considerato un evento raro nel caso di un gene codificante per una proteina, per la quale sarà più probabile avere un residuo sostituito da un altro piuttosto che perdere parti della propria struttura o averne inserite *ex-novo*. Di solito, quindi, l'introduzione di *gap* all'interno di sequenze di geni codificanti viene penalizzato con un punteggio negativo piuttosto elevato. Lo stesso non si può dire per quanto riguarda i geni non codificanti, per i quali non esistono costrizioni evolutive dovute alla traduzione in proteine funzionanti, e per i quali occorre considerare una frequenza più elevata di eventi di delezione o duplicazione nucleotidica assegnando quindi un minor "costo" evolutivo all'introduzione di *gap*.

L'adattamento degli algoritmi per la ricerca di un allineamento ottimale tra due sequenze pone dei problemi di applicabilità per più di tre sequenze considerate contemporaneamente (allineamento di sequenze multiple); a questo proposito esistono diversi approcci, da quello euristico (metodi approssimati) (Feng & Doolittle, 1987) a quello dell'allineamento multiplo che sfrutta il criterio del *Maximum likelihood* (Bishop & Thompson, 1986; Mitchison & Durbin, 1995).

Le otto sequenze complete di Regione di Controllo, corrispondenti tutte a campioni di *M. thalassophilus* – a meno di una porzione della zona più centrale (vedi *Risultati*) - sono state ottenute



allineando e montando tra loro le sequenze parziali attraverso l'uso del programma Staden Package ver. 2002.0 (Bonfield *et al.*, 1999-2002). Questo programma, che utilizza degli algoritmi di consenso per l'allineamento (*The Consensus Algorithms*), permette di seguire passo passo ogni cambiamento durante la fase di *editing* delle sequenze e di controllare l'esatta attribuzione dei nucleotidi grazie ad una visualizzazione in parallelo dei cromatogrammi di sequenza.

Per ognuno degli otto esemplari sono state prodotte due sequenze di consenso, una relativa alla porzione di Regione di Controllo adiacente al gene della subunità minore del RNA ribosomale (12S) e un'altra corrispondente alla porzione adiacente al gene per il tRNA dell'isoleucina (Ile) (di qui in poi denominate rispettivamente *porzione SR* e *porzione TM*) (Appendice I A, B). Le estremità della Regione sono state definite mediante il confronto e l'allineamento con le sequenze omologhe di 12S e Ile di *Gonioctena*, *Chrysomela*, *Tribolium*, *Pyrocoelia*, *Crioceris* (Coleotteri), *Drosophila* (Ditteri) e *Locusta* (Ortotteri). Entrambe le porzioni di Regione di Controllo degli otto esemplari sono state allineate tra loro mediante il software Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) con i parametri *standard* definiti dal programma (*gap opening/extension penalties*: 15.00/6.66).

La stabilità degli allineamenti è stata esplorata successivamente mediante il software S.O.A.P. ver. 1.1 (Löytynoja & Milinkovitch, 2001): questo programma genera automaticamente una serie di allineamenti mediante l'algoritmo di Clustal X, variando i valori dei parametri relativi all'assegnazione dei "costi evolutivi" dei *gap* entro uno specifico intervallo numerico. Il programma permette, dunque, di esplorare le eventuali variazioni nel risultato dell'allineamento al variare dei "costi evolutivi" assegnati ai *gap*, e, mediante il confronto degli allineamenti risultanti e la produzione di un allineamento di consenso è possibile individuare facilmente le posizioni nucleotidiche più "instabili", e dunque i tratti di sequenza per cui è più difficile un confronto dei caratteri in termini di omologia.

Anche per il resto degli esemplari analizzati, per i quali è stata sequenziata solo la zona all'interno della *porzione SR* di circa 800 bp della Regione di Controllo, l'allineamento è stato portato a termine mediante gli algoritmi di analisi di Staden Package ver. 2002.0 e Clustal X, ed è stata saggiata la stabilità dell'allineamento mediante il software S.O.A.P. 1.1.

Gli allineamenti delle sequenze nucleotidiche ottenute per l'intera Regione di Controllo e per la parte selezionata ai fini delle ricostruzioni filogenetiche sono riportati in Appendice I C.

### **3.3.2 Analisi della variabilità mediante *sliding windows***

Come già accennato, la base delle conoscenze riguardanti la variabilità a diversi livelli tassonomici della Regione di Controllo degli insetti prevede un grado di variabilità nucleotidica non omogeneo

lungo la regione. E' estremamente importante considerare questo aspetto se si intende utilizzare questo marcatore per analisi filogenetiche molecolari (Mardulyn *et al.*, 2003). Ai fini di una ricostruzione filogenetica, una scarsa variabilità non consentirebbe di ottenere un segnale filogenetico sufficiente per distinguere i taxa tra loro, così come una variabilità troppo elevata potrebbe risultare inutilizzabile a causa di un'elevata frequenza di eventi di sostituzioni multiple (*multiple hits*) in uno stesso sito, con il conseguente effetto di saturazione dei siti nucleotidici (Page & Holmes, 1998).

Per tale motivo si è reso opportuno analizzare preventivamente il grado di diversità nucleotidica lungo l'intera sequenza di Regione di Controllo, allo scopo di selezionare una zona che presentasse una variabilità adatta per condurre le successive analisi filogenetiche.

Allo scopo di analizzare il grado di variabilità nucleotidica delle varie parti della Regione di Controllo dei *Meligethes* sono state confrontate le sequenze complete di otto esemplari di *M. thalassophilus* mediante il programma SWAAP 1.0.0 (Pride, 2000). Questo *software* permette di stimare la variabilità lungo un allineamento di sequenze mediante un'analisi che comprende l'uso di una "finestra mobile" (*sliding window*): questo tipo di analisi permette di calcolare in modo iterativo un indice di similarità medio (corrispondente ad una percentuale di identità media tra le sequenze) corrispondente al numero di nucleotidi invariati rispetto al numero totale dei nucleotidi compresi all'interno di una "finestra" (*sliding window*) comprensiva di un numero di basi imposto. La finestra scorre lungo l'allineamento di un numero di basi nucleotidiche prescelto, e il *software* ricalcola ogni volta l'indice medio di similarità.

L'analisi di variabilità tramite "*sliding windows*" è stata condotta sia per la *porzione TM* che per la *porzione SR* della Regione di Controllo dei *Meligethes* utilizzando una "finestra" di 40 basi nucleotidiche, con successivi spostamenti della stessa lungo l'allineamento di una singola base, eliminando dall'analisi i siti nucleotidici contenenti *gap*.

### **3.3.3 Analisi molecolare delle sequenze**

Le analisi ed il confronto delle sequenze nucleotidiche della Regione di Controllo sono state condotte mediante l'uso dei programmi MEGA ver.2.1 (Kumar *et al.*, 2001) e DnaSP ver. 3.5.1 (Rozas & Rozas, 1999).

Dall'allineamento delle sequenze sono stati calcolati i seguenti parametri:

- composizione nucleotidica (frequenze medie dei quattro nucleotidi)
- rapporto medio transizioni/transversioni (Ti/Tv)

- numero dei siti variabili (s.v.)
- numero siti informativi per la Massima Parsimonia

Le divergenze tra le sequenze, a livello intra- ed inter-specifico, sono state calcolate come distanze  $p$  (*proportion*, numero di differenze nucleotidiche diviso il numero totale di siti confrontati) (Nei & Kumar, 2000) e riportate sotto forma di matrici. Le distanze genetiche  $p$  sono state quindi inizialmente calcolate per i confronti a coppie tra tutti gli individui saggiati. La distanza  $p$  è una stima piuttosto grossolana dell'effettivo numero di cambiamenti evolutivi avvenuti: uno stesso sito potrebbe aver subito ripetute mutazioni nel corso del tempo, cosicché il nucleotide osservato potrebbe essere il risultato ultimo di una serie di sostituzioni. Come già ricordato, gli eventi di sostituzione multipla (o *multiple hits*) aumentano al crescere del tempo di divergenza tra le sequenze e portano ad un effetto di saturazione (Page & Holmes, 1998). A causa di questo effetto, le sostituzioni più recenti non sono più distinguibili da quelle più remote, e dunque mediante il solo calcolo delle differenze nucleotidiche si sottostimano le reali modificazioni intercorse, soprattutto tra le sequenze più divergenti. Per tale motivo è spesso opportuno adottare anche dei metodi di correzione delle distanze, i quali prevedono il riferimento ad un modello evolutivo che prende in considerazione vari parametri (frequenza di sostituzioni delle basi, rapporto di transizioni e transversioni, indice di forma della distribuzione gamma, ed altri eventuali parametri).

Le distanze genetiche per i confronti a coppie tra tutti gli individui saggiati sono state quindi ricalcolate e corrette secondo un modello evolutivo selezionato mediante il programma Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998).

### 3.3.4 Scelta dei modelli di evoluzione molecolare

Come già accennato la divergenza tra due sequenze può essere misurata semplicemente come percentuale di nucleotidi differenti, ma, nel caso si voglia tener conto di possibili eventi di sostituzioni multiple e retrosostituzioni, può essere calcolata utilizzando opportuni modelli matematici che considerano la natura stocastica della mutazione genica (Goldman, 1993; Yang, 1996; Page & Holmes, 1998; Nei & Kumar, 2000).

Ciascun modello è basato su una serie di assunzioni *a priori* che riguardano il modo in cui evolvono i siti nucleotidici, la probabilità con cui si verificano le mutazioni in ciascun sito, la probabilità che un certo tipo di sostituzione si verifichi e la composizione in basi delle sequenze.

Con lo scopo di individuare il modello di evoluzione molecolare più conforme ai dati a disposizione, le sequenze nucleotidiche sono state analizzate utilizzando il programma Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998). Attraverso il *likelihood ratio test* (LRT) vengono confrontati

diversi modelli evolutivi via via più sofisticati e complessi attraverso una struttura gerarchica implementata in Modeltest 3.06 (Felsenstein, 1981; 1988; Goldman, 1993; Huelsenbeck & Rannala, 1997; Posada & Crandall, 2001a) (figura 9).

Il *likelihood ratio test* (LRT) viene calcolato attraverso la formula:

$$\delta = 2 \log \lambda$$

dove  $\lambda$  è pari a:

$$= \frac{\max [Lo (\text{modello nullo} | \text{dati})]}{\max [L1 (\text{modello nullo} | \text{dati})]}$$

Lo = *likelihood* dell'ipotesi nulla (modello semplice)

L1 = *likelihood* dell'ipotesi alternativa (modello più complesso)

In questo modo, il programma può comparare i valori di *likelihood* di differenti modelli e scegliere quello con il punteggio (*log likelihood scores*) più elevato.

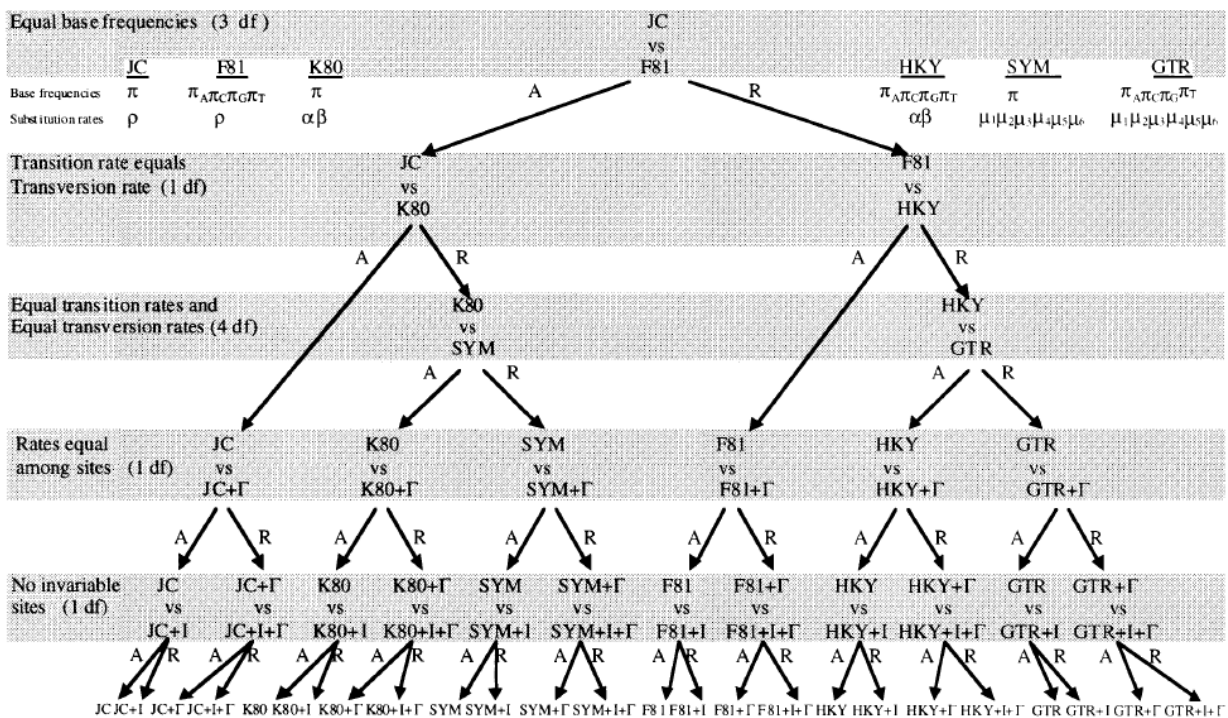


Figura 9 – Struttura gerarchica sviluppata da Modeltest (da Posada & Crandall, 1998)

Figure 9 – Hierarchical hypothesis testing in Modeltest (from Posada & Crandall, 1998)

Il programma calcola inoltre alcuni parametri che caratterizzano i tassi di eterogeneità (tassi di sostituzione nucleotidica tra i siti). Vengono prese in considerazione due distribuzioni statistiche comunemente utilizzate per descrivere le variazioni tra i siti nucleotidici. La distribuzione continua

gamma ( $\Gamma$ ) implica un parametro di forma (*shape* =  $\alpha$ ) che specifica il tasso di variazione per i vari siti; minore è il valore di  $\alpha$ , maggiore è la differenza tra i tassi di variazione dei siti (Yang, 1994). Il modello di distribuzione discreta, detto “*Invariable-sites model*”, assume che alcuni siti variano tutti con lo stesso tasso, mentre gli altri (*invariable sites*) non sono in grado di accettare sostituzioni nucleotidiche (Hasegawa *et al.*, 1985).

Il modello ed i parametri che caratterizzano i tassi di eterogeneità definiti da Modeltest 3.06 sono stati in seguito utilizzati completamente o in parte a seconda dei casi per le analisi di ricostruzione filogenetica basate su quattro diversi metodi, il *Neighbor-Joining*, la Massima Parsimonia, la Massima Verosimiglianza e l'Analisi Bayesiana.

### 3.4 Metodi di ricostruzione filogenetica

Le relazioni evolutive che intercorrono tra le sequenze nucleotidiche possono essere rappresentate in forma grafica mediante un albero filogenetico. La topologia di un albero è l'insieme delle relazioni descritte dai nodi e dai rami dell'albero stesso.

Esistono numerosi metodi che permettono di ricostruire alberi filogenetici a partire da dati molecolari. Solitamente si distinguono, a seconda del tipo di algoritmo utilizzato, due categorie di metodi: metodi di *clustering* (ad es. *Neighbor-Joining*) e metodi di ottimizzazione (ad es., Massima Parsimonia e Massima Verosimiglianza).

Queste due categorie equivalgono rispettivamente ai metodi basati sulle distanze (*Distance Methods*) e ai metodi basati sui caratteri o metodi discreti (*Character Methods*).

Nei primi le sequenze allineate vengono utilizzate per compilare una matrice di distanza tra tutte le possibili coppie di taxa in studio, successivamente impiegata per costruire l'albero attraverso un algoritmo di *clustering*.

Diversamente, nei metodi discreti vengono presi in considerazione direttamente i siti nucleotidici quali caratteri descrittivi delle entità tassonomiche oggetto di analisi.

Nel presente studio gli alberi evolutivi sono stati ottenuti mediante l'applicazione di quattro differenti metodi di ricostruzione filogenetica:

- *Neighbor-joining* (NJ; Saitou & Nei, 1987)
- Massima Parsimonia (*Maximum Parsimony*, MP; Fitch, 1971)
- Massima Verosimiglianza (*Maximum likelihood*, ML; Felsenstein, 1981)
- Analisi Bayesiana (Rannala & Yang, 1996).

L'applicazione di questi metodi per la ricerca degli alberi e il calcolo degli indici statistici che ne descrivono le caratteristiche sono stati condotti con l'ausilio dei programmi PAUP\* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony \*and Other Methods*) ver. 4.0b10 per MS-WINDOWS (Swofford, 2002) e MRBAYES (*Bayesian inference of phylogenetic trees*) (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

I file *nexus* compilati su PAUP\* 4.0b10 per MS-WINDOWS e utilizzati per condurre le analisi filogenetiche sono riportati in Appendice III.

Come già accennato precedentemente, dal momento che non è stato possibile ottenere le sequenze di Regione di Controllo del taxon di riferimento *M. aeneus*, utilizzato come taxon di confronto (*outgroup*) nelle analisi filogenetiche molecolari finora condotte per il sottogruppo di *M. coracinus*, né disponendo di sequenze allineabili e confrontabili di taxa potenzialmente utilizzabili in

alternativa a *M. aeneus*, tutte le ricostruzioni filogenetiche attraverso i differenti metodi sono state condotte senza specificare una sequenza *outgroup*. Gli alberi filogenetici ottenuti dalle elaborazioni vengono dunque rappresentati non radicati (*unrooted trees*); tuttavia, in alcuni casi, per facilitarne la visualizzazione grafica, alcuni alberi sono stati radicati arbitrariamente in un secondo momento con l'unico esemplare disponibile di *M. sp. cfr. coracinus* (CRb1.1) mediante il *software* TreeView 1.5 (Page, 1996).

### 3.4.1 Neighbor-Joining (NJ)

Il *Neighbor-Joining* (NJ) è un metodo concettualmente correlato alle tradizionali analisi dei gruppi (*cluster analysis*) ma, a differenza di queste, non assume che i dati siano ultrametrici (ovvero, non assume che i tassi di sostituzione nucleotidica siano gli stessi per tutte le linee evolutive). Questo metodo non è altro che la versione semplificata del metodo di *Minimum Evolution* (ME, Rzhetsky & Nei, 1993). L'albero filogenetico viene ottenuto mediante un procedimento matematico iterativo di addizione successiva dei taxa: si parte da una matrice iniziale di distanze genetiche e si raggruppano le sequenze più "vicine" per costruire una nuova matrice che posseda in entrata i due taxa accorpati in un singolo elemento. Questo processo di accoppiamento delle unità tassonomiche più vicine tra loro, a cui corrisponde una serie di rimodellamenti simultanei nella topologia dell'albero in costruzione, continua fino a che tutti i nodi non vengano risolti, ossia trasformati da punti di divergenza multipla a punti di origine di biforcazioni univoche (Rzhetsky & Nei, 1993; Nei, 1996; Nei & Kumar, 2000). Da questo processo si ottiene un unico albero filogenetico che può costituire una base di partenza per successive analisi di ricostruzione di alberi basate su altri metodi, come la Massima Parsimonia (*Maximum Parsimony*) e la Massima Verosimiglianza (*Maximum Likelihood*).

### 3.4.2 Massima Parsimonia (MP)

Il metodo di *Massima Parsimonia* (MP) utilizza tutta l'informazione contenuta nei dati operando direttamente sui singoli caratteri piuttosto che su matrici di distanza. Introdotto inizialmente da Edwards & Cavalli-Sforza (1963) sotto il nome di "Metodo dell'Evoluzione Minima", fu poi utilizzato da Camin & Sokal (1965) per lo studio dell'evoluzione dei caratteri morfologici. Gli algoritmi per l'applicazione del metodo ai dati molecolari furono poi messi a punto prima da Eck e Dayhoff (1966), poi da Kluge e Farris (1969) e infine da Fitch (1971). Il metodo di *Massima Parsimonia* si basa sul principio del "Rasoio di Ockham", il quale stabilisce che nella scelta delle possibili spiegazioni di un certo fenomeno occorre preferire la più semplice, cioè quella che

richiede meno ipotesi *ad hoc*. In altre parole, l'ipotesi migliore per spiegare un processo è quella che richiede il minor numero di assunzioni. Nel caso delle ricostruzioni filogenetiche, la spiegazione più semplice che descrive l'evoluzione di un certo insieme di caratteri tassonomici è quella che richiede il minor numero di cambiamenti evolutivi o, più specificatamente, il minor numero di transizioni di stato dei caratteri. I possibili alberi filogenetici risultanti da un'analisi così condotta corrispondono, dunque, a quelli che minimizzano il numero di cambiamenti di stato dei caratteri e che assumono il minor numero di eventi evolutivi (in questo caso di mutazioni) per spiegare i dati osservati. In un'analisi di Parsimonia su dati molecolari vengono considerati solamente i siti per i quali sono rilevabili almeno due differenti tipi di sostituzione nucleotidica con ciascun tipo di sostituzione presente almeno due volte nell'intero insieme di sequenze in studio (siti informativi per la parsimonia).

La costruzione dell'albero MP richiede quindi la costruzione di tutte le possibili topologie e il calcolo del numero minimo di sostituzioni (detto anche lunghezza dell'albero) per ogni topologia. Da questo calcolo sono ovviamente escluse le posizioni che non mostrano sostituzioni e quelle sostituzioni che compaiono una sola volta (*singleton sites*).

Dato l'elevato numero di taxa e di caratteri da esaminare, l'analisi di Parsimonia è stata condotta attraverso una ricerca euristica dell'albero filogenetico (Swofford & Berlocher, 1987; Nei & Kumar, 2000). In questo contesto, una ricerca euristica è un procedimento nel quale vengono esaminati soltanto alcune topologie costruendo, in un primo tempo, un albero provvisorio attraverso un algoritmo di addizione graduale (*stepwise addition algorithm*). Successivamente, l'albero provvisorio viene sottoposto ad una sorta di scambio dei rami (*branch swapping*) utilizzando un determinato algoritmo al fine di trovare l'albero più parsimonioso. In questo studio è stato scelto l'algoritmo *tree bisection-reconnection* (TBR) e si è proceduto mediante l'addizione casuale dei taxa. Il metodo di ricerca euristico è stato impostato per 100 repliche.

La costruzione di un albero MP implica l'assenza di retrosostituzioni e di sostituzioni parallele (omoplasia). Per dare una misura di quanto sia consistente l'albero con questa assunzione sono stati calcolati diversi indici (*Consistency Index* (CI), *Retention Index* (RI), *Rescaled Consistency Index* (RCI) (Farris, 1989; Quicke, 1993; Nei & Kumar, 2000). Gli indici CI, RI e RCI vengono calcolati prendendo in considerazione solamente i siti informativi per l'analisi di Parsimonia. E' stato calcolato inoltre il *tree length* (L) che rappresenta il numero totale di cambiamenti evolutivi avvenuti, ed è la somma del numero di transizioni di stato (*l*) verificatesi per ciascun sito nucleotidico (*i*). La ricerca di un albero filogenetico mediante la Massima Parsimonia tende a minimizzare il valore di L; questo, nelle fasi di ricerca dell'albero, viene assegnato come punteggio



(*score*) a ciascuna delle topologie sondate e quella che ottiene il punteggio più basso viene scelta come la più verosimile.

### 3.4.3 Massima Verosimiglianza (ML)

A differenza dei precedenti metodi che utilizzano un punto di vista ipotetico-deduttivo, quelli di Massima Verosimiglianza (*Maximum likelihood*, ML; Felsenstein, 1981) richiedono un modello probabilistico, trattando la stima della filogenesi come un problema statistico e la costruzione di un albero attraverso metodi di inferenza statistica (Siebert, 1992). Uno dei vantaggi di questo metodo è che risulta essere statisticamente consistente per definizione e consente l'impiego di modelli di evoluzione sofisticati e realistici; d'altra parte è estremamente dispendioso dal punto di vista computazionale, e non è utilizzabile per un numero elevato di taxa.

La verosimiglianza (L) di un'ipotesi è la probabilità (Pr) dei dati (D) data un'ipotesi (H):

$$L = \text{Pr} (D/H)$$

In un contesto di studi di filogenesi molecolare, la topologia in esame ed i suoi parametri rappresentano l'ipotesi (H), mentre le sequenze nucleotidiche o aminoacidiche corrispondono ai dati osservati (D). Quindi, la verosimiglianza (L) è la probabilità che delle sequenze nucleotidiche o aminoacidiche supportino una determinata topologia, ovvero un albero filogenetico. In altre parole, la massima verosimiglianza è la probabilità che i dati possano essere osservati in accordo con l'ipotesi formulata.

Ovviamente, ipotesi differenti avranno diversi valori di verosimiglianza ed il metodo di ML è in grado di valutare le diverse ipotesi selezionando opportunamente quelle con valori più alti di verosimiglianza.

I metodi ML cercano per ogni topologia le lunghezze dei rami che danno la massima verosimiglianza per quella topologia. La topologia che globalmente dà la massima verosimiglianza viene assunta a rappresentare l'albero filogenetico.

I valori di *likelihood* sono spesso molto piccoli e sono espressi quindi come logaritmi naturali (*log-likelihood*).

In sintesi, il metodo di *Maximum Likelihood* richiede che venga specificato un modello evolutivo, un albero filogenetico e i dati osservati.

Come per gli altri metodi, la Massima Verosimiglianza è stata applicata successivamente alla selezione del modello di evoluzione molecolare più adatto ottenuto da Modeltest 3.06.

### 3.4.4 Analisi Bayesiana

L'inferenza Bayesiana della filogenesi (Rannala & Yang, 1996; Mau & Newton, 1997; Mau *et al.*, 1999) è basata su una quantità chiamata *probabilità posteriore* di un albero. Il teorema di Bayes afferma:

$$\Pr (\text{Albero} | \text{Dati}) = \frac{\Pr (\text{Dati} | \text{Albero}) \times \Pr (\text{Albero})}{\Pr (\text{Dati})}$$

dove:

- $\Pr (\text{Albero} | \text{Dati})$  è la *probabilità posteriore* di un albero filogenetico
- $\Pr (\text{Dati} | \text{Albero})$  è la verosimiglianza (*likelihood*)
- $\Pr (\text{Albero})$  è la probabilità *a priori* di una filogenesi, ovvero la probabilità di un albero prima di raccogliere i dati; in teoria, a priori, tutti gli alberi sono considerati ugualmente probabili. Tuttavia, si possono utilizzare alcune informazioni, come ad esempio le conoscenze tassonomiche sul gruppo studiato, per fornire ad alcuni alberi probabilità a priori più elevate
- $\Pr (\text{Dati})$  è una costante normalizzata per assicurare che la somma delle probabilità posteriori sia pari ad uno

Le probabilità posteriori sono probabilità, basate su un modello, che vengono stimate successivamente all'acquisizione di conoscenze sui dati. La probabilità posteriore degli alberi filogenetici può essere interpretata come una probabilità, influenzata dai dati, dell'*i*-esimo albero. In altre parole, la probabilità posteriore di un albero è la probabilità che l'albero sia corretto (Huelsenbeck *et al.*, 2001), l'albero con la più alta probabilità posteriore potrebbe essere scelto come la migliore stima della filogenesi.

Le probabilità posteriori non possono essere calcolate analiticamente, ma possono essere approssimate con diversi metodi. Il metodo più utilizzato è quello delle Catene di Markov Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*, MCMC) (Metropolis *et al.*, 1953; Hastings, 1970; Green, 1995). I termini Metodo Monte Carlo o Simulazioni Monte Carlo si riferiscono alla sperimentazione mediante l'uso di numeri casuali (Simulazioni Stocastiche), mentre le Catene di Markov sono un modello di sequenze di eventi dove la probabilità di un evento dipende dal fatto che un evento precedente sia avvenuto. Nell'analisi Bayesiana della filogenesi l'MCMC permette di campionare dalla distribuzione delle probabilità posteriori un albero che viene utilizzato per "disturbare" in modo stocastico l'albero corrente; il nuovo albero potrà essere poi accettato o rifiutato con una certa probabilità; se il nuovo albero sarà accettato, verrà sottoposto successivamente ad un altro

“disturbo”. L’intero processo costituisce una “generazione” di una catena; la proporzione temporale con cui ogni albero viene “visitato” è un’approssimazione della probabilità posteriore dell’albero (Yang & Rannala, 1997; Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Huelsenbeck *et al.*, 2001; Lewis, 2001; Huelsenbeck *et al.*, 2002).

Come la Massima Parsimonia e la Massima Verosimiglianza, l’analisi Bayesiana è un metodo basato sui caratteri ed è applicato a ciascun sito nucleotidico dell’allineamento. Si comincia con un albero scelto casualmente con una certa combinazione di lunghezze dei rami, parametri di sostituzione e tasso di variabilità tra i siti in modo da definire lo stato iniziale della catena.

Attraverso il programma MrBayes è possibile indicare il numero di generazioni, il numero di catene, il numero di sostituzioni nucleotidiche e specificare se il tasso di sostituzione dei siti variabili segue una distribuzione gamma. All’aumentare del numero di generazioni il processo tenderà a stabilizzarsi su un insieme di alberi con più o meno gli stessi valori di *likelihood*, ovvero la catena converge verso un “valore stabile di *likelihood*”.

Per i dati relativi alla Regione di Controllo è stato scelto di eseguire quattro catene per un numero variabile di generazioni (vedi *file nexus* in Appendice III) indicando i parametri del modello selezionato da Modeltest 3.06.

L’albero ottenuto è equivalente ad un albero di consenso di *bootstrap* 50% *majority rule* (vedi paragrafo sul *Bootstrap*), ma invece dei valori di *bootstrap*, ai nodi è possibile leggere le probabilità posteriori (*posterior probability*).

### **3.4.5 Bootstrap**

Il *bootstrap* è una tecnica statistica di ricampionamento utilizzata per valutare il grado di confidenza dei risultati provenienti dall’analisi di un insieme di dati (Efron, 1982; Efron *et al.*, 1996). Questa tecnica viene applicata negli studi di filogenesi generando pseudorepliche dei caratteri, ovvero ricostruendo, tramite ricampionamento casuale dei nucleotidi, nuovi insiemi di sequenze. Se il numero originale di siti nucleotidici è pari a  $n$ ,  $n$  siti nucleotidici vengono scelti casualmente dalla matrice originale delle sequenze, con la possibilità che ogni sito possa eventualmente entrare nella nuova matrice di caratteri più di una volta. La nuova matrice, composta dagli  $n$  siti nucleotidici così campionati, costituisce un nuovo insieme di sequenze di DNA che viene utilizzato per costruire un albero filogenetico *ex-novo*. La topologia di questo nuovo albero viene confrontata con quella dell’originale e viene assegnato il punteggio di 1 (*valore di identità*) ad ogni nodo dell’albero filogenetico originale che corrisponde a quello dell’albero ottenuto per *bootstrap*. La procedura di ricampionamento dei siti nucleotidici, con la conseguente ricostruzione di un nuovo albero, viene replicata un certo numero di volte. Alla fine delle repliche viene calcolato l’*indice di bootstrap* per i

nodi, ossia la percentuale di volte in cui ogni nodo interno dell'albero originale ha ottenuto il valore di identità. I nodi con *indici di bootstrap* maggiori del 95% vengono considerati statisticamente "robusti" (Felsenstein, 1985), sebbene sia possibile considerare allo stesso modo nodi con valori anche minori, fino ad una soglia del 70%, e moderatamente robusti, invece, nodi con valori tra il 50% e il 70% (Hillis & Bull, 1993). Occorre tuttavia precisare che la versione originale del test di *bootstrap* proposto da Felsenstein (1985) - ed implementata in PAUP\* - è leggermente differente da quella appena esposta: nel metodo originale, infatti, il test non esamina l'affidabilità dell'albero ricostruito dai dati originali, ma valuta la robustezza dei nodi dell'albero di consenso risultante dalla somma degli alberi generati per ricampionamento. In questo caso la ricostruzione dell'albero di consenso e il calcolo degli indici di *bootstrap* avvengono simultaneamente. Gli alberi di consenso di *bootstrap* (il 50% *majority rule consensus tree* è il più utilizzato e presenta in sostanza una topologia in cui sono visualizzati come risolti i nodi per i quali il "branch pattern" si verifica con una frequenza maggiore o uguale al 50%) sono stati calcolati e considerati, nella maggior parte dei casi, come alberi filogenetici di riferimento per la discussione dei risultati.

Attraverso un'analisi di *bootstrap* è stata stimata la confidenza statistica dei nodi degli alberi filogenetici ottenuti dal metodo di NJ e da quello di MP. Per il metodo di ML invece, a causa di tempi di calcolo particolarmente lunghi, non è stato possibile stimare la confidenza dei nodi.

### **3.4.6 Ricostruzioni evolutive tramite network di Parsimonia statistica**

La stima delle relazioni genealogiche tra gli aplotipi di una popolazione presenta talvolta numerose difficoltà quando si utilizzano i tradizionali metodi di ricostruzione filogenetica. Infatti i metodi tradizionali (Massima Parsimonia, *Neighbor-joining*, Massima Verosimiglianza) si basano su una serie di assunzioni che spesso non risultano altrettanto valide quando si applicano per ricostruire le relazioni evolutive a livello di popolazione (Posada & Crandall, 2001b). Infatti, le relazioni genealogiche tra alleli campionati da individui appartenenti a diverse specie seguono, in genere, una struttura gerarchica e sono teoricamente rappresentabili mediante alberi filogenetici che seguono una ramificazione dicotomica secondo un modello di speciazione che prevede che da un antenato comune si sviluppino, per ogni evento di speciazione, due linee filetiche derivate. Questo perché l'isolamento riproduttivo permette, in un tempo adeguato, un accumulo di mutazioni tale da portare a fissare alleli differenti nelle due specie, le quali presenteranno alla fine del processo di speciazione due *pool* genetici ben distinti. Al contrario, le relazioni tra gli aplotipi campionati da individui appartenenti ad una stessa popolazione o a differenti popolazioni di una stessa specie non sono necessariamente gerarchiche, ma possono seguire una "evoluzione a reticolo", poiché la frequente ricombinazione di materiale genetico per riproduzione sessuale non permette di fissare gli alleli

nelle diverse popolazioni, e di conseguenza spesso gli aplotipi differiscono tra loro per un numero estremamente basso di mutazioni (Posada & Crandall, 2001b; Morrison, 2005). Se si esaminano su base genetica le relazioni evolutive a livello di popolazione è dunque molto probabile che un aplotipo possa rappresentare un “nodo interno”, ovvero un possibile antenato di due o più aplotipi (Clement *et al.*, 2000). I metodi tradizionali di ricostruzione filogenetica per lo studio delle relazioni a livello intraspecifico risultano, quindi, del tutto inadeguati poiché non prendono in considerazione tutti quei fenomeni che prevedono lo scambio frequente di materiale genetico tra taxa, e che violano di conseguenza alcune delle assunzioni a priori su cui si basano questi metodi.

L'applicazione delle metodologie classiche può risultare poco opportuna (portando ad alberi filogenetici scarsamente risolti, ovvero, ad alberi che presentano nella loro topologia numerose politomie) anche nel caso di una ricostruzione di relazioni filogenetiche tra taxa di recente origine, tra i quali è possibile supporre, in tempi più o meno recenti, fenomeni di ibridazione con conseguente introgressione di alleli, un'eventualità assimilabile allo scambio di materiale genetico che avviene tra organismi a livello intraspecifico.

In tutti quei casi in cui si ritiene che le assunzioni *a priori* dei metodi classici di ricostruzione filogenetica non risultino soddisfatte si opera una ricostruzione delle relazioni evolutive attraverso l'utilizzo di algoritmi di *network*. Le ricostruzioni tramite *network* permettono di estrapolare le informazioni genealogiche tra gli aplotipi assumendo la possibilità di processi di biforcazione multipla (formazione di “*loop*”) piuttosto che imporre delle relazioni evolutive all'interno di una struttura dicotomica ad albero.

Le *network*, in un contesto biologico, possono fornire una rappresentazione più verosimile riguardo la storia evolutiva degli aplotipi e dell'evoluzione dello stato dei caratteri tra antenati e discendenti, se si suppone che questi possano avere relazioni complesse e multiple, seguendo, quindi, ramificazioni non necessariamente dicotomiche; ad ogni modo l'interpretazione di un diagramma risultante da un'analisi di *network* deve essere affiancato da ulteriori evidenze biologiche (Morrison, 2005).

Uno dei metodi di ricostruzione tramite *network* è basato sulla Parsimonia Statistica sviluppata da Templeton *et al.* (1992) ed è implementato nel software TCS 1.8 (Clement *et al.*, 2000). Il programma, in primo luogo, riunisce le sequenze identiche in aplotipi unici e calcola la frequenza degli aplotipi all'interno dell'insieme dei dati. Le relazioni evolutive tra gli aplotipi vengono quindi analizzate impostando il *software* affinché i cladogrammi generati presentino un numero massimo di connessioni (ciascuna corrispondente ad uno *step* mutazionale) correlato alla scelta di un livello di probabilità di parsimonia, il quale può variare fino ad un massimo del 95%.

Oltre che per studi popolazionistici, il metodo di ricostruzione di *network* tramite Parsimonia Statistica viene normalmente utilizzato in concomitanza con i metodi tradizionali per la stima delle relazioni evolutive tra specie molto affini tra loro, o per le quali le relazioni tra alcune popolazioni conspecifiche o eterospecifiche risultino di difficile interpretazione utilizzando i classici metodi di ricostruzione filogenetica (Pestano, 2003; McCracken & Sorenson, 2005; Jordal *et al.*, 2006). In casi del genere, anche in questo studio sono state effettuate delle ricostruzioni evolutive tramite *network* utilizzando il *software* TCS.

### 3.5 Confronto tra i marcatori molecolari: Regione di Controllo e COI

Allo scopo di confrontare il grado di risoluzione del segnale filogenetico della Regione di Controllo rispetto a quello del gene della COI, prendendo in esame i medesimi campioni di alcune delle specie del sottogruppo di *M. coracinus* per cui si disponeva di dati di sequenza di entrambi i marcatori, sono stati calcolati mediante il *software* DNAsp gli indici *standard* di variabilità genetica intraspecifica, quali:

- il numero di aplotipi (**H**);
- il numero di siti segreganti (**S**), ovvero il numero di siti nucleotidici che risultano variabili all'interno di un allineamento di sequenze;
- il numero di siti segreganti per sito nucleotidico (**S/L**), ovvero il numero di siti variabili (**S**) diviso il numero di siti nucleotidici (**L**), il cui valore permette di confrontare la variabilità all'interno di due insiemi di dati corrispondenti rispettivamente ad allineamenti di sequenze di differente lunghezza;
- l'indice di diversità nucleotidica ( $\pi$ ), ovvero la media delle differenze nucleotidiche calcolata su tutti i possibili confronti a coppie delle sequenze comprese nell'allineamento, diviso il numero di siti nucleotidici.

Inoltre, dal momento che grazie agli studi precedenti si disponeva delle sequenze complete di COI per tutti gli esemplari utilizzati in questo lavoro di tesi (ad eccezione di AR 2.1 e TH 2.3), su questo insieme di dati sono state calcolate le distanze genetiche *p* intra ed inter-specifiche, e sono state effettuate le ricostruzioni filogenetiche secondo i metodi di *Neighbor-joining*, Massima Parsimonia, Massima Verosimiglianza e Analisi Bayesiana impostando gli stessi parametri di ricerca degli alberi filogenetici utilizzati per l'analisi dei dati della Regione di Controllo, ma imponendo un modello di sostituzione nucleotidica selezionato appositamente per i dati di COI dal programma Modeltest

3.06. Per alcuni degli esemplari, sulla base delle sequenze di COI, è stata infine effettuata una ricostruzione tramite *network* mediante il *software* TCS.

I risultati delle ricostruzioni filogenetiche ottenuti sia mediante i metodi classici, che mediante analisi di *network* per l'insieme dei dati considerati per la COI, vengono riportati ed utilizzati ai fini della discussione di questo studio (vedi *Discussione*).



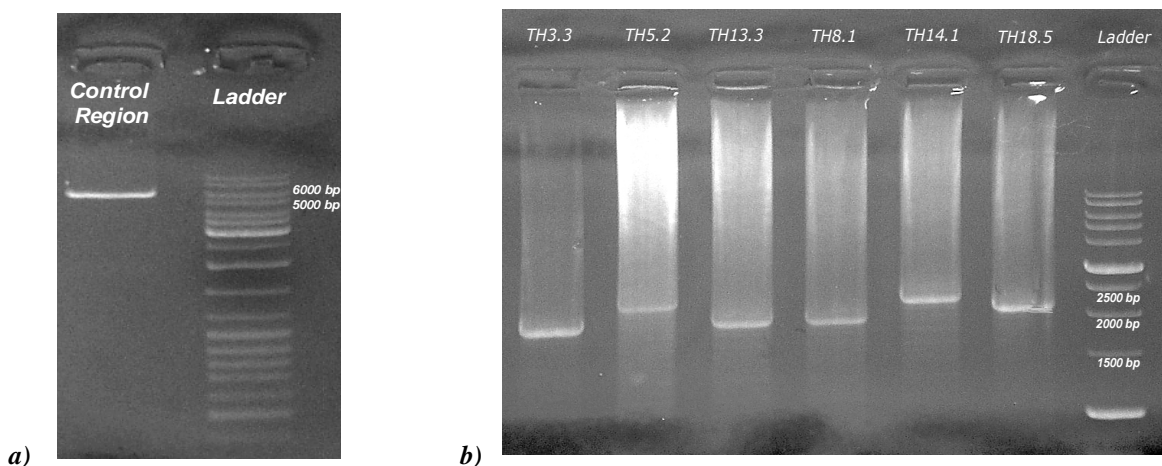
## 4. RISULTATI

### 4.1 Caratteristiche della Regione di Controllo nei *Meligethes*

Come nel caso di altre specie di Coleotteri, Ditteri e Ortotteri, la Regione di Controllo dei *Meligethes* si colloca all'interno del genoma mitocondriale tra il gene per il tRNA dell'isoleucina (Ile) e il gene per la subunità minore del RNA ribosomale (12S) (figura 11).

I dati sulla lunghezza totale della Regione di Controllo nei *Meligethes* derivano esclusivamente da corse elettroforetiche su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione dell'intera Regione ottenuti per alcuni campioni di *Meligethes thalassophilus*, e dal loro confronto con un marcatore di peso molecolare (*ladder*) (figura 10 a).

A livello intraspecifico il marcatore presenta una lunghezza totale che varia circa da 5000 a 6000 paia di basi. Si tratta dunque della Regione di Controllo tra le più lunghe finora caratterizzate e sequenziate per i coleotteri e, in generale, per gli insetti. Il polimorfismo di lunghezza sembra dovuto principalmente alla variabilità nella dimensione di una porzione che si trova nella parte più centrale del marcatore (definita, in seguito, *zona ipervariabile*). Infatti, l'allineamento delle sequenze della *porzione SR* e della *porzione TM* ottenute per tutti gli individui di *M. thalassophilus* esaminati presentano, a meno di alcuni limitati eventi di inserzione o delezione, un numero di nucleotidi sostanzialmente identico (Appendice I A, B). D'altra parte, malgrado non sia stato possibile ottenere dati di sequenza, se non frammentari, della porzione centrale del marcatore, le corse elettroforetiche degli amplificati ottenuti con una coppia di *primer* posizionata proprio alle estremità di questa zona del marcatore, hanno permesso di mettere in evidenza una consistente variabilità a livello intraspecifico della porzione centrale, che presenta in effetti una dimensione che varia dalle 1500 alle 2500 paia di basi (figura 10 b).



**Figura 10 – Corse su gel di agarosio dei prodotti PCR a) per l'intera Regione di Controllo b) porzione centrale della Regione di Controllo.**

*Figure 10 – Agarose gel runs for PCR products of a) the whole Control Region and of b) the central portion*

Sulla base dei dati di sequenza disponibili, seppure parziali, del tratto centrale del marcatore, è possibile rilevare la presenza di elementi ripetitivi di lunghezza variabile - dalle 81 alle 305 paia di basi - che si ripetono, interamente o parzialmente con diversa frequenza all'interno di questa specifica porzione. Si può dunque affermare che le differenze in lunghezza della Regione di Controllo nei *Meligethes* sono essenzialmente dovute a variazioni nel numero e nella dimensione degli elementi ripetitivi localizzati all'interno della zona centrale del marcatore, così come già noto per i coleotteri crisomelidi dei generi *Gonioctena* e *Chrysomela* in cui la variazione in lunghezza della Regione di Controllo sembra dovuta, anche in questo caso, a copie in numero variabile (12-17) di elementi ripetitivi di circa 107-159 paia di basi all'interno di una zona centrale estremamente variabile (Mardulyn *et al.*, 2003).

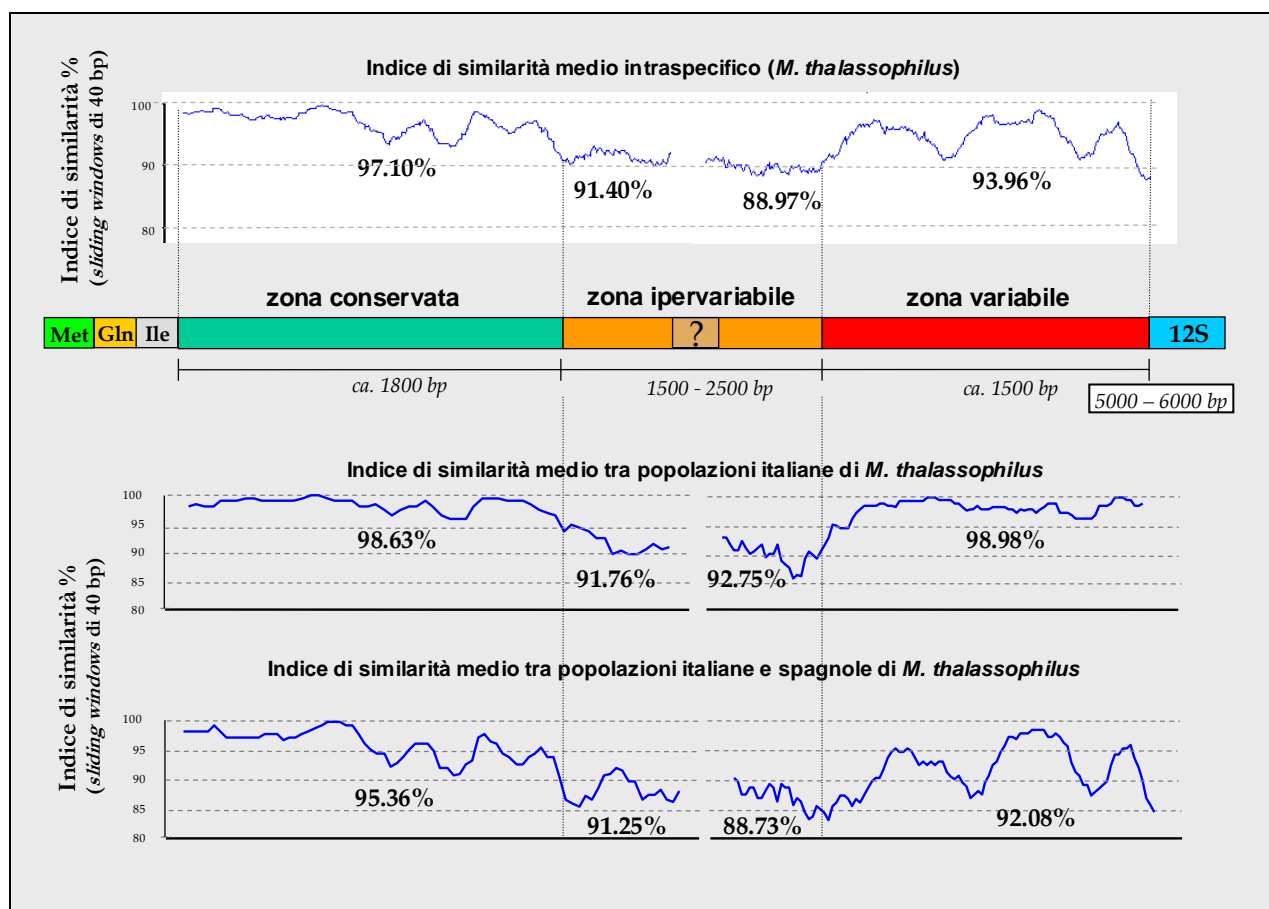
Per mancanza di dati sulla porzione centrale della Regione di Controllo nei *Meligethes* non è possibile valutare i valori riguardanti la composizione nucleotidica media dell'intero marcatore. Ad ogni modo la percentuale in contenuto medio di adenine e timine (A+T) delle sequenze parziali ottenute dai campioni di *M. thalassophilus* sia per la *porzione SR* che per la *porzione TM* è pari, in entrambi i casi, a circa il 77%. Il frammento di circa 800 paia di basi (selezionato per le analisi filogenetiche) ottenuto da tutti i campioni esaminati del sottogruppo di *M. coracinus* presenta in media una percentuale in contenuto di A e T pari all'81%. Se la percentuale del contenuto in A e T fosse mantenuta mediamente tra il 77% e l'81% anche all'interno dell'intera regione ipervariabile, questo valore nei *Meligethes* risulterebbe molto simile a quello noto per i coleotteri crisomelidi (75-82%), e, dunque, anch'esso estremamente basso rispetto al valore normalmente riscontrato in altri insetti per questo marcatore (Zhang & Hewitt, 1997).

L'analisi mediante *sliding windows* del livello medio di variabilità intraspecifico, effettuata mediante il confronto delle sequenze di *M. thalassophilus* sull'intera Regione di Controllo, consente di suddividere grossolanamente quest'ultima in tre zone a differente grado di variabilità (*figura 11*): una *zona conservata* (ca. 1800 bp) adiacente al gene per la isoleucina e corrispondente quasi totalmente alla *porzione TM*, una *zona ipervariabile* (ca. 1500-2500 bp) equivalente alla porzione centrale della Regione di Controllo, e una *zona variabile* (ca. 1500 bp) sita nelle immediate vicinanze del gene per il 12S, e corrispondente quasi totalmente alla *porzione SR*.

La presenza di zone a differente variabilità riflette quanto già noto sulle caratteristiche generali della Regione di Controllo degli insetti, come già discusso nella parte introduttiva; inoltre simili livelli di variabilità lungo la Regione sono stati riscontrati per i coleotteri crisomelidi dei generi *Gonioctena* e *Chrysomela* (Mardulyn *et al.*, 2003), per i quali, tuttavia, la zona centrale ipervariabile contenente

gli elementi ripetitivi risulta notevolmente più estesa, pari circa al 50% dell'intera sequenza su una lunghezza totale dell'intera regione di circa 3000-5000 bp.

Confrontando le sequenze dell'intera Regione di Controllo di tutti gli individui di *M. thalassophilus*, la *zona conservata* e la *zona variabile* presentano rispettivamente un'indice di similarità intraspecifico medio del 97.10% e del 93.96%, mentre i dati frammentari disponibili per la *zona ipervariabile* (composta esclusivamente di elementi ripetitivi) permettono di stimare un indice di similarità medio pari circa al 90% (figura 11).



**Figura 11 - Indice di similarità medio calcolato mediante *sliding windows* sulle sequenze dell'intera Regione di Controllo per individui di differente provenienza di *M. thalassophilus***

*Figure 11 - Similarity index computed by means of a sliding window along the whole Control Region sequences for samples belonging to different populations of *M. thalassophilus**

L'indice di similarità medio calcolato per le sequenze di esemplari conspecifici di diversa origine geografica (popolazioni italiane vs. popolazioni spagnole) di *M. thalassophilus*, sia per la zona conservata che per la zona variabile, risulta più ridotto rispetto a quello calcolato, invece, considerando solamente esemplari conspecifici di medesima provenienza geografica: infatti, come si può notare in *figura 11*, quando si passa dal confronto tra esemplari di medesima provenienza a

quello tra esemplari di differente origine geografica, l'indice di similarità medio relativo alla *zona variabile* del marcatore scende di circa 7 punti percentuale (dal 98.98% al 92,08%), mentre quello calcolato per la *zona conservata* scende, invece, di circa 4 punti percentuale (da 98.63% a 95.36%). La *zona ipervariabile*, come già accennato presenta, tra le tre zone a diversa variabilità del marcatore, l'indice di similarità medio più basso, soprattutto, anche in questo caso, quando si confrontano le sequenze di esemplari conspecifici di differente origine geografica. Malgrado il potenziale utilizzo di questa porzione ad elevata variabilità per studi evolutivi a livello intraspecifico, la presenza di elementi ripetitivi lascia supporre che, oltre a singole mutazioni puntiformi e ad eventi di duplicazione o delezione di basi nucleotidiche, alla base dell'evoluzione di questa zona del marcatore possano rivestire un ruolo importante anche meccanismi di "evoluzione concertata". Tali meccanismi possono portare, nel tempo, ad una parziale omogeneizzazione degli elementi ripetuti all'interno di una singola sequenza. Potrebbe risultare, dunque, del tutto fuorviante il confronto tra sequenze di diversi individui rispetto a questa particolare zona del marcatore, senza aver prima esaminato mediante uno studio preliminare l'entità dei differenti meccanismi evolutivi alla quale la zona ipervariabile della Regione di Controllo degli insetti sembra generalmente essere sottoposta (Zhang & Hewitt, 1997).

In ogni caso, sulla base dei dati disponibili si può affermare che i tassi di evoluzione sono piuttosto variabili lungo la Regione di Controllo dei *Meligethes*, e che alcune specifiche porzioni del marcatore raggiungono livelli di variabilità che potrebbero giustificare il loro utilizzo per condurre ricostruzioni filogenetiche a diversi livelli tassonomici, o, addirittura, per studi filogeografici o di genetica di popolazione.

Queste preliminari analisi di variabilità hanno permesso nell'ambito degli obiettivi di questo studio di operare la scelta di una porzione corrispondente alle prime 800 paia di basi della *zona variabile*, al fine di utilizzare questo stesso frammento per le successive ricostruzioni filogenetiche.

Dal confronto delle sequenze di Regione di Controllo dei *Meligethes* è inoltre possibile individuare due tratti estremamente conservati corrispondenti a due lunghi omopolimeri di timina, uno che varia dalle 15 alle 18 paia di basi, e che si trova all'interno della zona conservata a 681 nucleotidi dal gene per il tRNA dell'isoleucina, e un secondo omopolimero che varia dalle 23 alle 25 paia di basi, interno alla zona variabile a circa 577 paia di basi dal gene per il 12S (*figura 12*). Da un recente studio (Saito *et al.*, 2005) si ipotizza che gli omopolimeri di timina più estesi di 10 paia di basi possano effettivamente avere un ruolo funzionale nell'inizio della replicazione del DNA mitocondriale degli insetti. In particolare gran parte degli insetti omometaboli presentano un omopolimero di timina maggiore di 10 paia di basi esclusivamente sul filamento maggiore (+), la

cui funzione sembrerebbe quella di attivare la replicazione del filamento minore (Saito *et al.*, 2005). Entrambi gli omopolimeri presenti nella Regione di Controllo dei *Meligethes* potrebbero quindi avere un ruolo funzionale nel controllo dell'inizio della replicazione del DNA mitocondriale, sebbene tale eventualità e le modalità di funzionamento andrebbero approfondite più appropriatamente attraverso studi biochimici e molecolari.

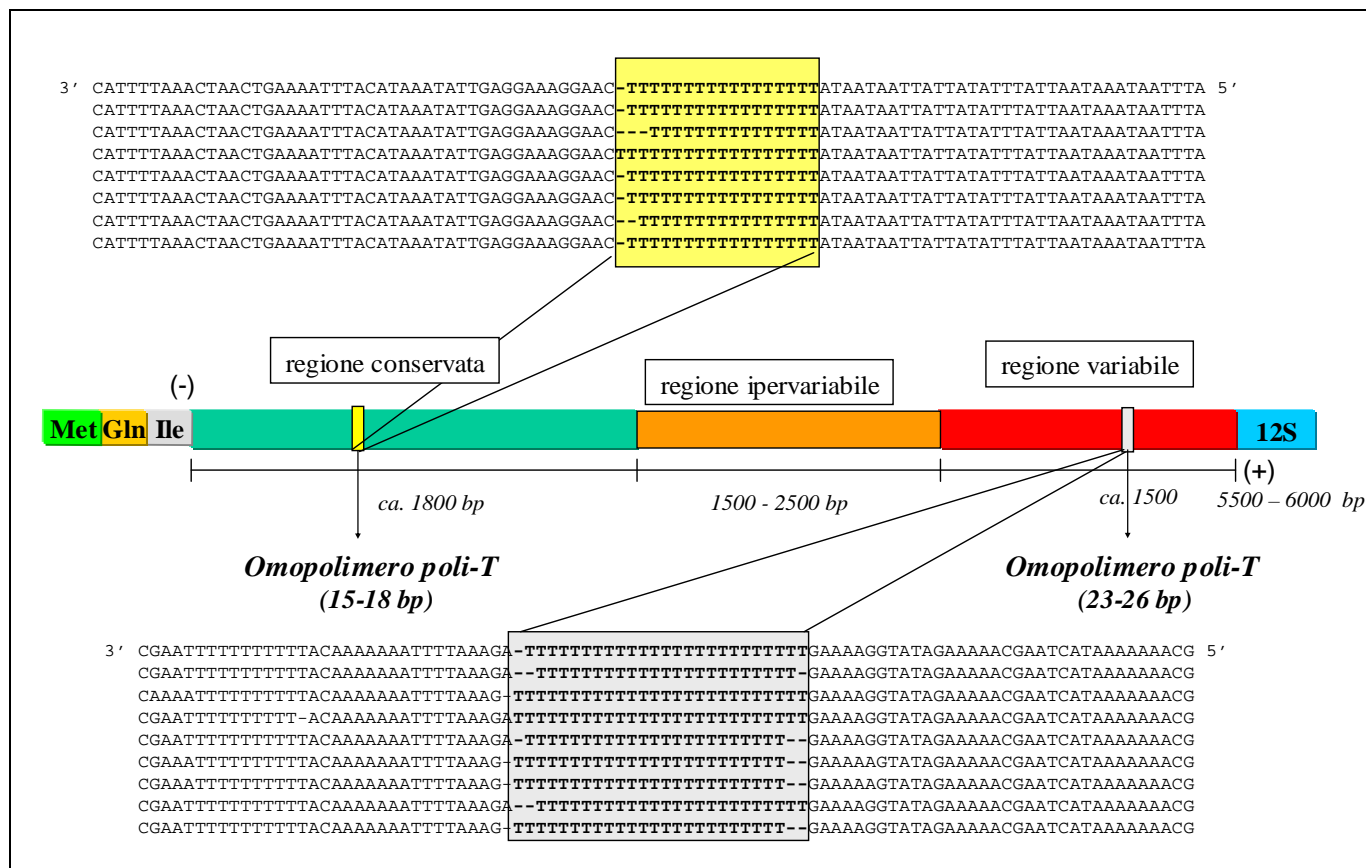


Figura 12 – Posizione degli omopolimeri di timina rilevati per la sequenza di Regione di Controllo dei *Meligethes*  
 Figure 12 – Positions of T-stretches along Control Region sequences in *Meligethes*

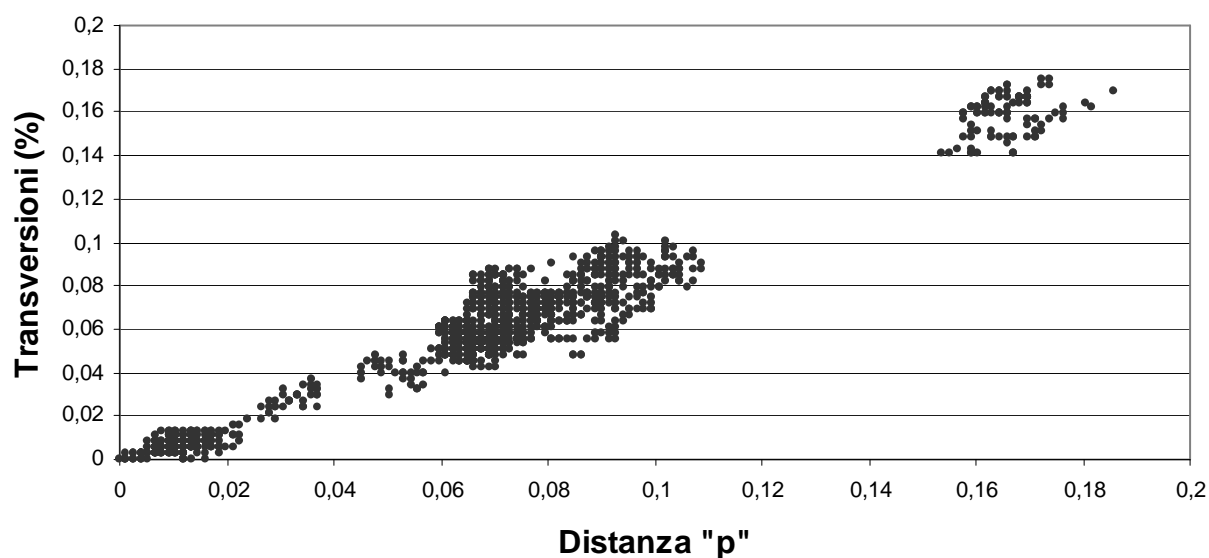
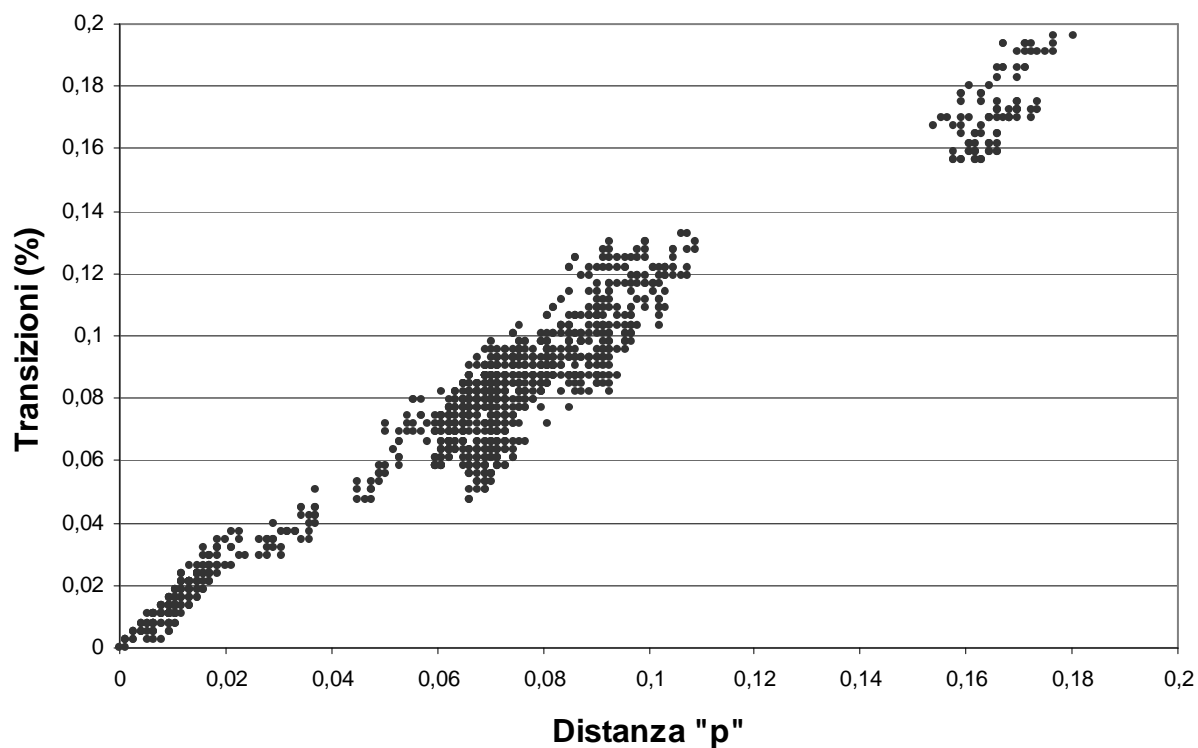
#### 4.2 Analisi e confronto delle sequenze di Regione di Controllo dei *Meligethes*

Ad eccezione di *M. cristofaroi*, *M. epeirosi* e *M. fulvipes*, la totalità delle sequenze nucleotidiche del tratto di *zona variabile* della Regione di Controllo ottenute da tutti gli esemplari esaminati delle diverse specie del sottogruppo di *M. coracinus* risultano allineabili con un buon grado di confidenza. Su un totale di 798 paia di basi, 276 (circa il 34%) siti nucleotidici risultano variabili, dei quali 229 risultano informativi per un'analisi filogenetica mediante il metodo di Massima Parsimonia. Tuttavia, in base all'allineamento di consenso ottenuto mediante il software S.O.A.P., risulta che l'inserzione di *gap*, corrispondenti a possibili eventi di delezione, avviene più frequentemente in concomitanza di brevi o lunghe sequenze omopolimeriche di adenine o timine

lungo la sequenza (Appendice I C). Le sequenze risultano, quindi, più o meno lunghe a seconda del numero di basi di cui sono composti i tratti omopolimerici, così che si passa da un numero di nucleotidi totali pari a 772 (*M. erysimicola* [ER12.1]) fino a 787 nucleotidi (*M. arankae*, [AR3.1]). Sebbene eventi di delezione e duplicazione siano frequenti nella Regione di Controllo, i siti che presentano *gap* non sono stati considerati in questo studio dal momento che errori dovuti a “scivolamento” sui tratti omopolimerici degli enzimi di polimerizzazione sia in fase di amplificazione che in fase di sequenziamento sono piuttosto comuni (Vila & Björklund, 2004), e dunque le inserzioni di *gap* all’interno dell’allineamento potrebbero non riferirsi a reali eventi di delezione ma, in una certa misura, ad artefatti dovuti alle tecniche utilizzate. Per le analisi filogenetiche e per il calcolo delle distanze genetiche si è deciso quindi di eliminare i 44 siti nucleotidici che presentavano *gap*, per cui sui rimanenti 754 siti nucleotidici, 489 risultano conservati e 265 variabili (circa il 35%) (con un numero totale di mutazioni pari a 337). Di questi siti variabili, 220 risultano essere informativi ai fini di una ricostruzione di Massima Parsimonia e 45 siti presentano invece mutazioni esclusive per un singolo taxon (*singleton*).

Le sequenze di Regione di Controllo di *M. cristofaroi*, *M. epeirosi* e *M. fulvipes* non presentano invece alcuna omologia né tra di loro, né con le sequenze di tutte le altre specie e risultano dunque non allineabili e inutilizzabili ai fini di una ricostruzione filogenetica. Inoltre il medesimo tratto di sequenza per queste specie presenta differenti lunghezze: ridotto a 558 e a 440 nucleotidi rispettivamente per *M. fulvipes* e *M. epeirosi*, e più esteso invece in *M. cristofaroi*, per il quale presenta una sequenza pari a 893 nucleotidi (Appendice I D). La difficoltà di allineamento di queste sequenze con il frammento corrispondente ottenuto per gli altri esemplari del sottogruppo di *M. coracinus* non permette di sostenere con certezza l’ipotesi di un sequenziamento effettivo anche per questi taxa di un tratto appartenente alla Regione di Controllo. Tuttavia alcune caratteristiche, quali il prevalente contenuto in A e T (62.2% per *M. fulvipes*, 70.68% per *M. epeirosi*, 66.5% per *M. cristofaroi*) sebbene più ridotto rispetto alla media (eventualità tuttavia plausibile nel caso dei coleotteri, vedi Mardulyn *et al.*, 2003), l’assenza di un eventuale *frame* di lettura per la traduzione in proteine, la mancanza di una estesa omologia con qualsiasi altra sequenza depositata nel *database* genetico mondiale di NCBI *Genbank*, e, non ultima, la ripetibilità e la specificità dei risultati prodotti dalle reazioni di PCR, lasciano supporre che si possa trattare, anche per questi taxa, della sequenza relativa alla porzione di Regione di Controllo selezionata per le analisi filogenetiche.

Come mostrato in *figura 13*, il confronto della frequenza sia delle transizioni, sia delle transversioni in funzione della distanza genetica *p* mostra un andamento di sostituzioni non ancora prossimo alla saturazione lungo l’intero intervallo di divergenza delle sequenze.



**Figura 13 – Andamento della saturazione dei siti nucleotidici della porzione di Regione di Controllo utilizzata per le analisi filogenetiche**

*Figure 13 – Saturation plots for Control Region sequences belonging to the samples analysed for Meligethes*

In *tabella 5* viene riportata la matrice dei valori delle distanze  $p$  intraspecifiche (calcolate come medie aritmetiche delle distanze tra gli individui appartenenti alla stessa specie) ed interspecifiche (calcolate come media aritmetica “pesata” - ovvero tenendo conto della variabilità intraspecifica di

ciascun gruppo - dell'insieme dei valori di distanza ottenuti dal confronto a coppie tra tutti gli individui delle specie analizzate).

**Tabella 5 –Matrice di distanze *p*: distanze intra- ed inter-specifiche per la Regione di Controllo**

*Table 5 – Intra- and inter-specific genetic divergences for Control Region (p distance)*

|                              |       | Distanze medie<br>intra-specifiche<br>(%) | Distanze medie inter-specifiche (%) |      |      |      |      |      |      |    |
|------------------------------|-------|---|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|----|
| Specie                       | Sigla |   | AR                                  | CR   | CRb  | ER   | LO   | MT   | LOb  | TH |
| <i>M. arankae</i>            | AR    | <b>4.31</b>                               | --                                  |      |      |      |      |      |      |    |
| <i>M. coracinus</i>          | CR    | <b>8.30</b>                               | 0.83                                | --   |      |      |      |      |      |    |
| <i>M. sp. cfr. coracinus</i> | CRb   | -   | 0.83                                | 1.33 | --   |      |      |      |      |    |
| <i>M. erysimicola</i>        | ER    | <b>5.96</b>                               | 0.73                                | 0.99 | 1.43 | --   |      |      |      |    |
| <i>M. longulus</i>           | LO    | -   | 4.03                                | 5.42 | 6.23 | 5.27 | --   |      |      |    |
| <i>M. matronalis</i>         | MT    | <b>0.93</b>                               | 4.54                                | 4.75 | 6.17 | 4.50 | 8.16 | --   |      |    |
| <i>M. sp.2 cfr. longulus</i> | LOb   | <b>0.44</b>                               | 0.69                                | 1.21 | 0.40 | 1.23 | 6.28 | 5.81 | --   |    |
| <i>M. thalassophilus</i>     | TH    | <b>6.22</b>                               | 1.19                                | 2.26 | 3.41 | 2.11 | 4.44 | 3.10 | 3.22 | -- |

I valori di distanza media *p* intraspecifica variano da 0.44% in *M. sp.2 cfr. longulus* a 8.30% in *M. coracinus*. Per *M. arankae*, *M. coracinus*, *M. erysimicola* e *M. thalassophilus* il livello di variabilità intraspecifico risulta spesso più elevato quando si confronta questo valore con le distanze genetiche medie risultanti dal confronto a coppie con alcuni taxa morfologicamente ben distinti (*tabella 5*)

In *tabella 6* viene riportata nella parte inferiore la matrice di distanze genetiche *p* per i confronti a coppie tra tutti gli individui analizzati; come si può notare i livelli di distanza genetica *p* vanno da un minimo di 0.00% (confronto tra TH 14.1 vs. TH 15.1) ad un massimo di 18.57% (CR 16.2 vs. ER18.1).

Nella parte superiore della *tabella 6* è riportata la matrice di distanze corrette - secondo i parametri del modello evolutivo selezionato da Modeltest 3.06 - per i confronti a coppie tra tutti i campioni analizzati. Le distanze genetiche variano da un minimo di 0.00% (confronto tra TH 14.1 vs. TH 15.1) ad un massimo di 40.10% (CR 16.2 vs. ER18.1), o ad un valore massimo di 16.89% se si escludono tutti i confronti a coppie con gli esemplari spagnoli di *M. coracinus* (CR16.1 e CR 16.2).



**Tabella 6 – Matrice di distanza genetica per la Regione di Controllo: distanze  $p$  (in basso a sinistra), distanze corrette (in alto a destra)**

*Table 6 – Distance matrix for Control Region:  $p$  distances (lower left), corrected distances (upper right)*

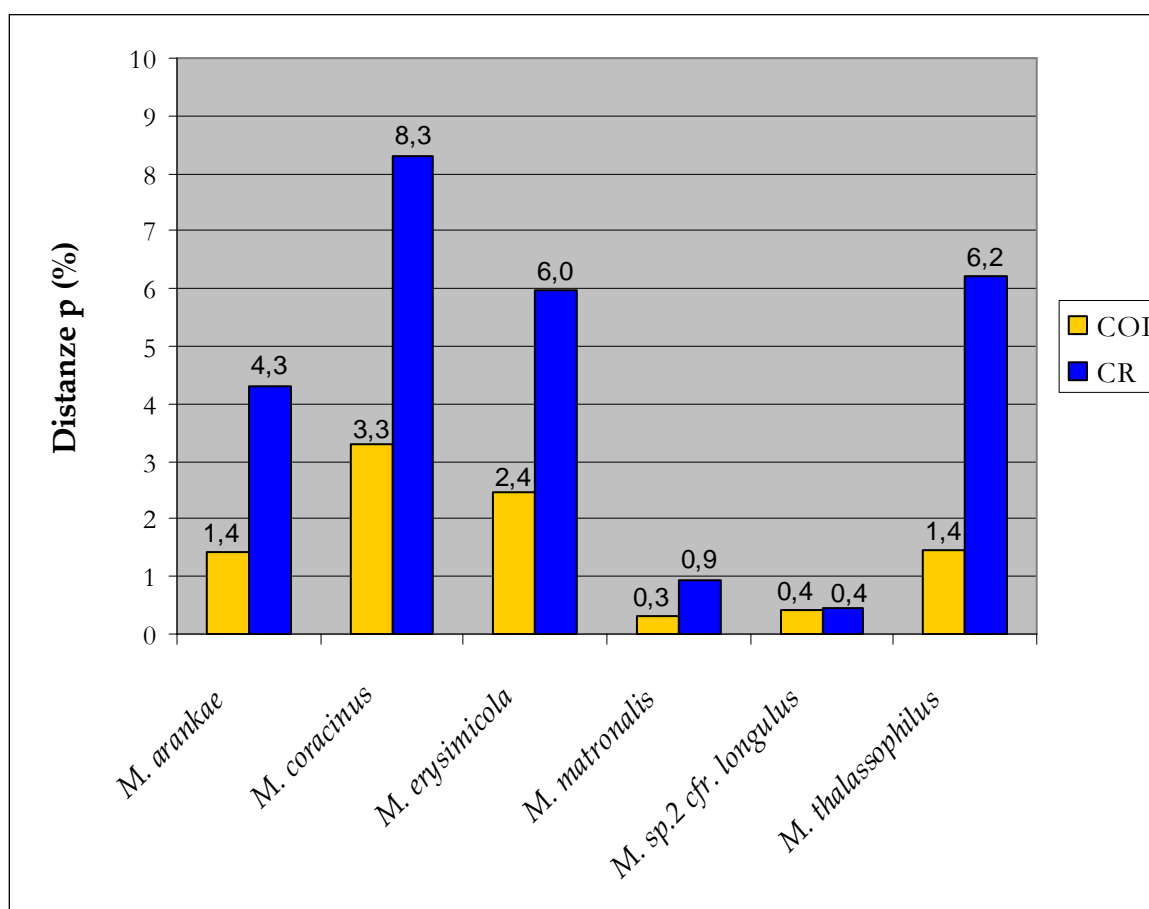
|         | AR 2.4 | AR 3.1 | AR 5.1 | AR 6.1 | AR 8.1 | AR 10.1 | AR 12.1 | AR 13.1 | CR 1.2 | CR 2.1 | CR 7.1 | CR 9.2 | CR 12.1 | CR 16.1 | CR 16.2 | CR 21.1 | CR 22.1 | CRb 1.1 | ER 2.1 | ER 4.1 | ER 5.1 | ER 7.1 | ER 12.1 | ER 13.1 | ER 14.1 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| AR 2.4  |        | 0.0054 | 0.0989 | 0.0930 | 0.0413 | 0.0926  | 0.0948  | 0.0955  | 0.0916 | 0.1282 | 0.1303 | 0.1069 | 0.0895  | 0.3238  | 0.3419  | 0.1009  | 0.0978  | 0.0891  | 0.1185 | 0.1279 | 0.1311 | 0.1237 | 0.0941  | 0.0928  | 0.0942  |
| AR 3.1  | 0.0053 |        | 0.0980 | 0.0922 | 0.0377 | 0.0918  | 0.0890  | 0.0897  | 0.0908 | 0.1271 | 0.1291 | 0.1008 | 0.0887  | 0.3206  | 0.3385  | 0.1000  | 0.0970  | 0.0835  | 0.1175 | 0.1268 | 0.1239 | 0.1168 | 0.0933  | 0.0871  | 0.0934  |
| AR 5.1  | 0.0743 | 0.0743 |        | 0.0040 | 0.0847 | 0.0111  | 0.0153  | 0.0139  | 0.0110 | 0.0793 | 0.0812 | 0.0184 | 0.0124  | 0.3226  | 0.3411  | 0.0139  | 0.0124  | 0.0110  | 0.1090 | 0.1039 | 0.1038 | 0.0990 | 0.0593  | 0.0181  | 0.0195  |
| AR 6.1  | 0.0703 | 0.0703 | 0.0040 |        | 0.0791 | 0.0069  | 0.0110  | 0.0097  | 0.0068 | 0.0738 | 0.0756 | 0.0140 | 0.0082  | 0.3132  | 0.3314  | 0.0097  | 0.0082  | 0.0068  | 0.1029 | 0.0979 | 0.0975 | 0.0928 | 0.0541  | 0.0138  | 0.0152  |
| AR 8.1  | 0.0358 | 0.0332 | 0.0663 | 0.0623 |        | 0.0826  | 0.0826  | 0.0852  | 0.0834 | 0.1198 | 0.1218 | 0.0940 | 0.0853  | 0.3015  | 0.3186  | 0.0882  | 0.0834  | 0.0792  | 0.1249 | 0.1306 | 0.1344 | 0.1270 | 0.0978  | 0.0885  | 0.0899  |
| AR 10.1 | 0.0703 | 0.0703 | 0.0106 | 0.0066 | 0.0650 |         | 0.0125  | 0.0111  | 0.0097 | 0.0782 | 0.0800 | 0.0171 | 0.0112  | 0.3114  | 0.3295  | 0.0127  | 0.0112  | 0.0069  | 0.0951 | 0.0903 | 0.1016 | 0.0968 | 0.0540  | 0.0168  | 0.0182  |
| AR 12.1 | 0.0716 | 0.0690 | 0.0146 | 0.0106 | 0.0650 | 0.0119  |         | 0.0040  | 0.0125 | 0.0812 | 0.0830 | 0.0182 | 0.0139  | 0.3188  | 0.3371  | 0.0155  | 0.0111  | 0.0111  | 0.1110 | 0.1059 | 0.1006 | 0.0959 | 0.0629  | 0.0123  | 0.0166  |
| AR 13.1 | 0.0716 | 0.0690 | 0.0133 | 0.0093 | 0.0663 | 0.0106  | 0.0040  |         | 0.0097 | 0.0798 | 0.0816 | 0.0169 | 0.0111  | 0.3250  | 0.3436  | 0.0141  | 0.0097  | 0.0097  | 0.1097 | 0.1045 | 0.0958 | 0.0912 | 0.0615  | 0.0096  | 0.0138  |
| CR 1.2  | 0.0690 | 0.0690 | 0.0106 | 0.0066 | 0.0650 | 0.0093  | 0.0119  | 0.0093  |        | 0.0762 | 0.0780 | 0.0141 | 0.0013  | 0.3194  | 0.3378  | 0.0055  | 0.0040  | 0.0083  | 0.1078 | 0.1027 | 0.0993 | 0.0946 | 0.0580  | 0.0125  | 0.0139  |
| CR 2.1  | 0.0915 | 0.0915 | 0.0623 | 0.0584 | 0.0875 | 0.0610  | 0.0637  | 0.0623  | 0.0597 |        | 0.0013 | 0.0845 | 0.0781  | 0.3062  | 0.3236  | 0.0769  | 0.0782  | 0.0787  | 0.1386 | 0.1417 | 0.1378 | 0.1303 | 0.0973  | 0.0831  | 0.0845  |
| CR 7.1  | 0.0928 | 0.0928 | 0.0637 | 0.0597 | 0.0889 | 0.0623  | 0.0650  | 0.0637  | 0.0610 | 0.0013 |        | 0.0013 | 0.0799  | 0.3027  | 0.3199  | 0.0788  | 0.0800  | 0.0805  | 0.1407 | 0.1438 | 0.1400 | 0.1325 | 0.0992  | 0.0850  | 0.0864  |
| CR 9.2  | 0.0782 | 0.0756 | 0.0172 | 0.0133 | 0.0716 | 0.0159  | 0.0172  | 0.0159  | 0.0133 | 0.0650 | 0.0663 |        | 0.0156  | 0.3339  | 0.3527  | 0.0112  | 0.0156  | 0.0141  | 0.1195 | 0.1142 | 0.1112 | 0.1063 | 0.0657  | 0.0197  | 0.0243  |
| CR 12.1 | 0.0676 | 0.0676 | 0.0119 | 0.0080 | 0.0663 | 0.0106  | 0.0133  | 0.0106  | 0.0013 | 0.0610 | 0.0623 | 0.0146 |         | 0.3194  | 0.3378  | 0.0068  | 0.0054  | 0.0097  | 0.1099 | 0.1048 | 0.1014 | 0.0967 | 0.0597  | 0.0111  | 0.0124  |
| CR 16.1 | 0.1658 | 0.1658 | 0.1618 | 0.1578 | 0.1592 | 0.1578  | 0.1605  | 0.1618  | 0.1592 | 0.1605 | 0.1592 | 0.1658 | 0.1592  |         | 0.0066  | 0.3213  | 0.3230  | 0.3139  | 0.3097 | 0.3221 | 0.3534 | 0.3444 | 0.3001  | 0.3331  | 0.3307  |
| CR 16.2 | 0.1698 | 0.1698 | 0.1658 | 0.1618 | 0.1631 | 0.1618  | 0.1645  | 0.1658  | 0.1631 | 0.1645 | 0.1631 | 0.1698 | 0.1631  | 0.0066  |         | 0.3398  | 0.3416  | 0.3320  | 0.3275 | 0.3405 | 0.3733 | 0.3551 | 0.3171  | 0.3519  | 0.3493  |
| CR 21.1 | 0.0743 | 0.0743 | 0.0133 | 0.0093 | 0.0676 | 0.0119  | 0.0146  | 0.0133  | 0.0053 | 0.0597 | 0.0610 | 0.0106 | 0.0066  | 0.1605  | 0.1645  |         | 0.0068  | 0.0112  | 0.1133 | 0.1081 | 0.1069 | 0.1021 | 0.0622  | 0.0185  | 0.0198  |
| CR 22.1 | 0.0729 | 0.0729 | 0.0119 | 0.0080 | 0.0650 | 0.0106  | 0.0106  | 0.0093  | 0.0040 | 0.0610 | 0.0623 | 0.0146 | 0.0053  | 0.1605  | 0.1645  | 0.0066  |         | 0.0097  | 0.1100 | 0.1049 | 0.0993 | 0.0946 | 0.0598  | 0.0139  | 0.0153  |
| CRb 1.1 | 0.0676 | 0.0650 | 0.0106 | 0.0066 | 0.0623 | 0.0066  | 0.0106  | 0.0093  | 0.0080 | 0.0610 | 0.0623 | 0.0133 | 0.0093  | 0.1578  | 0.1618  | 0.0106  | 0.0093  |         | 0.0989 | 0.0981 | 0.0979 | 0.0932 | 0.0584  | 0.0139  | 0.0183  |
| ER 2.1  | 0.0849 | 0.0849 | 0.0796 | 0.0756 | 0.0889 | 0.0716  | 0.0809  | 0.0796  | 0.0782 | 0.0955 | 0.0968 | 0.0849 | 0.0796  | 0.1592  | 0.1631  | 0.0809  | 0.0796  | 0.0729  |        | 0.0196 |        |        | 0.1151  | 0.1138  | 0.1146  |
| ER 4.1  | 0.0902 | 0.0902 | 0.0769 | 0.0729 | 0.0928 | 0.0690  | 0.0782  | 0.0769  | 0.0756 | 0.0968 | 0.0981 | 0.0822 | 0.0769  | 0.1618  | 0.1658  | 0.0782  | 0.0769  | 0.0729  | 0.0186 |        |        |        | 0.1200  | 0.1187  | 0.1094  |
| ER 5.1  | 0.0889 | 0.0862 | 0.0729 | 0.0690 | 0.0902 | 0.0716  | 0.0716  | 0.0690  | 0.0703 | 0.0915 | 0.0928 | 0.0769 | 0.0716  | 0.1698  | 0.1737  | 0.0743  | 0.0703  | 0.0690  | 0.0822 | 0.0849 |        | 0.0084 | 0.0818  | 0.1007  | 0.1077  |
| ER 7.1  | 0.0849 | 0.0822 | 0.0703 | 0.0663 | 0.0862 | 0.0690  | 0.0690  | 0.0663  | 0.0676 | 0.0875 | 0.0889 | 0.0743 | 0.0690  | 0.1671  | 0.1698  | 0.0716  | 0.0676  | 0.0663  | 0.0809 | 0.0836 | 0.0080 | 0.0637 | 0.0796  | 0.0960  | 0.1029  |
| ER 12.1 | 0.0716 | 0.0716 | 0.0491 | 0.0451 | 0.0743 | 0.0451  | 0.0517  | 0.0504  | 0.0477 | 0.0743 | 0.0756 | 0.0531 | 0.0491  | 0.1592  | 0.1631  | 0.0504  | 0.0491  | 0.0477  | 0.0557 | 0.0544 | 0.0637 | 0.0623 |         | 0.0647  | 0.0661  |
| ER 13.1 | 0.0703 | 0.0676 | 0.0172 | 0.0133 | 0.0690 | 0.0159  | 0.0119  | 0.0093  | 0.0119 | 0.0650 | 0.0663 | 0.0186 | 0.0106  | 0.1658  | 0.1698  | 0.0172  | 0.0133  | 0.0133  | 0.0849 | 0.0822 | 0.0716 | 0.0690 | 0.0531  |         | 0.0040  |
| ER 14.1 | 0.0716 | 0.0716 | 0.0186 | 0.0146 | 0.0703 | 0.0172  | 0.0159  | 0.0133  | 0.0133 | 0.0663 | 0.0676 | 0.0225 | 0.0119  | 0.1658  | 0.1698  | 0.0186  | 0.0146  | 0.0172  | 0.0836 | 0.0809 | 0.0756 | 0.0729 | 0.0544  | 0.0040  |         |
| ER 15.1 | 0.0703 | 0.0676 | 0.0186 | 0.0146 | 0.0690 | 0.0159  | 0.0119  | 0.0093  | 0.0133 | 0.0650 | 0.0663 | 0.0212 | 0.0119  | 0.1645  | 0.1684  | 0.0186  | 0.0146  | 0.0146  | 0.0849 | 0.0822 | 0.0743 | 0.0716 | 0.0557  | 0.0027  | 0.0066  |
| ER 16.1 | 0.0716 | 0.0690 | 0.0186 | 0.0146 | 0.0703 | 0.0172  | 0.0133  | 0.0106  | 0.0133 | 0.0663 | 0.0676 | 0.0199 | 0.0119  | 0.1645  | 0.1684  | 0.0186  | 0.0146  | 0.0146  | 0.0862 | 0.0836 | 0.0729 | 0.0703 | 0.0544  | 0.0013  | 0.0053  |
| ER 17.1 | 0.0769 | 0.0743 | 0.0212 | 0.0172 | 0.0729 | 0.0199  | 0.0159  | 0.0133  | 0.0159 | 0.0650 | 0.0663 | 0.0225 | 0.0172  | 0.1658  | 0.1698  | 0.0212  | 0.0172  | 0.0172  | 0.0889 | 0.0836 | 0.0729 | 0.0703 | 0.0570  | 0.0119  | 0.0159  |
| ER 18.1 | 0.1088 | 0.1061 | 0.0836 | 0.0796 | 0.1021 | 0.0822  | 0.0822  | 0.0809  | 0.0822 | 0.0995 | 0.1008 | 0.0875 | 0.0836  | 0.1817  | 0.1857  | 0.0849  | 0.0809  | 0.0796  | 0.0928 | 0.0995 | 0.0531 | 0.0531 | 0.0743  | 0.0836  | 0.0875  |
| ER 19.1 | 0.1034 | 0.1008 | 0.0782 | 0.0743 | 0.0968 | 0.0769  | 0.0769  | 0.0756  | 0.0769 | 0.0968 | 0.0981 | 0.0822 | 0.0782  | 0.1764  | 0.1804  | 0.0796  | 0.0756  | 0.0743  | 0.0902 | 0.0942 | 0.0477 | 0.0477 | 0.0690  | 0.0782  | 0.0822  |
| ER 20.1 | 0.0703 | 0.0703 | 0.0159 | 0.0119 | 0.0690 | 0.0146  | 0.0133  | 0.0106  | 0.0093 | 0.0637 | 0.0650 | 0.0212 | 0.0080  | 0.1645  | 0.1684  | 0.0146  | 0.0106  | 0.0133  | 0.0836 | 0.0809 | 0.0743 | 0.0716 | 0.0531  | 0.0080  | 0.0093  |
| LO 1.1  | 0.0504 | 0.0504 | 0.0716 | 0.0676 | 0.0531 | 0.0676  | 0.0663  | 0.0676  | 0.0690 | 0.0915 | 0.0928 | 0.0729 | 0.0703  | 0.1592  | 0.1631  | 0.0716  | 0.0703  | 0.0623  | 0.0875 | 0.0862 | 0.0915 | 0.0902 | 0.0703  | 0.0703  | 0.0743  |
| MT 4.1  | 0.0809 | 0.0809 | 0.0690 | 0.0650 | 0.0796 | 0.0676  | 0.0663  | 0.0650  | 0.0663 | 0.0849 | 0.0862 | 0.0703 | 0.0676  | 0.1671  | 0.1711  | 0.0663  | 0.0650  | 0.0676  | 0.0889 | 0.0889 | 0.0915 | 0.0875 | 0.0703  | 0.0676  | 0.0663  |
| MT 5.1  | 0.0809 | 0.0809 | 0.0663 | 0.0623 | 0.0796 | 0.0650  | 0.0690  | 0.0676  | 0.0650 | 0.0849 | 0.0862 | 0.0676 | 0.0663  | 0.1671  | 0.1711  | 0.0650  | 0.0663  | 0.0650  | 0.0849 | 0.0849 | 0.0915 | 0.0875 | 0.0690  | 0.0703  | 0.0690  |
| LOb 1.1 | 0.0716 | 0.0690 | 0.0106 | 0.0066 | 0.0663 | 0.0106  | 0.0093  | 0.0080  | 0.0093 | 0.0597 | 0.0610 | 0.0146 | 0.0106  | 0.1618  | 0.1658  | 0.0119  | 0.0106  | 0.0080  | 0.0796 | 0.0769 | 0.0690 | 0.0690 | 0.0491  | 0.0119  | 0.0159  |
| LOb 2.1 | 0.0716 | 0.0690 | 0.0093 | 0.0053 | 0.0663 | 0.0093  | 0.0106  | 0.0093  | 0.0093 | 0.0623 | 0.0637 | 0.0133 | 0.0106  | 0.1618  | 0.1658  | 0.0119  | 0.0106  | 0.0066  | 0.0769 | 0.0743 | 0.0703 | 0.0676 | 0.0464  | 0.0133  | 0.0172  |
| LOb 3.1 | 0.0703 | 0.0676 | 0.0066 | 0.0027 | 0.0650 | 0.0066  | 0.0080  | 0.0066  | 0.0066 | 0.0610 | 0.0623 | 0.0106 | 0.0080  | 0.1605  | 0.1645  | 0.0093  | 0.0080  | 0.0040  | 0.0756 | 0.0729 | 0.0690 | 0.0663 | 0.0451  | 0.0106  | 0.0146  |
| TH 1.2  | 0.0371 | 0.0345 | 0.0690 | 0.0650 | 0.0292 | 0.0637  | 0.0637  | 0.0650  | 0.0663 | 0.0889 | 0.0902 | 0.0743 | 0.0676  | 0.1552  | 0.1592  | 0.0690  | 0.0663  | 0.0623  | 0.0875 | 0.0902 | 0.0889 | 0.0849 | 0.0756  | 0.0703  | 0.0716  |
| TH 3.3  | 0.0358 | 0.0305 | 0.0703 | 0.0663 | 0.0305 | 0.0663  | 0.0637  | 0.0650  | 0.0676 | 0.0915 | 0.0928 | 0.0716 | 0.0690  | 0.1565  | 0.1605  | 0.0703  | 0.0676  | 0.0610  | 0.0862 | 0.0942 | 0.0849 | 0.0809 | 0.0769  | 0.0676  | 0.0716  |
| TH 5.2  | 0.0279 | 0.0225 | 0.0743 | 0.0703 | 0.0305 | 0.0703  | 0.0676  | 0.0690  | 0.0690 | 0.0928 | 0.0942 | 0.0729 | 0.0703  | 0.1711  | 0.1751  | 0.0716  | 0.0690  | 0.0650  | 0.0915 | 0.0981 | 0.0889 | 0.0849 | 0.0729  | 0.0716  | 0.0756  |
| TH 5.3  | 0.0292 | 0.0239 | 0.0756 | 0.0716 | 0.0318 | 0.0716  | 0.0690  | 0.0703  | 0.0703 | 0.0942 | 0.0955 | 0.0743 | 0.0716  | 0.1724  | 0.1764  | 0.0729  | 0.0703  | 0.0663  | 0.0928 | 0.0995 | 0.0875 | 0.0862 | 0.0743  | 0.0729  | 0.0769  |
| TH 7.1  | 0.0902 | 0.0862 | 0.0703 | 0.0663 | 0.0915 | 0.0716  | 0.0703  | 0.0676  | 0.0663 | 0.0889 | 0.0902 | 0.0729 | 0.0676  | 0.1684  | 0.1724  | 0.0     |         |         |        |        |        |        |         |         |         |

(... segue)

|         |         |         |         |         |         |         |        |        |        |         |         |         |        |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| AR 2.4  | ER 15.1 | ER 16.1 | ER 17.1 | ER 18.1 | ER 19.1 | ER 20.1 | LO 1.1 | MT 4.1 | MT 5.1 | Lob 1.1 | Lob 2.1 | Lob 3.1 | TH 1.2 | TH 3.3 | TH 5.2 | TH 5.3 | TH 7.1 | TH 8.1 | TH 9.1 | TH 10.1 | TH 13.1 | TH 13.3 | TH 14.1 | TH 15.1 | TH 18.5 |
| AR 3.1  | 0.0926  | 0.0949  | 0.1042  | 0.1673  | 0.1565  | 0.0930  | 0.0602 | 0.1120 | 0.1119 | 0.0961  | 0.0961  | 0.0936  | 0.0427 | 0.0418 | 0.0327 | 0.0310 | 0.1362 | 0.1384 | 0.0432 | 0.0399  | 0.1353  | 0.1394  | 0.1087  | 0.1087  | 0.1129  |
| AR 5.1  | 0.0869  | 0.0892  | 0.0982  | 0.1591  | 0.1486  | 0.0922  | 0.0597 | 0.1110 | 0.1109 | 0.0903  | 0.0903  | 0.0878  | 0.0391 | 0.0346 | 0.0260 | 0.0244 | 0.1266 | 0.1287 | 0.0359 | 0.0360  | 0.1258  | 0.1297  | 0.1078  | 0.1078  | 0.1119  |
| AR 6.1  | 0.0196  | 0.0196  | 0.0228  | 0.1190  | 0.1096  | 0.0166  | 0.0947 | 0.0901 | 0.0861 | 0.0110  | 0.0096  | 0.0068  | 0.0892 | 0.0938 | 0.1006 | 0.0980 | 0.0969 | 0.0989 | 0.0882 | 0.1036  | 0.0963  | 0.0974  | 0.0837  | 0.0837  | 0.0875  |
| AR 8.1  | 0.0153  | 0.0153  | 0.0184  | 0.1127  | 0.1033  | 0.0123  | 0.0889 | 0.0843 | 0.0804 | 0.0068  | 0.0054  | 0.0027  | 0.0835 | 0.0879 | 0.0947 | 0.0922 | 0.0908 | 0.0928 | 0.0824 | 0.0976  | 0.0903  | 0.0913  | 0.0779  | 0.0779  | 0.0817  |
| AR 10.1 | 0.0884  | 0.0906  | 0.0955  | 0.1547  | 0.1442  | 0.0888  | 0.0642 | 0.1081 | 0.1083 | 0.0858  | 0.0858  | 0.0834  | 0.0322 | 0.0347 | 0.0357 | 0.0340 | 0.1349 | 0.1370 | 0.0291 | 0.0426  | 0.1340  | 0.1356  | 0.1041  | 0.1041  | 0.1082  |
| AR 12.1 | 0.0168  | 0.0183  | 0.0215  | 0.1168  | 0.1074  | 0.0154  | 0.0885 | 0.0890 | 0.0850 | 0.0112  | 0.0098  | 0.0069  | 0.0811 | 0.0875 | 0.0943 | 0.0918 | 0.1001 | 0.1021 | 0.0801 | 0.0972  | 0.0995  | 0.1006  | 0.0826  | 0.0826  | 0.0865  |
| AR 13.1 | 0.0123  | 0.0137  | 0.0167  | 0.1157  | 0.1063  | 0.0139  | 0.0857 | 0.0861 | 0.0900 | 0.0096  | 0.0110  | 0.0082  | 0.0812 | 0.0827 | 0.0894 | 0.0870 | 0.0958 | 0.0978 | 0.0755 | 0.0943  | 0.0953  | 0.0963  | 0.0797  | 0.0797  | 0.0836  |
| AR 13.2 | 0.0095  | 0.0110  | 0.0139  | 0.1143  | 0.1049  | 0.0111  | 0.0883 | 0.0847 | 0.0887 | 0.0083  | 0.0097  | 0.0068  | 0.0837 | 0.0853 | 0.0920 | 0.0895 | 0.0924 | 0.0944 | 0.0779 | 0.0971  | 0.0918  | 0.0917  | 0.0783  | 0.0783  | 0.0821  |
| AR 1.2  | 0.0139  | 0.0139  | 0.0170  | 0.1166  | 0.1072  | 0.0096  | 0.0915 | 0.0870 | 0.0848 | 0.0097  | 0.0097  | 0.0068  | 0.0861 | 0.0906 | 0.0933 | 0.0908 | 0.0914 | 0.0934 | 0.0850 | 0.0932  | 0.0908  | 0.0941  | 0.0805  | 0.0805  | 0.0844  |
| CR 2.1  | 0.0830  | 0.0852  | 0.0832  | 0.1485  | 0.1430  | 0.0815  | 0.1265 | 0.1147 | 0.1146 | 0.0765  | 0.0804  | 0.0780  | 0.1227 | 0.1309 | 0.1335 | 0.1305 | 0.1288 | 0.1310 | 0.1242 | 0.1395  | 0.1280  | 0.1295  | 0.1102  | 0.1102  | 0.1143  |
| CR 7.1  | 0.0848  | 0.0870  | 0.0850  | 0.1507  | 0.1452  | 0.0833  | 0.1285 | 0.1167 | 0.1166 | 0.0783  | 0.0823  | 0.0799  | 0.1247 | 0.1330 | 0.1356 | 0.1326 | 0.1310 | 0.1331 | 0.1263 | 0.1416  | 0.1301  | 0.1316  | 0.1122  | 0.1122  | 0.1163  |
| CR 9.2  | 0.0226  | 0.0212  | 0.0244  | 0.1266  | 0.1170  | 0.0229  | 0.0974 | 0.0937 | 0.0896 | 0.0155  | 0.0140  | 0.0111  | 0.0988 | 0.0965 | 0.0992 | 0.0966 | 0.1018 | 0.1038 | 0.0927 | 0.1022  | 0.1011  | 0.1023  | 0.0872  | 0.0872  | 0.0912  |
| CR 12.1 | 0.0125  | 0.0125  | 0.0185  | 0.1187  | 0.1093  | 0.0082  | 0.0935 | 0.0889 | 0.0868 | 0.0111  | 0.0111  | 0.0082  | 0.0880 | 0.0926 | 0.0953 | 0.0928 | 0.0934 | 0.0954 | 0.0870 | 0.0951  | 0.0928  | 0.0961  | 0.0824  | 0.0824  | 0.0863  |
| CR 16.1 | 0.3293  | 0.3300  | 0.3325  | 0.3803  | 0.3588  | 0.3308  | 0.3119 | 0.3210 | 0.3216 | 0.3280  | 0.3281  | 0.3224  | 0.2911 | 0.2967 | 0.3431 | 0.3375 | 0.3451 | 0.3482 | 0.2876 | 0.3420  | 0.3355  | 0.3472  | 0.3281  | 0.3281  | 0.3343  |
| CR 16.2 | 0.3480  | 0.3487  | 0.3512  | 0.4010  | 0.3785  | 0.3496  | 0.3298 | 0.3389 | 0.3395 | 0.3469  | 0.3469  | 0.3410  | 0.3079 | 0.3137 | 0.3620 | 0.3562 | 0.3645 | 0.3678 | 0.3042 | 0.3609  | 0.3545  | 0.3668  | 0.3464  | 0.3464  | 0.3529  |
| CR 21.1 | 0.0199  | 0.0200  | 0.0232  | 0.1223  | 0.1127  | 0.0154  | 0.0966 | 0.0878 | 0.0857 | 0.0126  | 0.0126  | 0.0097  | 0.0910 | 0.0957 | 0.0984 | 0.0958 | 0.1010 | 0.1030 | 0.0899 | 0.0982  | 0.1003  | 0.1015  | 0.0813  | 0.0813  | 0.0852  |
| CR 22.1 | 0.0154  | 0.0154  | 0.0185  | 0.1145  | 0.1051  | 0.0110  | 0.0936 | 0.0850 | 0.0869 | 0.0111  | 0.0111  | 0.0082  | 0.0861 | 0.0905 | 0.0933 | 0.0908 | 0.0978 | 0.0999 | 0.0850 | 0.0931  | 0.0972  | 0.0983  | 0.0785  | 0.0785  | 0.0824  |
| CRb 1.1 | 0.0153  | 0.0154  | 0.0184  | 0.1131  | 0.1038  | 0.0139  | 0.0802 | 0.0896 | 0.0855 | 0.0082  | 0.0068  | 0.0041  | 0.0798 | 0.0792 | 0.0859 | 0.0835 | 0.0954 | 0.0974 | 0.0741 | 0.0887  | 0.0948  | 0.0959  | 0.0831  | 0.0831  | 0.0870  |
| ER 2.1  | 0.1173  | 0.1198  | 0.1256  | 0.1316  | 0.1264  | 0.1158  | 0.1242 | 0.1249 | 0.1171 | 0.1105  | 0.1062  | 0.1035  | 0.1220 | 0.1223 | 0.1327 | 0.1297 | 0.1496 | 0.1519 | 0.1191 | 0.1317  | 0.1439  | 0.1504  | 0.1282  | 0.1282  | 0.1326  |
| ER 4.1  | 0.1121  | 0.1146  | 0.1144  | 0.1434  | 0.1335  | 0.1106  | 0.1223 | 0.1258 | 0.1179 | 0.1054  | 0.1012  | 0.0985  | 0.1254 | 0.1362 | 0.1431 | 0.1400 | 0.1439 | 0.1461 | 0.1270 | 0.1422  | 0.1383  | 0.1446  | 0.1291  | 0.1291  | 0.1334  |
| ER 5.1  | 0.1049  | 0.1030  | 0.1042  | 0.0666  | 0.0589  | 0.1066  | 0.1359 | 0.1340 | 0.1339 | 0.0966  | 0.0998  | 0.0971  | 0.1298 | 0.1256 | 0.1266 | 0.1296 | 0.1364 | 0.1387 | 0.1209 | 0.1321  | 0.1378  | 0.1331  | 0.1344  | 0.1344  | 0.1389  |
| ER 7.1  | 0.1001  | 0.0983  | 0.0994  | 0.0665  | 0.0588  | 0.1017  | 0.1347 | 0.1267 | 0.1266 | 0.0973  | 0.0950  | 0.0923  | 0.1226 | 0.1183 | 0.1253 | 0.1224 | 0.1352 | 0.1374 | 0.1138 | 0.1248  | 0.1366  | 0.1318  | 0.1270  | 0.1270  | 0.1314  |
| ER 12.1 | 0.0682  | 0.0666  | 0.0710  | 0.0967  | 0.0883  | 0.0649  | 0.0930 | 0.0901 | 0.0881 | 0.0601  | 0.0564  | 0.0544  | 0.0992 | 0.1043 | 0.0987 | 0.0962 | 0.1196 | 0.1217 | 0.1004 | 0.1018  | 0.1189  | 0.1202  | 0.0896  | 0.0896  | 0.0934  |
| ER 13.1 | 0.0027  | 0.0013  | 0.0124  | 0.1179  | 0.1086  | 0.0082  | 0.0918 | 0.0882 | 0.0921 | 0.0124  | 0.0138  | 0.0110  | 0.0911 | 0.0887 | 0.0954 | 0.0930 | 0.0938 | 0.0958 | 0.0852 | 0.1005  | 0.0932  | 0.0964  | 0.0817  | 0.0817  | 0.0856  |
| ER 14.1 | 0.0068  | 0.0054  | 0.0168  | 0.1251  | 0.1155  | 0.0096  | 0.0982 | 0.0856 | 0.0895 | 0.0168  | 0.0182  | 0.0153  | 0.0924 | 0.0951 | 0.1019 | 0.0994 | 0.1005 | 0.1025 | 0.0914 | 0.1072  | 0.0999  | 0.1032  | 0.0792  | 0.0792  | 0.0830  |
| ER 15.1 |         | 0.0040  | 0.0152  | 0.1221  | 0.1126  | 0.0096  | 0.0916 | 0.0920 | 0.0959 | 0.0138  | 0.0153  | 0.0124  | 0.0869 | 0.0906 | 0.0952 | 0.0928 | 0.0977 | 0.0997 | 0.0811 | 0.1003  | 0.0972  | 0.1004  | 0.0855  | 0.0855  | 0.0894  |
| ER 16.1 | 0.0040  |         | 0.0139  | 0.1203  | 0.1108  | 0.0096  | 0.0939 | 0.0902 | 0.0942 | 0.0139  | 0.0153  | 0.0124  | 0.0892 | 0.0868 | 0.0976 | 0.0950 | 0.0960 | 0.0980 | 0.0833 | 0.1027  | 0.0954  | 0.0987  | 0.0817  | 0.0817  | 0.0856  |
| ER 17.1 | 0.0146  | 0.0133  | 0.1157  | 0.1063  | 0.1084  | 0.0989  | 0.0989 | 0.0861 | 0.0900 | 0.0169  | 0.0184  | 0.0154  | 0.0982 | 0.0959 | 0.1027 | 0.1001 | 0.0946 | 0.0966 | 0.0921 | 0.1080  | 0.0940  | 0.0931  | 0.0837  | 0.0837  | 0.0875  |
| ER 18.1 | 0.0862  | 0.0849  | 0.0822  | 0.0140  | 0.1196  | 0.1649  | 0.1446 | 0.1445 | 0.1128 | 0.1171  | 0.1121  | 0.1560  | 0.1568 | 0.1593 | 0.1560 | 0.1649 | 0.1672 | 0.1514 | 0.1590 | 0.1689  | 0.1685  | 0.1590  | 0.1590  | 0.1636  |         |
| ER 19.1 | 0.0809  | 0.0796  | 0.0769  | 0.0133  | 0.1100  | 0.1591  | 0.1370 | 0.1370 | 0.1079 | 0.1076  | 0.1029  | 0.1503  | 0.1462 | 0.1558 | 0.1525 | 0.1567 | 0.1590 | 0.1410 | 0.1555 | 0.1606  | 0.1575  | 0.1485  | 0.1485  | 0.1530  |         |
| ER 20.1 | 0.0093  | 0.0093  | 0.0172  | 0.0836  | 0.0782  | 0.0970  | 0.0884 | 0.0923 | 0.0139 | 0.0153  | 0.0124  | 0.0894  | 0.0940 | 0.1008 | 0.0982 | 0.0993 | 0.1013 | 0.0884 | 0.1060 | 0.0987  | 0.1020  | 0.0819  | 0.0819  | 0.0858  |         |
| LO 1.1  | 0.0703  | 0.0716  | 0.0743  | 0.1074  | 0.1048  | 0.0729  | 0.1205 | 0.1205 | 0.0821 | 0.0870  | 0.0845  | 0.0700  | 0.0688 | 0.0671 | 0.0692 | 0.1374 | 0.1396 | 0.0701 | 0.0758 | 0.1365  | 0.1381  | 0.1252  | 0.1252  | 0.1295  |         |
| MT 4.1  | 0.0703  | 0.0690  | 0.0663  | 0.0995  | 0.0955  | 0.0676  | 0.0862 | 0.0097 | 0.0873 | 0.0873  | 0.0849  | 0.1065  | 0.1141 | 0.1104 | 0.1077 | 0.0964 | 0.0983 | 0.1121 | 0.1160 | 0.0958  | 0.1010  | 0.0382  | 0.0382  | 0.0415  |         |
| MT 5.1  | 0.0729  | 0.0716  | 0.0690  | 0.0995  | 0.0955  | 0.0703  | 0.0862 | 0.0093 | 0.0873 | 0.0833  | 0.0809  | 0.1066  | 0.1143 | 0.1126 | 0.1099 | 0.0893 | 0.0912 | 0.1122 | 0.1159 | 0.0888  | 0.0938  | 0.0395  | 0.0395  | 0.0428  |         |
| Lob 1.1 | 0.0133  | 0.0133  | 0.0159  | 0.0796  | 0.0769  | 0.0133  | 0.0637 | 0.0663 | 0.0663 | 0.0066  | 0.0068  | 0.0041  | 0.0864 | 0.0859 | 0.0878 | 0.0902 | 0.0878 | 0.0898 | 0.0806 | 0.0978  | 0.0873  | 0.0883  | 0.0808  | 0.0808  | 0.0847  |
| Lob 2.1 | 0.0146  | 0.0146  | 0.0172  | 0.0822  | 0.0769  | 0.0146  | 0.0663 | 0.0663 | 0.0637 | 0.0066  | 0.0068  | 0.0041  | 0.0864 | 0.0860 | 0.0927 | 0.0903 | 0.0930 | 0.0950 | 0.0806 | 0.0957  | 0.0924  | 0.0935  | 0.0808  | 0.0808  | 0.0847  |
| Lob 3.1 | 0.0119  | 0.0119  | 0.0146  | 0.0796  | 0.0743  | 0.0119  | 0.0650 | 0.0650 | 0.0623 | 0.0040  | 0.0027  | 0.0040  | 0.0840 | 0.0835 | 0.0902 | 0.0878 | 0.0904 | 0.0924 | 0.0782 | 0.0931  | 0.0899  | 0.0908  | 0.0784  | 0.0784  | 0.0823  |
| TH 1.2  | 0.0676  | 0.0690  | 0.0743  | 0.1034  | 0.1008  | 0.0690  | 0.0570 | 0.0782 | 0.0782 | 0.0663  | 0.0663  | 0.0650  | 0.0324 | 0.0307 | 0.1447 | 0.1469 | 0.0095 | 0.0429 | 0.1438 | 0.1454  | 0.0991  | 0.0991  | 0.1031  |         |         |
| TH 3.3  | 0.0690  | 0.0663  | 0.0716  | 0.1021  | 0.0968  | 0.0703  | 0.0557 | 0.0809 | 0.0809 | 0.0650  | 0.0650  | 0.0637  | 0.0133 | 0.0265 | 0.0311 | 0.0294 | 0.1428 | 0.1451 | 0.0097 | 0.0416  | 0.1419  | 0.1435  | 0.1021  | 0.1021  | 0.1063  |
| TH 5.2  | 0.0716  | 0.0729  | 0.0756  | 0.1034  | 0.1021  | 0.0743  | 0.0570 | 0.0782 | 0.0796 | 0.0690  | 0.0690  | 0.0676  | 0.0279 | 0.0265 | 0.0013 | 0.0013 | 0.1435 | 0.1457 | 0.0325 | 0.0111  | 0.1425  | 0.1442  | 0.1115  | 0.1115  | 0.1157  |
| TH 5.3  | 0.0729  | 0.0743  | 0.0769  | 0.1048  | 0.1034  | 0.0756  | 0.0557 | 0.0796 | 0.0809 | 0.0676  | 0.0703  | 0.0690  | 0.0292 | 0.0279 | 0.0013 | 0.0013 | 0.1467 | 0.1489 | 0.0308 | 0.0096  | 0.1458  | 0.1475  | 0.1087  | 0.1087  | 0.1129  |
| TH 7.1  | 0.0716  | 0.0703  | 0.0703  | 0.1061  | 0.1021  | 0.0716  | 0.0928 | 0.0716 | 0.0676 | 0.0650  | 0.0676  | 0.0663  | 0.0955 | 0.0928 | 0.0968 | 0.0955 | 0.0013 | 0.0013 | 0.1401 | 0.1     |         |         |         |         |         |

### 4.3 Confronto del grado di polimorfismo tra Regione di Controllo e COI

I valori di divergenza intraspecifica per la Regione di Controllo risultano, in alcuni casi, estremamente più elevati rispetto a quelli calcolati sulla base delle sequenze di COI, introducendo nell'analisi i medesimi campioni per ciascun taxon considerato (figura 14); in particolare i valori di divergenza intraspecifica calcolati per le specie *M. coracinus*, *M. arankae*, *M. erysimicola* e *M. thalassophilus* risultano più elevati del 2.5 - 4.5% rispetto a quelli provenienti dall'analisi delle sequenze di COI.



**Figura 14 - Confronto delle distanze  $p$  intra-specifiche calcolate sulle sequenze di COI e di Regione di Controllo**

Figure 14 – Comparison among intraspecific variability values ( $p$  distances) (COI vs. Control Region)

In tabella 7 vengono messi a confronto i valori dei parametri di stima della variabilità genetica calcolati per le medesime popolazioni di *M. coracinus*, *M. arankae*, *M. erysimicola* e *M. thalassophilus* sulla base delle sequenze di Regione di Controllo e di COI. In tutti i confronti tra i due marcatori, considerando gli indici di variabilità genetica relativi a ciascun taxon o alla totalità delle popolazioni esaminate, risulta che, per la Regione di Controllo, il numero di siti segreganti per nucleotide ( $S/L$ ) e il livello di diversità nucleotidica per sito ( $\pi$ ) presentano valori di circa 3 volte superiori rispetto a quelli calcolati sulla base delle sequenze di COI. Infine, tra i taxa esaminati, *M.*

*coracinus* presenta il livello di diversità nucleotidica ( $\pi$ ) più elevato, sia per la Regione di Controllo (8.29%) che per la COI (3.29%).

**Tabella 7 – Polimorfismo nucleotidico per le sequenze di Regione di Controllo e di COI per alcune specie del sottogruppo di *M. coracinus*.**

*Table 7 – Nucleotide polymorphism for mitochondrial Control Region and COI gene in the M. coracinus subgroup.*

| <b>Marcatore</b>                | <b>Taxon</b>             | <b>n°<br/>individui<br/>(n)</b> | <b>n°<br/>siti<br/>nucleotidici<br/>(L)</b> | <b>n°<br/>aplotipi<br/>(H)</b> | <b>n°siti<br/>segreganti<br/>(S)</b> | <b>n° siti<br/>segreganti<br/>/ n° siti<br/>nucleotidici<br/>(S / L)</b> | <b>diversità<br/>nucleotidica<br/>per sito<br/>(<math>\pi</math>)</b> |
|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------------|--|---|
| <b>Regione di<br/>Controllo</b> | <i>M. coracinus</i>      | 9                               | 754   | 9                              | 149                                  | 0.20   | 0,083   |
|                                 | <i>M arankae</i>         | 7                               | 754   | 7                              | 68                                   | 0.09   | 0,038   |
|                                 | <i>M. erysimicola</i>    | 13                              | 754   | 13                             | 121                                  | 0.16   | 0,059   |
|                                 | <i>M. thalassophilus</i> | 12                              | 754   | 11                             | 107                                  | 0.14   | 0,063   |
|                                 | <b>Totale</b>            | <b>41</b>                       | <b>754</b>                                  | <b>40</b>                      | <b>253</b>                           | <b>0.33</b>  | <b>0,073</b>  |
| <b>COI</b>                      | <i>M. coracinus</i>      | 9                               | 1542  | 6                              | 125                                  | 0.08   | 0,033   |
|                                 | <i>M arankae</i>         | 7                               | 1542  | 7                              | 49                                   | 0.03   | 0,014   |
|                                 | <i>M. erysimicola</i>    | 13                              | 1542  | 13                             | 104                                  | 0.07   | 0,024   |
|                                 | <i>M. thalassophilus</i> | 12                              | 1542  | 12                             | 56                                   | 0.04   | 0,014   |
|                                 | <b>Totale</b>            | <b>41</b>                       | <b>1542</b>                                 | <b>38</b>                      | <b>201</b>                           | <b>0.13</b>  | <b>0,026</b>  |

#### 4.4 Risultati delle analisi filogenetiche

Il *likelihood ratio test* per le sequenze di Regione di Controllo dei *Meligethes* analizzati supporta l'*Hasegawa Kishino & Yano model* (HKY) quale modello che meglio descrive l'andamento di sostituzione per questi dati (con un valore di *likelihood* pari a  $-\ln=4065.5234$ ). Questo modello prevede tassi di sostituzione variabili per le transversioni (purina-pirimidina e viceversa) e per le transizioni (purina-purina e pirimidina-pirimidina). Inoltre, i tassi di sostituzione nucleotidica tra i siti seguono un modello che include un parametro I, che descrive la proporzione dei siti invariabili, ed una distribuzione continua gamma, caratterizzata tipicamente da un parametro di forma  $\alpha$  (G) (Hasegawa *et al.*, 1985; Yang, 1994; Gu *et al.*, 1995). Entrambi i parametri (I e G) sono esplicitati dal programma Modeltest 3.06. In *tabella 8* sono elencati i principali parametri del modello evolutivo selezionato da Modeltest 3.07.

**Tabella 8 – Parametri selezionati da Modeltest 3.06 per il gene della COI**

*Table 8 – Parameters from best-fit model selected by Modeltest 3.06*

| Frequenza delle basi (%) |       | Tassi di sostituzione nucleotidica |                                     |
|--------------------------|-------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>A</b>                 | 37.65 | <b>Ti/tv ratio = 1.7495</b>        |                                     |
| <b>T</b>                 | 43.02 |                                    |                                     |
| <b>G</b>                 | 10.23 | <b>I = 0.3115</b>                  | <b><math>\alpha</math> = 0.6332</b> |
| <b>C</b>                 | 9.10  |                                    |                                     |

I = proporzione di siti invariabili  $\alpha$  = parametro di forma (*shape*) della distribuzione gamma dei siti variabili

Gli alberi filogenetici ottenuti mediante i diversi metodi di ricostruzione filogenetica non differiscono sostanzialmente nella topologia (*figure 15 – 20*). Il valore di *likelihood* dell'albero di ML, il numero di alberi e i valori degli indici ottenuti mediante Parsimonia pesata e non pesata sono riportati in *tabella 9*.

**Tabella 9 – Valore di likelihood per l'albero di ML e indici degli alberi ottenuti mediante MP non pesata e MP con modello evolutivo per la Regione di Controllo**

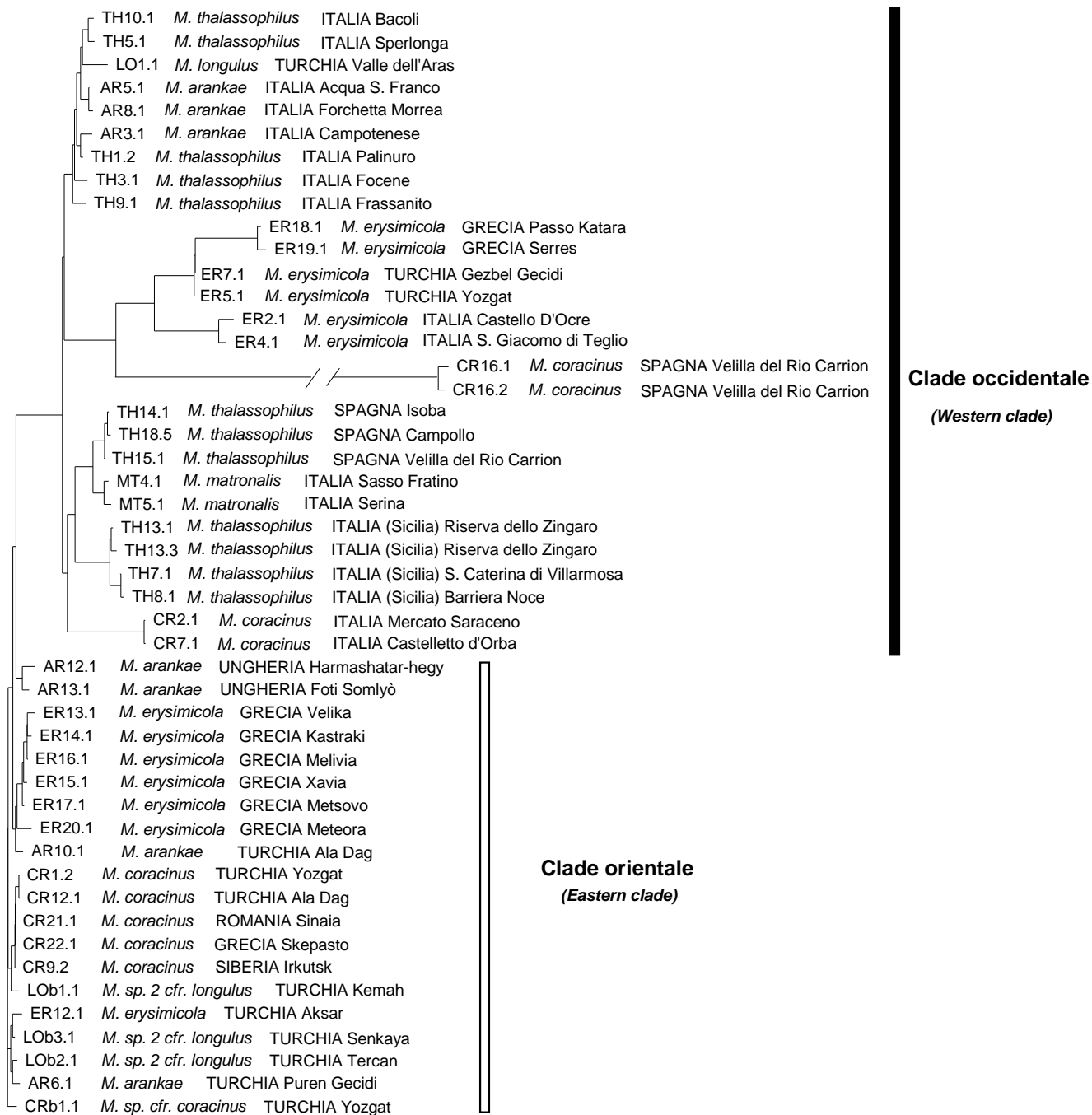
*Table 9 – Likelihood value for the Maximum Likelihood analysis and Index of the two MP analysis performed for Control Region*

|   | <b>UWP</b> | <b>MP (HKY+I+G)</b> | <b>ML (HKY+I+G)</b>   |
|---|------------|---------------------|---|
| <b>Numero di alberi</b>                 | 200        | 30                  | <b>Indice di likelihood</b><br>- Ln likelihood<br>=<br>4047.735 |
| <b>Tree length (L)</b>                  | <b>584</b> | <b>759</b>          |   |
| <b>Indice di consistenza (CI)</b>       | 0.60       | 0.60                |   |
| <b>Indice di ritenzione (RI)</b>        | 0.83       | 0.84                |   |
| <b>Rescaled consistency index (RCI)</b> | 0.50       | 0.51                |   |

UWP = Massima parsimonia non pesata (unweighted parsimony)

MP (HKY+I+G) = Massima Parsimonia condotta applicando il modello HKY+I+G

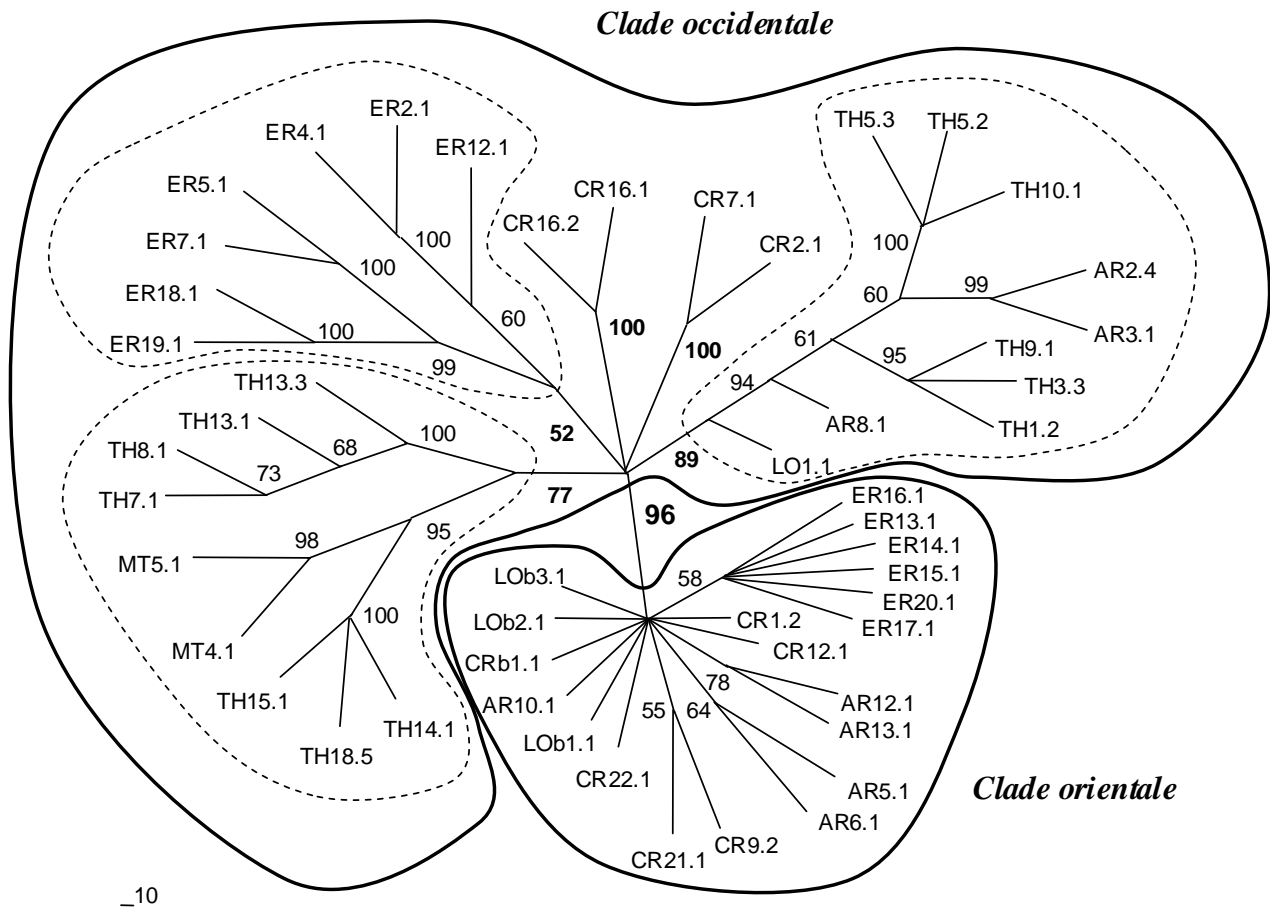
ML = Maximum Likelihood



**Figura 15 - Albero filogenetico ottenuto mediante l'applicazione del metodo di NJ sulle sequenze di Regione di Controllo secondo il modello HKY+G+I (albero radicato arbitrariamente per ragioni grafiche)**

Figure 15 – Neighbor-joining under the HYG+G+I model for Control Region sequences (the root of the tree is arbitrary and has been chosen for best visualisation)

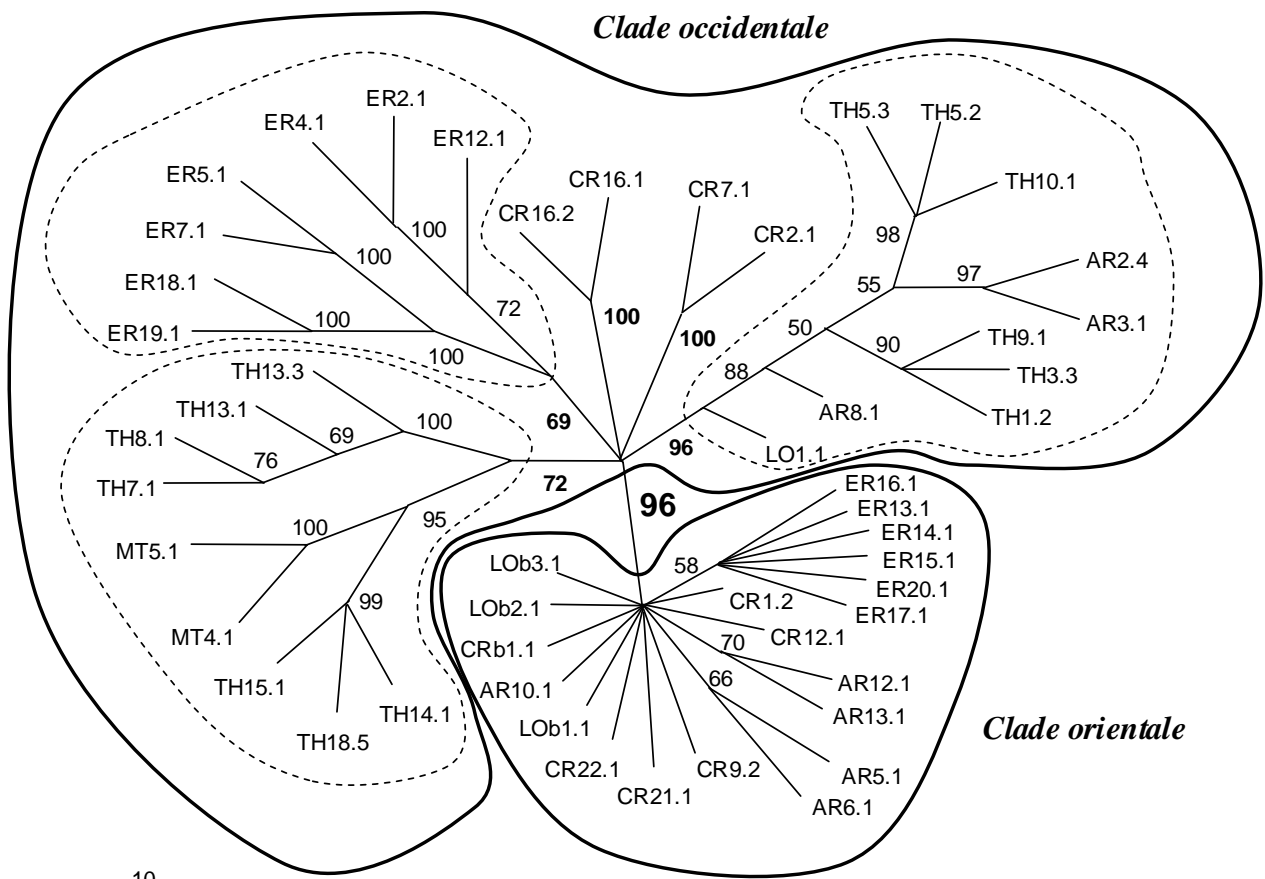




**Figura 17 - Albero di consenso (50% majority rule) non radicato ottenuto mediante *bootstrap* su MP non corretta per le sequenze di Regione di Controllo (indici di *bootstrap* riportati sopra i nodi)**

*Figure 17 – Fifty percent majority-rule unrooted tree from the unweighted MP analysis for Control Region sequences (bootstrap values on nodes)*

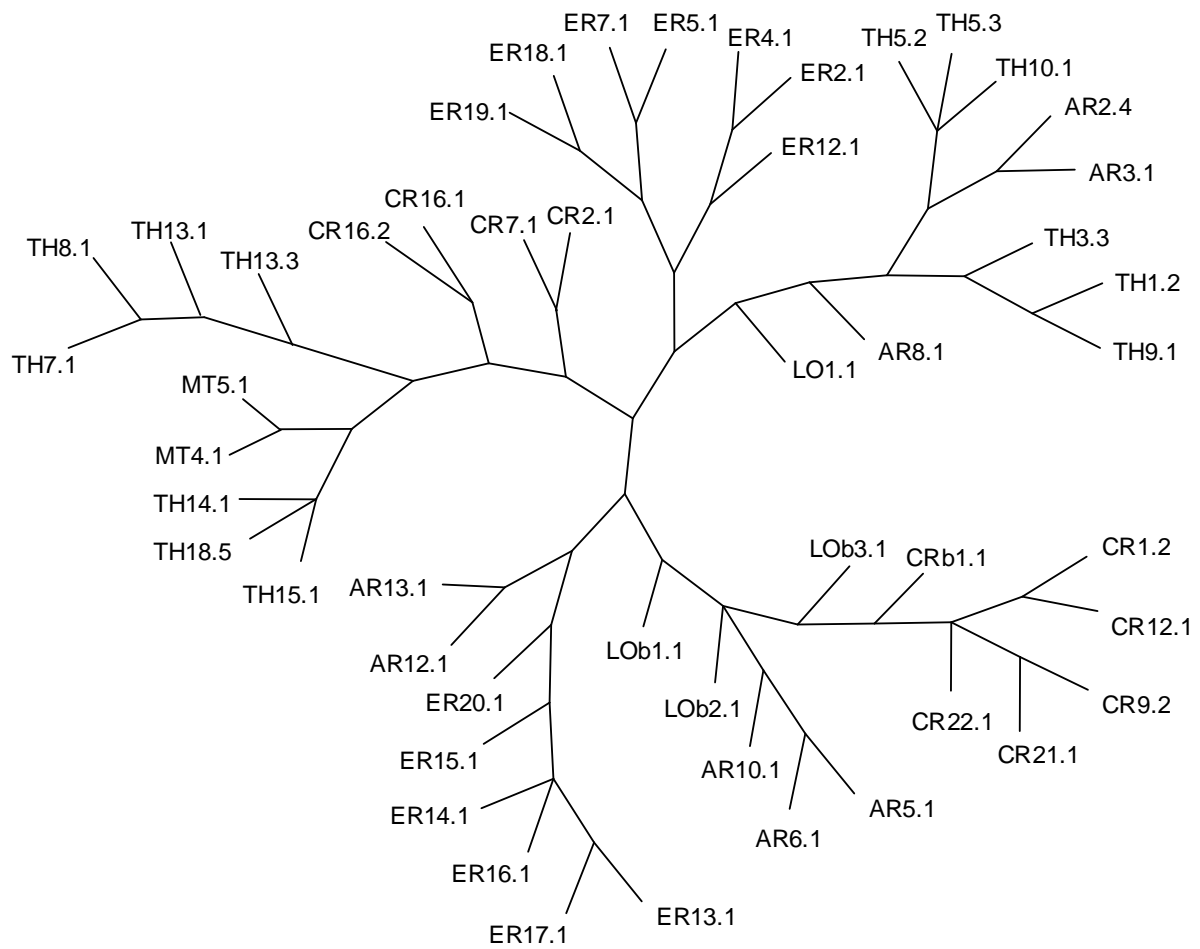




\_10

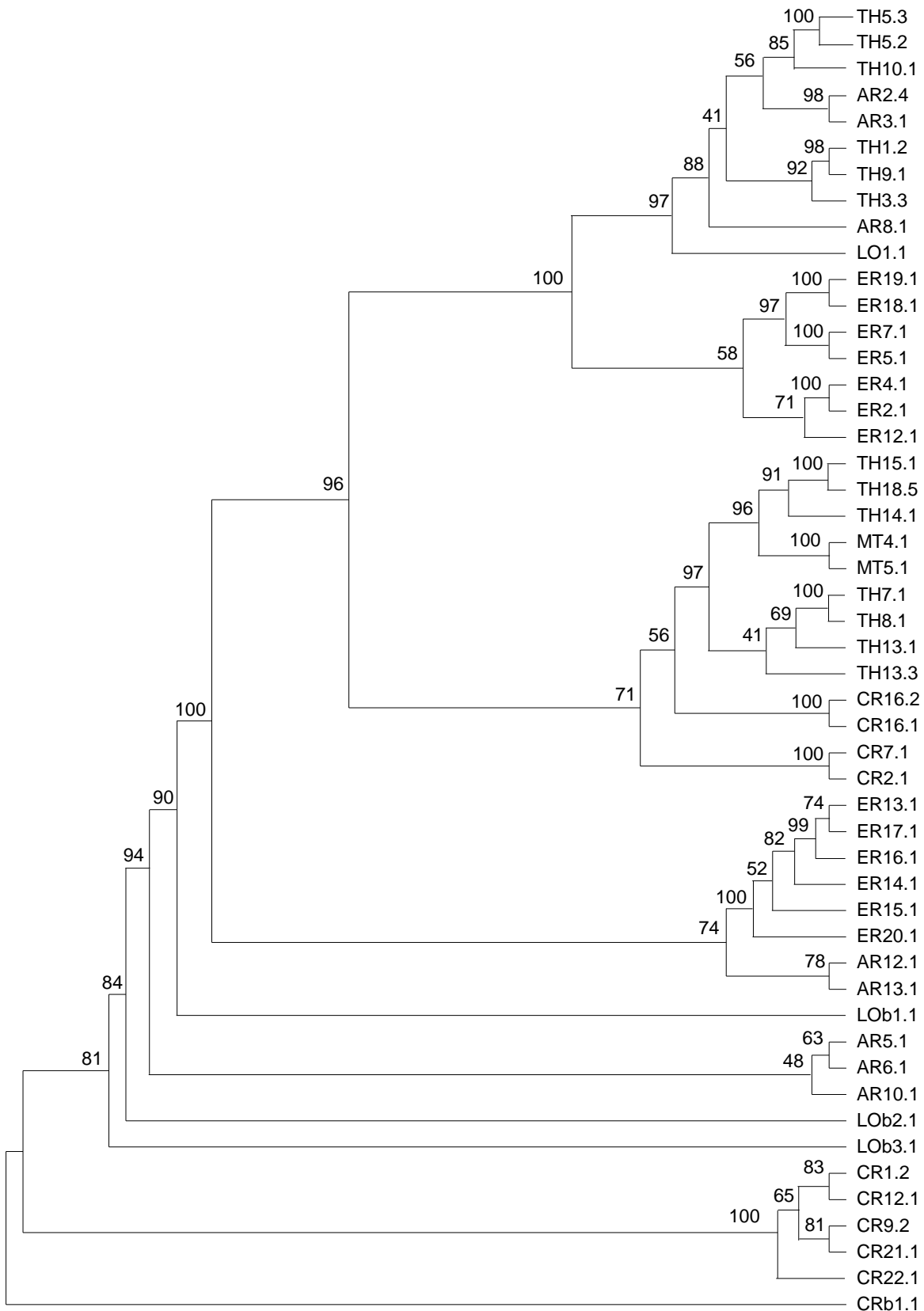
**Figura 18 - Albero di consenso (50% majority rule) non radicato ottenuto mediante *bootstrap* su MP corretta per le sequenze di Regione di Controllo (indici di *bootstrap* riportati sopra i nodi)**

*Figure 18 – Fifty percent majority-rule unrooted tree from the weighted MP analysis for Control Region sequences (bootstrap values on nodes)*



**Figura 19 - Albero filogenetico non radicato ottenuto mediante l'applicazione del ML secondo il modello HKY+G+I per le sequenze di Regione di Controllo.**

*Figure 19 – Unrooted Maximum Likelihood tree for Control Region sequences under the HKY+G+I model*



**Figura 20 - Albero di consenso (50% majority rule) ottenuto mediante analisi Bayesiana sulla Regione di Controllo (probabilità a posteriori sopra i nodi; albero radicato arbitrariamente per ragioni grafiche)**

*Figure 20 - Fifty percent majority-rule from Bayesian analysis for Control Region (posterior probability values on nodes; the root of the tree is arbitrary and has been chosen for best visualisation)*

Facendo riferimento agli alberi di consenso (*50% majority rule*) provenienti dalle analisi di *Neighbor-joining* e di Parsimonia pesata e non pesata, si può osservare la presenza di due principali raggruppamenti ben supportati dai valori di *bootstrap* (96% - 100%): un primo gruppo - che chiameremo “clade orientale” - che comprende quasi totalmente i campioni di differenti specie originari delle aree medio-orientali (Turchia, Grecia, Ungheria, Romania e Siberia), e un secondo gruppo - che chiameremo “clade occidentale” - in cui sono compresi gran parte degli individui di differenti specie provenienti da Italia e Spagna (*fig. 16, 17, 18; vedi anche fig. 15*).

Nel dettaglio, i risultati delle ricostruzioni filogenetiche molecolari ottenute attraverso l'utilizzo delle varie metodiche sulle sequenze di Regione di Controllo possono essere sintetizzate, qui di seguito, considerando la situazione per ciascuno dei taxa sottoposti ad analisi.

- *Meligethes coracinus*

Gli esemplari di *M. coracinus* (CR) di Turchia, Grecia, Romania e Siberia si trovano all'interno del “clade orientale” insieme ad individui, anch'essi di provenienza orientale, di *M. sp. cfr. coracinus*, *M. sp. 2 cfr. longulus*, *M. arankae* e *M. erysimicola*, e mostrano tra loro e rispetto a queste popolazioni eterospecifiche una distanza genetica *p* piuttosto bassa (0.98% vs. CRb - 1.6% vs. ER). Gli esemplari di origine italiana (CR2.1, CR7.1) e spagnola (CR 16.1, CR16.2) si collocano invece all'interno del “clade occidentale”, ma la loro relazione filogenetica con gli altri esemplari contenuti all'interno di questo raggruppamento non è chiara. Inoltre gli esemplari spagnoli di *M. coracinus* presentano una distanza genetica *p* estremamente elevata (tra il 15.9 e il 17.0%) nei confronti di tutti gli altri esemplari conspecifici, mentre gli esemplari italiani presentano una divergenza anch'essa piuttosto elevata, pari al 6.0 - 6.6%, nei confronti degli esemplari conspecifici di origine medio-orientale.

- *Meligethes erysimicola*

Gran parte degli esemplari di origine greca di *M. erysimicola* (ER) (ER17.1, ER20.1, ER15.1, ER14.1, ER 13.1, ER16.1) prendono posizione all'interno del “clade orientale” in un sottogruppo omogeneo supportato da valori di *bootstrap* di circa 60% negli alberi di consenso di NJ e Massima Parsimonia non corretta. In un raggruppamento interno (52-69% di *bootstrap*) al “clade occidentale” sono collocati gli esemplari di origine italiana, due esemplari di origine greca (ER18.1, ER19.1) e i tre esemplari di origine turca (ER5.1, ER7.1, ER12.1). Questi esemplari di origine greca, analogamente agli esemplari italiani, presentano una distanza *p* in media di circa 0.82-0.84% rispetto agli esemplari di medesima provenienza posizionati all'interno del “clade orientale”.

Rispetto agli esemplari greci del clade orientale gli individui turchi ER5.1 e ER 7.1 presentano una distanza  $p$  dello 0.70-0.74%, mentre ER 12.1, anch'esso di origine turca, presenta un valore di distanza  $p$  più basso, pari allo 0.55%.

- *Meligethes arankae*

Gli esemplari di *M. arankae* di Turchia e Ungheria si trovano all'interno del "clade orientale", così come l'esemplare italiano AR5.1 di Acqua S. Franco (Italia, Abruzzo). All'interno del "clade orientale" l'individuo italiano presenta, analogamente ai due esemplari ungheresi (AR12.1 e AR 13.1), una distanza genetica  $p$  dell'1.1% rispetto agli esemplari turchi.

Per quanto riguarda gli altri tre esemplari di origine italiana di *M. arankae*, essi si trovano all'interno del "clade occidentale" in un raggruppamento supportato da elevati indici di *bootstrap* (74-94%) (di cui *M. longulus* rappresenterebbe la *sister species*) in cui sono compresi anche gli esemplari dell'Italia peninsulare di *M. thalassophilus* e rispetto ai quali presentano una distanza genetica  $p$  media del 3.1%. L'esemplare italiano abruzzese di *M. arankae* compreso all'interno del clade turco (AR 5.1) presenta nei confronti di AR8.1, di simile seppur non identica provenienza, una distanza  $p$  del 6.6%, del 7.4% invece rispetto agli esemplari di Calabria, e del 7.2% infine rispetto agli esemplari dell'Italia peninsulare di *M. thalassophilus*.

- *Meligethes thalassophilus*

I campioni esaminati per questa specie prendono posizione tutti all'interno del "clade occidentale". Gli esemplari di origine spagnola e quelli di origine siciliana, si raggruppano rispettivamente tra loro secondo la loro provenienza geografica e sono tutti compresi all'interno di un clade più ampio supportato da valori di *bootstrap* del 72-93% (distanza genetica media  $p$  degli individui spagnoli vs. gli individui siciliani = 6.4%). Gli esemplari spagnoli presentano una stretta affinità genetica con i campioni esaminati di *M. matronalis* ( $p = 3.5%$ ), costituendo insieme ad essi un clade distinto supportato da un valore di 93-95% di indice di *bootstrap*. Gli esemplari di *M. thalassophilus* dell'Italia peninsulare, come già accennato, risultano compresi all'interno di un clade dove è raggruppata la gran parte degli individui di origine italiana di *M. arankae*.

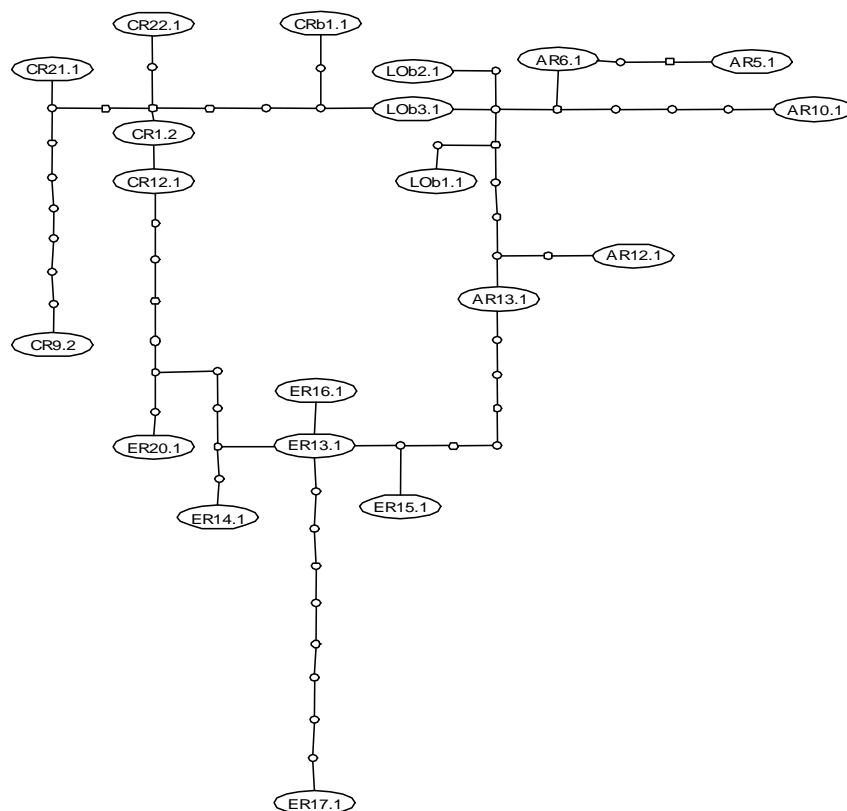
- *Meligethes longulus*, *Meligethes* sp.2 cfr *longulus*, *Meligethes* sp. cfr. *coracinus*

L'unico campione turco di *M. longulus* occupa una posizione di *sister species* nei confronti del clade in cui sono contenute le popolazioni dell'Italia peninsulare di *M. thalassophilus* e di *M. arankae* (5.0-6.0% di distanza genetica  $p$ ). I campioni turchi di *Meligethes* sp.2 cfr. *longulus* si trovano invece all'interno del "clade orientale", così come l'esemplare di *Meligethes* sp. cfr.

*coracinus*. Per questi taxa le analisi filogenetiche non permettono di rilevare alcuna particolare affinità genetica con un qualsiasi membro appartenente al sottogruppo di *M. coracinus*.

#### 4.5 Risultati delle analisi di network (TCS)

Le relazioni tra gli aplotipi contenuti all'interno del "clade orientale" sono state ricostruite sulla base delle sequenze di Regione di Controllo mediante un'analisi di *network* con il *software* TCS (Clement, 2000). La *network* non radicata di parsimonia statistica (con una soglia di probabilità del 95%) che mostra le relazioni evolutive tra gli aplotipi contenuti nel "clade orientale" è illustrata in *figura 21*.



**Figura 21 – Risultato delle relazioni filogenetiche ottenute mediante Parsimonia Statistica su 20 aplotipi di Regione di Controllo per gli individui inclusi nel clade orientale.**

*Figure 21 – Unrooted statistical parsimony showing phylogenetic relationship for 20 mtDNA control region haplotypes.*

Da questa ricostruzione risulta che gli aplotipi di *M. coracinus* di Grecia, Romania e Siberia (CR22.1, CR21.1, CR9.2) presentano una maggiore affinità con i due individui conspecifici di Turchia (CR1.2, CR12.1) piuttosto che con tutti gli altri aplotipi analizzati, e rispettivamente

distano per un numero di 3, 5 e 10 sostituzioni nucleotidiche dagli aplotipi turchi. Nel caso degli individui analizzati per *M. erysimicola*, tutti di origine greca, ciascun aplotipo è connesso all'aplotipo conspecifico più affine con un numero di sostituzioni non superiore a 6, ad eccezione di ER 17.1 (Grecia, Metsovo) che risulta invece collegato mediante 9 sostituzioni a ER13.1 (Grecia, Velika).

Gli individui di *M. arankae*, invece, non prendono posizione in maniera “compatta”, ma risultano dispersi all'interno della *network*: gli aplotipi ungheresi (AR12.1, AR13.1) appaiono “isolati” e sorprendentemente più affini ad aplotipi attribuiti ad altre specie (*M. erysimicola* e *M. sp.2* cfr. *longulus*) piuttosto che con gli aplotipi conspecifici di Turchia e Italia. Per quanto riguarda gli individui turchi di *M. arankae*, AR10.1 risulta connesso con AR6.1 da 5 *step* mutazionali, mentre lo stesso AR6.1 presenta tuttavia un'affinità maggiore con l'individuo italiano AR5.1 (3 sostituzioni). Infine, i tre aplotipi turchi di *M. sp.2* cfr. *longulus* risultano interconnessi tra loro da 3 o al massimo 4 *step* mutazionali. L'aplotipo corrispondente all'unico esemplare analizzato di *M. sp.* cfr. *coracinus* si colloca all'interno della *network* con una distanza pari a 3, in termini di sostituzioni nucleotidiche, rispetto a LOB3.1 (*M. sp.2* cfr. *longulus*).

Occorre infine sottolineare che alcuni aplotipi presentano un numero di *step* mutazionali nei confronti degli aplotipi più prossimi, ma attribuiti a specie differenti, eguale o ridotto rispetto a quello rilevabile nei confronti con aplotipi conspecifici: ER20.1 (Grecia, Peloponneso) presenta lo stesso numero di *step* mutazionali nei confronti di ER16.1 (Grecia, Monte Ossa) e di uno dei due individui turchi di *M. coracinus* (CR12.1), AR13.1 (Ungheria) presenta lo stesso numero di sostituzioni nei confronti di ER15.1, LOB1.1 e AR6.1, e infine la stessa condizione si verifica per LOB3.1 nei confronti di LOB2.1, CRb1.1 e AR6.1.





## 5. DISCUSSIONE

Il possibile quadro tassonomico e le ricostruzioni filogenetiche del sottogruppo di specie di *M. coracinus* provenienti dalle analisi molecolari mediante il marcatore della Regione di Controllo mettono di nuovo in luce le problematiche relative all'incongruenza tra le evidenze molecolari e morfologiche già evidenziate dai precedenti studi. I risultati delle analisi condotte mediante questo marcatore sono infatti anch'essi, per molti aspetti, in forte contrasto con le evidenze morfologiche (Antonini, 1999; Audisio *et al.* 2000; 2001a, 2001b; 2002).

In generale, le topologie degli alberi filogenetici ottenuti mettono di nuovo in evidenza una condizione apparentemente "polifiletica" (come definita da Funk & Omland, 2003) per gran parte delle specie esaminate, dal momento che spesso esemplari attribuiti ad una medesima specie non si riuniscono in uno stesso clade, ma prendono posto all'interno di raggruppamenti in cui sono invece contenuti individui assegnati ad una, o a più specie, morfologicamente ben distinte. Inoltre in tutte le ricostruzioni filogenetiche, come già accennato, sono distinguibili due principali raggruppamenti: il "clade orientale" che comprende quasi la totalità dei campioni di differenti specie originari delle aree medio-orientali (Turchia, Grecia, Ungheria, Romania e Siberia) e il "clade occidentale" in cui sono compresi gran parte degli individui, anch'essi ascritti a differenti specie, provenienti principalmente da Italia e Spagna. Tutti gli esemplari esaminati per *M. longulus*, *M. thalassophilus* e *M. matronalis* si trovano all'interno del "clade occidentale", mentre gli individui di *M. sp. cfr. coracinus* e *M. sp.2 cfr. longulus* (specie endemiche della Turchia orientale) si trovano tutti all'interno del "clade orientale"; per *M. coracinus*, *M. erysimicola* e *M. arankae* sono invece rinvenibili esemplari compresi in entrambi i due principali raggruppamenti.

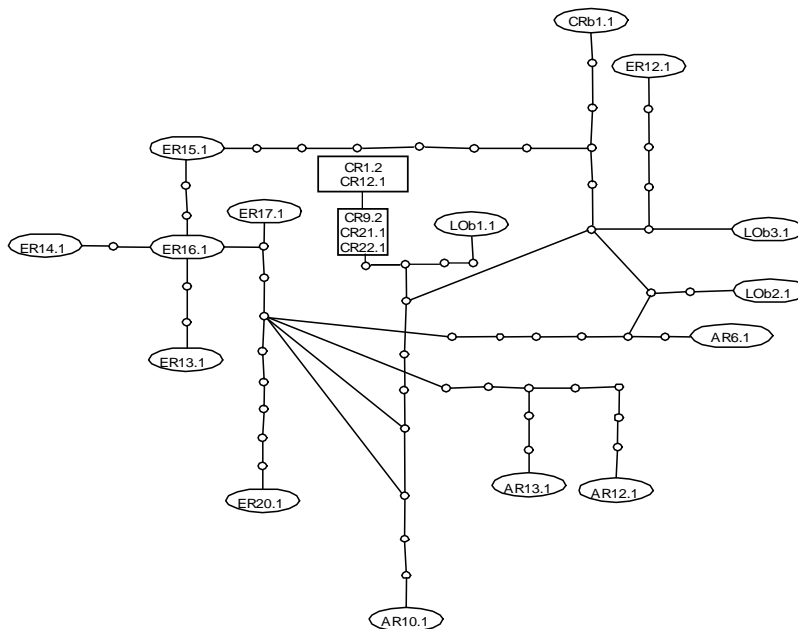
La topologia dell'albero filogenetico di NJ (*fig. 15*) e le distanze genetiche mostrano chiaramente un differente tasso di sostituzione all'interno dei due principali cladi: nel "clade orientale" le relazioni evolutive tra i taxa risultano infatti scarsamente o per nulla risolte, mentre nel "clade occidentale" il tasso di sostituzione del marcatore - che al confronto risulta più elevato - è tale da permettere una migliore distinzione dei taxa tra di loro, pur non consentendo di risolvere in modo chiaro le relazioni filogenetiche delle specie al suo interno.

Sulla base dei risultati ottenuti non è dunque possibile assegnare una posizione filogenetica definitiva alla maggior parte delle specie esaminate. Ad ogni modo si può tentare una interpretazione dei risultati facendo riferimento ad alcuni possibili meccanismi evolutivi che sono probabilmente all'origine del differenziamento di questo sottogruppo di specie.

Per rendere più chiara l'esposizione è opportuno discutere le ricostruzioni filogenetiche esaminando separatamente gli aplotipi raggruppati all'interno del "clade orientale" da quelli, invece, compresi nel "clade occidentale".

Considerando esclusivamente gli esemplari contenuti all'interno del "clade orientale", l'unica entità tassonomica chiaramente discreta risulta essere *M. erysimicola*, rappresentato in questo raggruppamento esclusivamente da esemplari di origine greca. Gli altri aplotipi, molti dei quali riferibili a taxa certamente distinguibili a livello specifico su base morfologica (*M. coracinus*, *M. sp.* cfr. *coracinus*, *M. sp.2* cfr. *longulus*, *M. arankae*) presentano tra loro distanze genetiche molto esigue, e risultano in tutte le ricostruzioni filogenetiche riuniti in piccoli gruppi eterogenei o all'interno di politomie irrisolte. In particolare, la considerevole affinità genetica che esiste tra tutti gli individui di origine turca delle specie comprese all'interno del "clade orientale", potrebbe essere il risultato di eventi di ibridazione e di successiva introgressione, più o meno recente, di alcuni aplotipi mitocondriali. In effetti, una delle indicazioni più rilevanti per risalire a fenomeni di introgressione è la condivisione a livello locale di aplotipi tra popolazioni simpatriche di specie morfologicamente e - in altre aree geografiche - geneticamente ben differenziate (Sota *et al.*, 2001; Funk & Omland, 2003; Rokas *et al.*, 2003b). Questa condizione normalmente riflette l'esistenza di un flusso genico locale ancora in atto tra le popolazioni, o, in ogni modo, ristrettosi o annullatosi solo in tempi molti recenti (Masta *et al.*, 2002; Redenbach & Taylor, 2002; Funk & Omland, 2003). E' piuttosto difficile supporre che molteplici eventi di ibridazione con successiva introgressione di aplotipi mitocondriali possano essere avvenuti in tempi estremamente recenti, o che possano tuttora aver luogo scambi di materiale genetico tra le specie esaminate del sottogruppo di *M. coracinus* data la consistente differenziazione morfologica - anche a livello degli organi genitali - manifestata dai taxa in questione. E' in effetti più parsimonioso ammettere piuttosto che un unico ed antico *pool* genico sia andato incontro a frammentazione dando luogo a *pool* genici separati, tuttora in fase di divergenza. Non risulterebbe, quindi, del tutto inverosimile ipotizzare che, ad esempio, la regione anatolico-orientale abbia rappresentato nel post-glaciale il centro di origine e di diversificazione dell'intero sottogruppo (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1999; Rokas *et al.*, 2003a) e che il "clade orientale" possa in effetti occupare una posizione basale, piuttosto che "derivata" all'interno degli alberi filogenetici ricostruiti su base molecolare. Le popolazioni appartenenti a varie specie di Siberia, Grecia, Romania ed Ungheria, anch'esse incluse nel "clade orientale", dal momento che presentano generalmente nei confronti degli aplotipi turchi una significativa distanza genetica (tabella 6), potrebbero essersi differenziate geneticamente solo recentemente dalle popolazioni turche conspecifiche.

Prendendo in considerazione tutti gli esemplari compresi all'interno del "clade orientale", le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi ricostruite mediante *network* di parsimonia statistica risultano maggiormente risolte (ovvero, presentano un numero minore di connessioni multiple) quando si utilizza come marcatore la Regione di Controllo (*figura 21*) piuttosto che la COI (*figura 22*).



**Figura 22 – Risultato delle relazioni filogenetiche ottenute mediante Parsimonia Statistica su 17 aplotipi di COI per gli individui inclusi nel clade orientale.**

Figure 22 – Unrooted statistical parsimony illustrating phylogenetic relationship for 17 mtDNA COI haplotypes.

Come è immediatamente visualizzabile tramite queste ricostruzioni grafiche (e dalla *tabella 7*), le sequenze di COI degli esemplari di *M. coracinus* sono riconducibili solamente a due differenti aplotipi (*figura 22*), mentre per la Regione di Controllo ogni esemplare di *M. coracinus* è portatore di un aplotipo unico (*figura 21*). Inoltre è possibile notare che gli aplotipi di gran parte delle specie morfologicamente distinte presentano generalmente tra loro una maggiore affinità nella *network* ricostruita mediante la Regione di Controllo rispetto a quella ottenuta sulla base dei dati della COI: nelle ricostruzioni tramite la Regione di Controllo, infatti, gli aplotipi appartenenti ad una stessa specie risultano più spesso separati tra loro da un numero inferiore di sostituzioni nucleotidiche, rispetto al numero di sostituzioni che li dividono, invece, dagli aplotipi eterospecifici (*figure 21 e 22*). La Regione di Controllo sembra, dunque, ricostruire in maniera più congruente rispetto alla COI le relazioni evolutive interne al "clade orientale", in conformità con l'attribuzione degli aplotipi alle differenti specie distinguibili su base morfologica. Tuttavia, anche questo marcatore, pur presentando una diversità circa tre volte superiore rispetto a quella della COI (*tabella 7*), non permette di risolvere chiaramente e definitivamente le relazioni filogenetiche interspecifiche tra i

taxa all'interno del "clade orientale". Poiché il DNA mitocondriale è aploide, ed è ereditato per via materna, la taglia effettiva della popolazione ( $N_e$ , *effective population size*) per i loci mitocondriali risulta teoricamente quattro volte ridotta rispetto a quella dei loci nucleari (Hoelzer, 1997), per cui la separazione degli alleli e il conseguente accumulo di mutazioni specifiche all'interno di due linee filitiche derivate dovrebbe teoricamente progredire in maniera più veloce per i loci mitocondriali. Tuttavia, gli effetti di *incomplete lineage sorting* si manifestano anche nelle ricostruzioni di alberi filogenetici effettuate mediante l'uso di geni mitocondriali, soprattutto nel caso di taxa che potrebbero aver subito una radiazione adattativa molto rapida. Gli eventi di speciazione promossi da una rapida radiazione adattativa possono avvenire velocemente e prima che gli alleli possano avere il tempo di differenziarsi all'interno delle rispettive linee filitiche (Moran & Kornfield, 1993). In effetti, alcuni fattori ecologici possono essere alla base di eventi di speciazione molto rapida (Schluter, 2000) e, negli insetti fitofagi, si suppone che i processi che possono portare ad un cambiamento nel regime trofico (*host shift*) e alla specializzazione trofica di un taxon nei confronti di una pianta ospite, possano essere causa di una rapida differenziazione che può portare, in certe circostanze, a veri e propri eventi di speciazione (Jaenike, 1990; Kelley *et al.*, 2000; Futuyma, 2000).

Per quanto detto finora, nel caso del "clade orientale", risulta difficile attribuire i risultati delle ricostruzioni filogenetiche esclusivamente ad eventi di ibridazione o ad un effetto di *incomplete lineage sorting* legato alla velocità nel tasso di sostituzione del marcatore. Dal momento che un effetto di *incomplete lineage sorting* non porta necessariamente, come nel caso invece dell'introggressione, all'aggregazione in uno stesso clade di esemplari aventi identica o simile origine geografica (Hare & Avise, 1998; Masta *et al.*, 2002; Rokas *et al.* 2003b), e, d'altra parte, poiché le relazioni tramite *network* ricostruite tramite la Regione di Controllo risultano relativamente più congruenti con i dati morfologici rispetto a quelle ricostruite per mezzo della COI, solamente un insieme di entrambi questi fenomeni potrebbe spiegare i risultati delle ricostruzioni filogenetiche ottenute per il "clade orientale".

Si potrebbe ipotizzare, quindi, che eventi di ibridazione siano effettivamente avvenuti in tempi recenti, e che attualmente non esista flusso genico tra le specie esaminate; tuttavia, ipotizzando velocità di evoluzione notevolmente differenti dei caratteri morfologici e molecolari studiati, a causa di una veloce radiazione adattativa - dovuta probabilmente a *shift* di nicchia trofica - non seguita da un completo differenziamento nei *loci* genici esaminati, anche un marcatore con una elevata velocità di evoluzione come la Regione di Controllo nei *Meligethes* non permetterebbe di distinguere a livello genetico specie altrimenti facilmente distinguibili tra loro da un punto di vista morfologico ed ecologico.

Poiché non esistono al momento metodologie statistiche valide applicabili sui dati disponibili per stabilire quali tra le ipotesi (ibridazione o *incomplete lineage sorting*) finora esposte per interpretare i dati sia la più verosimile (Holder *et al.*, 2001), sarà necessario in futuro condurre un confronto di questi risultati con quelli provenienti da ricostruzioni filogenetiche ottenute mediante l'uso di nuovi marcatori nucleari necessariamente dotati di un elevato tasso di sostituzione.

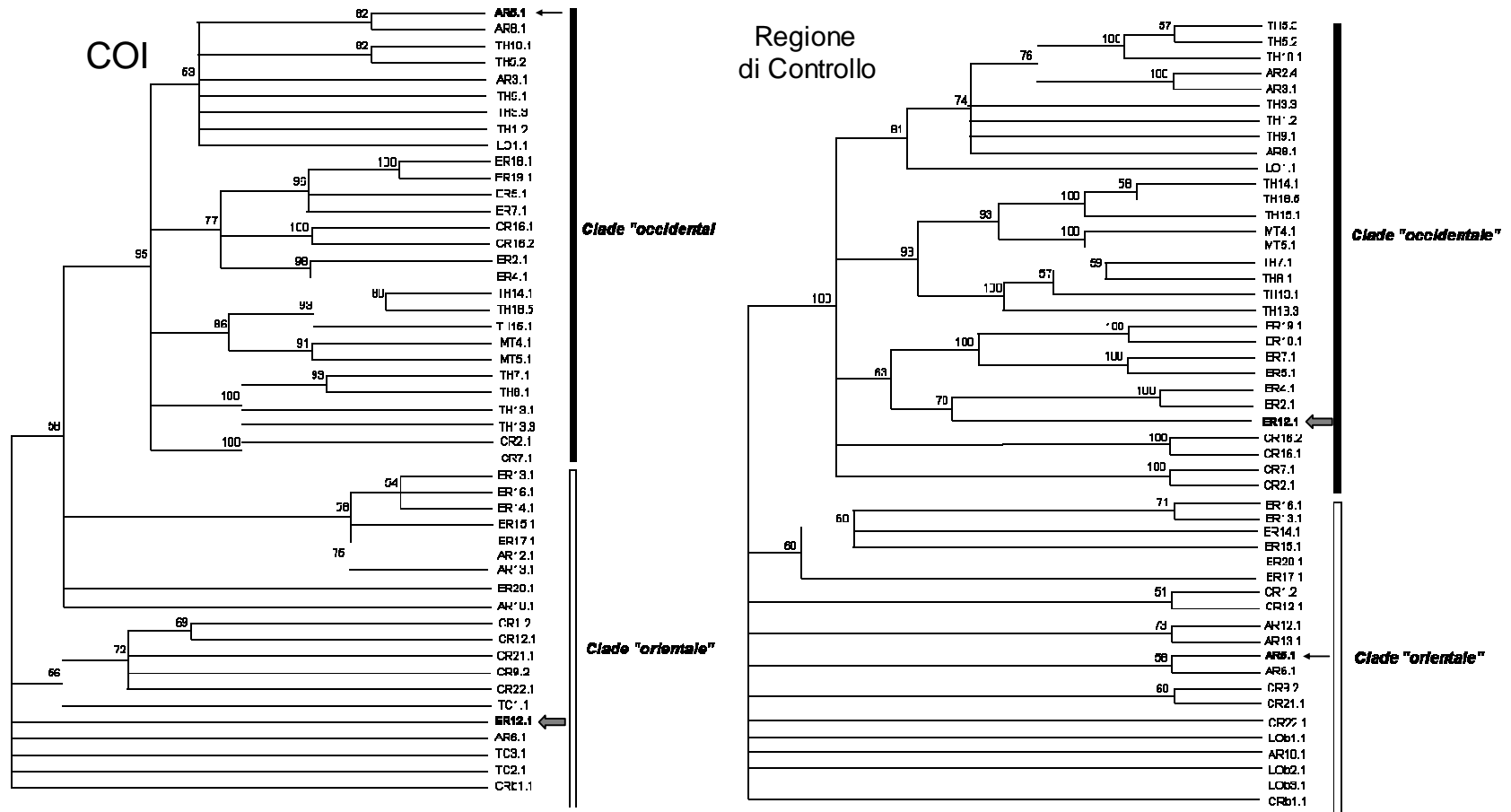
In ogni caso, malgrado non sia possibile chiarire sulla base dei dati disponibili l'effettiva storia evolutiva e le reciproche relazioni per *M. coracinus*, *M. erysimicola* e *M. arankae*, data inoltre la presenza per questi taxa di alcuni esemplari conspecifici anche all'interno del "clade occidentale", si può tuttavia ipotizzare, almeno per le due specie endemiche della Turchia orientale comprese nel "clade orientale", origini recenti tramite *host shift*. *M. sp. cfr. coracinus* potrebbe essersi originata precocemente ed isolarsi solo recentemente, a seguito di un possibile *shift* di piante ospiti verso *Arabis sp.* con colonizzazione di ambienti marginali dell'areale (Anatolia orientale); questa entità, caratterizzata da apparati genitali maschili e femminili piuttosto peculiari e contraddistinta anche da caratteri morfologici "intermedi" tra *M. coracinus* e *M. erysimicola*, potrebbe essere considerata probabilmente una specie distinta per la quale, tuttavia, è necessario approfondire i rapporti evolutivi con queste due specie. *M. sp. cfr. 2 longulus*, probabilmente originatasi da un ceppo che avrebbe dato origine anche all'attuale *M. arankae* e *M. longulus* (vedi in seguito), dal momento che risulta legata alla rara e localizzata *Tchihatchewia isatidea*, potrebbe aver sperimentato un drastico *shift* estremamente recente dal genere *Hesperis* verso l'isolatissima *Tchihatchewia isatidea* (tribù delle Lunarieae) in ambienti morenici glaciali (probabilmente dell'Anatolia orientale e delle aree armeno-caucasiche).

Per quanto riguarda il "clade occidentale" esso è composto principalmente da cinque sottogruppi (*figure 16, 17, 18*). Due di questi sottogruppi corrispondono a *cluster* che comprendono rispettivamente gli esemplari italiani e spagnoli di *M. coracinus*. Sulla base degli alberi di consenso ottenuti tramite *bootstrap* non è possibile assegnare una posizione filogenetica chiara a questi esemplari nei confronti di tutti gli altri individui compresi all'interno del "clade occidentale". Inoltre, l'elevata distanza genetica rilevata per gli esemplari spagnoli (distanza *p* media = ca. 16%) ed italiani (distanza *p* media = ca. 6%) nei confronti dei campioni conspecifici di *M. coracinus* (compresi tutti all'interno del "clade orientale") potrebbe essere spiegata da un isolamento genetico, più o meno recente, di queste popolazioni rispetto alle popolazioni orientali. In effetti, popolazioni localizzate in aree periferiche dell'areale di distribuzione di una specie ampiamente distribuita -

come è esattamente nel caso delle popolazioni spagnole e italiane di *M. coracinus* - e che posseggono inizialmente un sottoinsieme di alleli condivisi con le popolazioni parentali, a causa di un locale isolamento possono perdere per deriva genetica gran parte di questi alleli, accumulando invece, più velocemente, alleli specifici (Funk & Omland, 2003). In alcune circostanze, un isolamento di questo tipo può portare a quella che viene definita “*peripatric*” o “*budding speciation*” (Harrison, 1991; Frey, 1993; Funk & Omland, 2003), per cui popolazioni isolate di piccole dimensioni possono potenzialmente differenziarsi in nuove specie in tempi molto rapidi. Ci sono evidenze per cui una distribuzione non omogenea o il locale isolamento di una risorsa trofica, in questo caso di una pianta ospite, potrebbe accompagnare o promuovere un processo di differenziazione tra le popolazioni di una stessa specie, sebbene non sia del tutto chiaro se, nel tempo, questo possa effettivamente portare ad un vero e proprio processo di speciazione (Kelley *et al.*, 2000; Janz *et al.*, 2006). Per quanto detto finora, non sembra del tutto inverosimile che le popolazioni turche di *M. coracinus*, e/o altre popolazioni comprese all’interno del “clade orientale”, possano effettivamente rappresentare le popolazioni “parentali” delle popolazioni italiane e spagnole esaminate per questa specie; inoltre le attuali caratteristiche ecologiche marcatamente frigofile di *M. coracinus* fanno ritenere probabile una differenziazione di questa specie in Asia Centrale o in Siberia sud-occidentale; la sua ampia attuale distribuzione in larga parte della regione Palearctica è probabilmente correlata ad una sua diffusione relativamente recente durante l’ultima glaciazione Würmiana lungo una direttrice Est-Ovest in Europa Centrale e Settentrionale. Sulla base dei dati molecolari a nostra disposizione sarebbe teoricamente possibile contemplare per *M. coracinus* l’effettiva esistenza di reali *sibling species* allopatriche, e dunque non sarebbe da escludere per *M. coracinus* l’esistenza di specie criptiche, discriminabili tra loro solo a livello genetico, pur essendo del tutto indistinguibili morfologicamente. Tali specie criptiche potrebbero mantenere una morfologia comune di tipo ancestrale (Jarman & Elliot, 2000) o, possedere una morfologia simile per una evoluzione convergente dei caratteri morfologici, a causa di pressioni selettive molto simili (Schluter & Nagel, 1995; Kim *et al.*, 2000, Rees *et al.*, 2001; Richmond & Reeder, 2002). Tuttavia sembrerebbe più realistico ammettere che le elevate divergenze genetiche tra le popolazioni di differente origine geografica di *M. coracinus* possano essere dovute ad un effetto di cline geografico di variazione genetica, ovvero ad una variazione graduale delle caratteristiche genetiche di una specie in aree geografiche adiacenti. Un campionamento più ampio per questa specie in settori intermedi tra l’Italia e la Turchia orientale, e la ricostruzione della storia filogenetica dei loro aplotipi, permetteranno di meglio valutare la verosimiglianza di questa ipotesi.

Uno dei raggruppamenti interni al “clade occidentale” include esemplari greci (ER 18.1, ER 19.1), turchi (ER 5.1, ER 7.1, ER 12.1), ed italiani (ER 2.1, ER 4.1) di *M. erysimicola*. Sia sulla base delle analisi condotte con il gene della COI, che nelle analisi con il marcatore della Regione di Controllo, l’insieme degli esemplari greci esaminati per *M. erysimicola* si distribuiscono sia all’interno del “clade occidentale”, sia all’interno del “clade orientale”. Inoltre, mentre sulla base delle analisi filogenetiche condotte con il gene della COI l’esemplare turco ER 12.1 prende posizione all’interno del “clade orientale”, in tutte le ricostruzioni filogenetiche condotte mediante la Regione di Controllo esso si posiziona, invece, all’interno del “clade occidentale” (figura 23). La possibilità di rilevare a seconda del marcatore considerato un’affinità molto ridotta o estremamente elevata tra aplotipi di esemplari conspecifici provenienti da differenti aree geografiche (si intenda, in questo caso, “orientale” o “occidentale”), presuppone una separazione ancora in atto degli alleli nelle popolazioni esaminate dovuta ad *incomplete lineage sorting* dei marcatori utilizzati. Questi dati evidenziano un differenziamento genetico, tuttora in corso, delle popolazioni di *M. erysimicola* localizzate nelle aree ovest-mediterranee rispetto ad un ceppo ancestrale probabilmente originario della Grecia o della regione anatolica, a seguito di una migrazione secondo una direzione est-ovest da aree rifugiali glaciali centro-asiatiche o anatoliche durante il Pleistocene.

Gli ultimi due raggruppamenti interni al “clade occidentale” contengono la totalità degli individui di *M. thalassophilus*, *M. matronalis* e *M. longulus* e la maggior parte degli individui italiani di *M. arankae*. Sulla base di queste ricostruzioni risulta difficile, in primo luogo, assegnare una posizione tassonomica definitiva per *M. thalassophilus*. Una parte delle popolazioni di *M. thalassophilus*, in particolare quelle dell’Italia peninsulare associate a *Matthiola sinuata* e a *M. incana* (TH 1.2, TH 3.3, TH 5.2, TH5.3, TH 9.1, TH 10.1), si riuniscono in un unico clade in cui sono contenuti anche gran parte degli individui italiani di *M. arankae* (AR2.4, AR3.1, AR 8.1) e l’unico individuo di *M. longulus* (LO 1.1). D’altro canto, gli individui delle popolazioni di *M. thalassophilus* della Sicilia (TH 7.1, TH 8.1, TH 13.1, TH 13.3) e della Spagna (TH 14.1, TH 15.1, TH 18.5) si collocano in un clade differente, in cui sono compresi peraltro anche gli esemplari di *M. matronalis* (MT 4.1, MT 5.1). L’elevata divergenza intraspecifica di *M. thalassophilus* ( $p = 6.22\%$ ) rende critica l’assegnazione di tutti gli individui studiati ad un unico taxon ovest-mediterraneo ben distinto.



**Figura 23** – Confronto delle ricostruzioni filogenetiche per il sottogruppo-*coracinus* (albero di consenso 50% *majority rule* ottenuto mediante *bootstrap* su NJ) tramite COI (sinistra) e Regione di Controllo (destra). Le frecce indicano i differenti posizionamenti di ER12.1. (←) e AR5.1 (←) all'interno di ciascuna ricostruzione

*Figure 23* – Comparison between COI (left) and Control Region (right) NJ 50% bootstrap consensus trees for *M. coracinus* subgroup. Different positions for ER12.1 and AR5.1 are indicated by arrows (←; ←).



Le sue popolazioni, geograficamente distanti (aree cantabriche della Penisola Iberica, aree costiere dell'Italia Centrale, Puglia e Sicilia), sono probabilmente in piena evoluzione sotto il profilo genetico e dal punto di vista ecologico, considerando le differenti piante ospiti e i diversi ambienti colonizzati dalle popolazioni attribuibili a questo taxon (vedi *tabella 1*).

Per quanto riguarda *M. arankae*, gran parte dei campioni italiani esaminati, come detto, presentano una maggiore affinità genetica con le popolazioni di *M. thalassophilus* dell'Italia peninsulare. È interessante notare, tuttavia, che almeno uno degli individui italiani esaminati (AR5.1) si trova nelle ricostruzioni effettuate tramite la Regione di Controllo all'interno del "clade orientale" piuttosto che, come suggerito dalle ricostruzioni filogenetiche tramite COI, all'interno del "clade occidentale" insieme agli altri esemplari italiani conspecifici (*figura 22*). Analogamente a quanto già detto per *M. erysimicola*, questa condizione potrebbe essere spiegata da fenomeni di *incomplete lineage sorting* dei marcatori utilizzati, con l'effettiva coesistenza di aplotipi "ancestrali" e "derivati" in alcune popolazioni, evidentemente tuttora in fase di differenziamento genetico. Per quanto riguarda *M. longulus*, la ricostruzione tramite la Regione di Controllo mostra chiaramente la maggiore affinità di questo taxon con *M. thalassophilus* e *M. arankae*, in particolare con gli esemplari delle popolazioni dell'Italia peninsulare di entrambe queste specie. Le popolazioni italiane esaminate per *M. matronalis* presentano invece una maggiore affinità con le popolazioni spagnole di *M. thalassophilus*. Seppure la posizione di *M. matronalis* risulti molto chiara all'interno delle ricostruzioni tramite la Regione di Controllo, nel precedente studio più ampio condotto tramite la COI, gli esemplari armeni esaminati per questo taxon rientravano all'interno del "clade orientale" (*figura 2*), per cui anche per *M. matronalis* è difficile assegnare una posizione filogenetica definitiva all'interno del sottogruppo di specie di *M. coracinus*. Per tentare tuttavia di spiegare le relazioni evolutive esistenti tra *M. arankae*, *M. thalassophilus*, *M. longulus* e *M. matronalis*, si può ipotizzare che una forma ancestrale, probabilmente legata al genere *Hesperis* potrebbe aver dato luogo ad una radiazione di specie o semispecie allopatriche nelle aree anatolico-caucasiche. Il ceppo *matronalis-arankae* potrebbe essersi differenziato in queste circostanze, originando successivamente un ceppo *arankae-thalassophilus* che avrebbe colonizzato ambienti marginali del primitivo areale di *M. arankae* (rispettivamente in Anatolia orientale e nel Mediterraneo centrale), con *shift* di piante ospiti verso il genere vegetale *Matthiola*. L'evoluzione per questo gruppo di specie potrebbe aver seguito l'evoluzione della tribù delle Hesperideae nel Mediterraneo centro-occidentale che in sostanza coincide con quella delle specie dei generi *Matthiola* e *Hesperis* (Conti, 1900; Pignatti, 1982; Tammara, 1985; Jalas & Suominen, 1994; 1996): entrambi i generi si ritiene, in effetti, che abbiano raggiunto l'Europa meridionale e si siano diversificati nel Mediterraneo

occidentale a partire da ceppi di origine orientale (Anatolica e Turanica), in periodi riconducibili ai cicli glaciali Plio-Pleistocenici, durante i quali importanti contingenti di specie steppiche e parasteppiche hanno colonizzato l'Europa sud-occidentale (Bertoldi *et al.*, 1989; La Greca, 1977; 2002; Audisio & De Biase, 1993). In questo contesto, *M. longulus* potrebbe rappresentare un taxon rimasto isolato in Turchia orientale subito dopo il differenziamento genetico del ceppo *arankae-thalassophilus*. La causa di tale isolamento potrebbe essere attribuita ad un improvviso *shift* di nicchia trofica verso l'attuale pianta ospite di *M. longulus*, la rara ed endemica *Matthiola odoratissima*, che presenta, peraltro, una distribuzione molto frammentata negli ambienti suberefici delle aree circumpontiche.

La totale mancanza di omologia delle sequenze di Regione di Controllo ottenute per *M. fulvipes*, *M. cristofaroi* e *M. epeirosi*, non permette ovviamente di stabilire le relazioni filogenetiche con le altre specie del sottogruppo di *M. coracinus*, ma confermano la condizione isolata e ben differenziata di questi tre taxa. *M. explanatus* e *M. accentus*, non inclusi nelle analisi molecolari, hanno avuto anch'essi probabilmente una derivazione indipendente, colonizzando, in condizioni ecologiche estreme, aree desertiche dell'Asia Centrale e del Deserto Siriano. Essi sono infatti, come detto, fortemente distinti dalle altre specie del sottogruppo per la forma appiattita del corpo e per i genitali maschili ampiamente differenti.

Sebbene non vi siano dati relativi alla Regione di Controllo per la specie *M. subaeneus*, le analisi mediante la COI prevedevano una posizione molto isolata di questo taxon nei confronti di tutti gli altri taxa del sottogruppo di *M. coracinus* (figura 2). Una forma strettamente riconducibile all'attuale *M. subaeneus*, legata forse al genere *Cardamine* o a generi affini, e probabilmente associata ad ambienti nemorali mesofili con affioramenti rocciosi potrebbe aver dato origine nel tardo Pliocene alle restanti specie del sottogruppo-*coracinus*. La forma attuale, tuttavia, potrebbe essersi estremamente differenziata morfologicamente e geneticamente rispetto alla forma ancestrale, rappresentando attualmente un taxon molto ben distinto e relativamente isolato rispetto alle altre specie del sottogruppo.

## 6. CONCLUSIONI

Sulla base delle ricostruzioni filogenetiche finora effettuate attraverso i marcatori molecolari è possibile affermare che l'evoluzione del sottogruppo di specie di *Meligethes coracinus* è il risultato di una sovrapposizione di molteplici fenomeni storici e microevolutivi più o meno correlati e interdipendenti tra loro. Il sottogruppo-*coracinus*, da ritenere tuttora in piena evoluzione e differenziamento, probabilmente si è originato alla fine del Pliocene, a seguito di processi di specializzazione e generalizzazione trofica, in associazione con diversi generi di Brassicaceae, in Europa centro-meridionale e nelle aree anatolico-caucasiche. Una serie di studi suggerisce che gli insetti fitofagi che posseggono associazioni trofiche con differenti piante ospiti possono andare incontro a rapide differenziazioni che possono portare nel tempo a veri e propri eventi di speciazione, sebbene i meccanismi di base che portano a tali differenziamenti non siano stati ancora del tutto chiariti (Mitter *et al.*, 1991; Farrell, 1998; Janz *et al.*, 2006). Nonostante i numerosi studi condotti, sono pochissime le evidenze a sostegno di fenomeni di coevoluzione tra insetti e piante ospiti (Futuyma, 2000); piuttosto molti studi suggeriscono che i meccanismi di colonizzazione di nuove risorse trofiche tramite *shift* nella scelta dell'ospite sono probabilmente alla base delle differenziazioni e la causa delle attuali associazioni tra insetti e piante ospiti (Janz *et al.* 2001; Nyman, 2002). Dal momento che le specie del sottogruppo *coracinus* sono legate in gran parte a gruppi di generi affini della famiglia delle Brassicaceae, in particolare al gruppo *Hesperis-Matthiola* o Hesperideae *sensu stricto*, e ai generi *Erysimum*, *Sisymbrium*, *Cardamine*, *Arabis* e *Brassica*, non è da escludere l'esistenza, se non di una coevoluzione, certamente di una evoluzione largamente parallela o sequenziale tra questo gruppo di Coleotteri e le loro piante ospiti.

Le relazioni filogenetiche ricostruite mediante la Regione di Controllo del DNA mitocondriale mostrano i limiti oggettivi di risoluzione anche di questo marcatore molecolare, malgrado l'elevato tasso evolutivo, probabilmente a causa di una evoluzione molto recente del sottogruppo a seguito di una rapida radiazione adattiva promossa da meccanismi di *host shift* che avrebbero coinvolto le specie esaminate. Data la complessità dei processi di speciazione che probabilmente sottendono alla storia evolutiva del sottogruppo-*coracinus*, i *fattori stocastici* legati ad una inadeguatezza nel tasso di evoluzione del marcatore utilizzato sembrerebbero non rappresentare i principali, o, comunque, i soli responsabili dell'incongruenza tra dati molecolari e morfologici. La condizione "polifiletica" rilevata per la gran parte dei taxa è molto probabilmente un risultato che riflette l'effettiva storia evolutiva delle popolazioni delle specie esaminate, per cui, ad esempio, la condivisione di polimorfismi ancestrali potrebbe essere la conseguenza di una strutturazione genetica delle

popolazioni effettivamente legata ai cicli delle glaciazioni pleistoceniche. In casi come questi, in cui è chiaramente complesso delimitare su base molecolare i “confini” delle specie esaminate, risulta ancor più difficile ricostruirne le reciproche relazioni evolutive, senza approfondire l’entità dei fenomeni microevolutivi alla base delle incongruenze rilevate. La condizione monofiletica di un taxon secondo un *locus* genico (soprattutto nel caso dei geni mitocondriali) è stata recentemente enfatizzata come un criterio attendibile per determinare i limiti di una specie (Zink & McKittrick, 1995; Zink & Blakwell-Rago, 2000; Herbert *et al.*, 2003; Tautz *et al.*, 2003). Occorre tuttavia tenere presente che l’eventualità per cui certi alleli di una specie presentano una maggiore affinità con alleli di esemplari di specie differenti piuttosto che con alleli conspecifici non è un evento raro nelle ricostruzioni filogenetiche molecolari (Funk & Omland, 2003) e che quindi un sistema di delimitazione delle specie secondo un marcatore molecolare potrebbe rilevarsi in molti casi inadeguato (Meyer & Paulay, 2005; Hendrixson & Bond, 2005). Le “deviazioni” da una condizione monofiletica di una specie secondo uno o più *loci* genici, se non approfondite, possono portare ad una errata interpretazione dei risultati filogenetici per un loro eventuale utilizzo a livello tassonomico, oltre che a sottovalutare i processi microevolutivi alla base dei fenomeni di speciazione. Negli ultimi anni numerose ricerche hanno tentato di approfondire la natura stocastica della condivisione di aplotipi dovuta a fenomeni di *incomplete lineage sorting* dei marcatori e ad incorporare studi statistici di coalescenza in queste aree di indagine (Rosenberg & Nordborg, 2002; Knowles, 2004; Maddison & Knowles, 2006). Data la natura complessa e continua dei processi evolutivi l’indagine attraverso analisi filogeografiche o di genetica di popolazione ai livelli intermedi di divergenza tra popolazione e specie possono risultare estremamente utili per apportare un contributo alla comprensione della vera natura delle dinamiche evolutive alla base dei fenomeni di speciazione. Le relazioni evolutive delle specie del sottogruppo-*coracinus* dovranno, dunque, essere senz’altro studiate e approfondite anche in chiave filogeografica, nel tentativo di ricostruire la storia filogenetica degli aplotipi presenti nel loro *pool* genico sull’intera estensione del loro complessivo areale geografico.

Come già descritto, la Regione di Controllo del DNA mitocondriale nei *Meligethes* presenta tassi di evoluzione molto variabili, con almeno tre differenti livelli di divergenza corrispondenti alle tre zone a diversa variabilità identificate lungo la Regione stessa. Sebbene esistano evidenze per cui in alcuni insetti il tasso di sostituzione della Regione di Controllo mostri un valore più basso rispetto a quello relativo alla terza posizione di alcuni geni codificanti (Caccone *et al.*, 1996; Zhang & Hewitt, 1997) nei *Meligethes* il marcatore risulta invece promettente per condurre studi evolutivi a vari livelli tassonomici, ed alcune porzioni specifiche posseggono livelli di variabilità adatti per

condurre studi di genetica di popolazione o di tipo filogeografico. Sommando queste evidenze con quanto già noto per i coleotteri crisomelidi (Mardulyn *et al.*, 2003) la Regione di Controllo, almeno per questo ordine di insetti, risulta essere un marcatore dalle interessanti potenzialità di utilizzo in studi evolutivi (sebbene il tasso di sostituzione debba sempre essere esplorato più ampiamente in altre specie e generi di coleotteri differenti da quelli finora studiati). Indubbiamente le molteplici problematiche di tipo tecnico e la carenza di dati molecolari per questa porzione del DNA mitocondriale negli insetti non permettono di consigliarne un eventuale uso di *routine* per studi evolutivi. Sarebbe perciò auspicabile lo sviluppo e l'applicazione di nuove tecnologie biomolecolari a basso costo per l'isolamento e il sequenziamento di porzioni di DNA difficilmente caratterizzabili con le metodologie standard (ovvero, con le tecniche normalmente utilizzate per studi di sistematica molecolare) in concomitanza con l'acquisizione attraverso studi mirati di nuove ed approfondite conoscenze sulla struttura, la funzione e i meccanismi di evoluzione molecolare della Regione di Controllo negli insetti, in modo da agevolare la valutazione delle potenzialità di utilizzo di questa porzione del DNA mitocondriale come marcatore genetico in studi evolutivi su nuovi taxa animali.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Antonini G., 1999. Tesi di Laurea - Un approccio multimetodo alla sistematica del complesso di specie di *Meligethes coracinus* Sturm (Insecta, Coleoptera, Nitidulidae). Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali.
- Atkinson L. & Adams E.S., 1997. Double-strand conformation polymorphism (DCSP) analysis of the mitochondrial control region generates highly variable markers for population studies in a social insect. *Insect Molecular Biology*, 6: 369-376
- Audisio P., 1976a. Considerazioni tassonomiche su alcuni *Meligethes* associati a *M. difficilis* (Heer) (Coleoptera, Nitidulidae). *Fragmenta Entomologica*, 12 (2): 163-168.
- Audisio P., 1976b. Note su alcune specie italiane del genere *Meligethes* Stephens (Coleoptera, Nitidulidae). *Bollettino della Associazione romana di Entomologia*, 30 (1-4): 2-16.
- Audisio P., 1976c. Una nuova specie di *Meligethes* dell'Europa centro-meridionale (Coleoptera, Nitidulidae). *Fragmenta Entomologica*, 12 (3): 299-307.
- Audisio P., 1977a. Un nuovo *Meligethes* italiano del gruppo di specie di *M. aeneus* Fabricius (Coleoptera, Nitidulidae). *Bollettino della Associazione romana di Entomologia*, 31 (1-4): 15-22.
- Audisio P., 1977b. Una nuova specie di *Meligethes* dell'Anatolia (Coleoptera, Nitidulidae). *Bollettino della Associazione romana di Entomologia*, 31 (1-4): 23-28.
- Audisio P., 1978. Note su alcune specie europee del genere *Meligethes* Stephens (Coleoptera, Nitidulidae). *Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova*, 87: 115-124.
- Audisio P., 1983. Il problema della speciazione in forme simpatriche del genere *Meligethes* Stephens (Coleoptera, Nitidulidae). *Atti XII del Congresso nazionale italiano di Entomologia*, Roma, 1980, 2: 11-20.
- Audisio P., 1986. Les Nitidulidae (Coleoptera) décrits par Claudius Rey et conservés au Musée Guimet d'Histoire Naturelle de Lyon. *Bulletin de la Société linneenne de Lyon*, 55 (4): 119-125.
- Audisio P., 1988. Tassonomia, ecologia e distribuzione geografica di alcuni Kateretidae e Nitidulidae ovest-paleartici. *Fragmenta Entomologica*, 20 (2): 189-231.
- Audisio P., 1993a. *Coleotteri Nitidulidae-Kateretidae*. Fauna d'Italia, XXXII. Calderini, Bologna, 971 pp.
- Audisio P., 1993b. Nuovi dati faunistici e bionomici sui *Meligethes* di Turchia orientale, con descrizione di una nuova specie del gruppo di *M. difficilis* (Heer) (Coleoptera, Nitidulidae, Meligethinae). *Fragmenta Entomologica*, 24 (2): 181-193.
- Audisio P., Belfiore C., De Biase A. & Antonini G., 2001a. Identification of *Meligethes matronalis* and *M. subaeneus* based on morphometric and ecological characters (Coleoptera: Nitidulidae). *European Journal of Entomology*, 98: 87-97.

- Audisio P. & De Biase A., 1993. Gli elementi faunistici balcanici e ponto-pannonici nel popolamento delle Alpi Occidentali: casistica, congruenze, possibili interpretazioni biogeografiche. *Biogeographia, Lavori della Società italiana di Biogeografia, N.S.*, 16 (1992): 181-210.
- Audisio P. & De Biase A., 1999. Bionomic and morphological evidence of a new Southern European species of the *Meligethes viridescens*-complex (Coleoptera: Nitidulidae). *Folia Heyrovskiana*, 7: 99-113.
- Audisio P., De Biase A. & Antonini G., 2003. A new exceptional *Meligethes* of the *M. aeneus* species-group from Western Alps and an updated key to identification of *M. aeneus* and allied species (Coleoptera: Nitidulidae: Meligethinae). *Insect Systematics and Evolution*, 34 (2): 121-130.
- Audisio P., De Biase A., Antonini G., Belfiore C. & Oliverio M., 2001b. Morphological, molecular and ecological evidence of a new Euro-Anatolian species of the *Meligethes coracinus* complex (Coleoptera: Nitidulidae). *Insect Systematics and Evolution*, 31 (4): 361-385.
- Audisio P., De Biase A., Antonini G., Oliverio M., Ketmaier V. & De Matthaëis E., 2002. Specific distinction by allozymic data of sympatric sibling species of the pollen-beetle genus *Meligethes* (Coleoptera: Nitidulidae). *Italian Journal of Zoology*, 69: 65-69.
- Audisio P., De Biase A., Antonini G. & Mancini E., 2005a. Two new *Meligethes* of the *M. coracinus* complex from Southern Europe (Coleoptera, Nitidulidae). *Fragmenta entomologica*, 37 (1): 65-89.
- Audisio P., De Biase A., Antonini G. & Mancini E., 2005b. Redescription and natural history of *Meligethes longulus* Schilsky, 1894, and provisional revision of the *M. coracinus* species-complex (Coleoptera, Nitidulidae, Meligethinae). *Italian Journal of Zoology*, 72: 73-85.
- Audisio P., Mancini E. & De Biase A., 2006. A new species of the pollen-beetle genus *Meligethes* (Coleoptera: Nitidulidae) of the *M. aeneus* group from Greece, with review of the *M. subaeneus* complex. *Zootaxa*, 1275: 43-60.
- Audisio P., Jelínek J., Mariotti A. & De Biase A., 2000. The Coleoptera Nitidulidae and Kateretidae from Anatolian, Caucasian and Middle East regions. *Biogeographia, Lavori della Società italiana di Biogeografia*, 20: 241-354.
- Audisio P., Jelínek J. & Stevanovic M., 1999. Morphological and biogeographical reexamination of the *Meligethes squamosus* species-complex (Coleoptera, Nitidulidae, Meligethinae). *Folia Heyrovskiana*, 7: 61-71.
- Audisio P. & Spornraft K., 1990. Taxonomie, Ökologie und Verbreitung von *Meligethes coracinus* auctt. mit Beschreibung einer neuen Art (Coleoptera: Nitidulidae). *Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen*, 39 (3): 70-75.
- Avise J.C., 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York, 511 pp.
- Awadalla P., Eyre-Walker A. & Maynard Smith J., 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*, 286: 2524-2525.



- Bae J.S., Kim I., Sohn H.D. & Jin B.R., 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 978-985.
- Ballard J.W.O. & Dean, M.D., 2001. The mitochondrial genome: mutation, selection and recombination. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11: 667-672.
- Beard C.B., Hamm D.M. & Collins F.H., 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 2 (2): 103-124.
- Bensasson D., Zhang D.-X., Hartl D.L. & Hewitt G.M., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution*, 16 (6): 314-321.
- Bertoldi R., Rio D. & Thunell R., 1989. Pliocene-Pleistocene vegetational and climatic evolution of the south-central Mediterranean. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 72: 263-275.
- Birky C.W. Jr., 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms and model. *Annual Review of Genetics*, 35: 125-148.
- Bishop M.J. & Thompson E.A., 1986. Maximum likelihood alignment of DNA sequences. *Journal of Molecular Biology*, 190: 159-165.
- Bonfield J., Beal K., Jordan M., Cheng Y. & Staden R., 1999-2002. *The Staden Package Manual*. Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K.
- Boyce T.M., Zwick M. E. & Aquadro C.F., 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123: 825-836.
- Boyce T.M., Zwick M. E. & Aquadro C.F., 1994. Mitochondrial DNA in the bark weevils: phylogeny and evolution in the *Pissodes strobi* species group (Coleoptera: Curculionidae). *Molecular Biology and Evolution*, 11(2): 183-194.
- Brehm A., Harris D.J., Hernández M., Cabrera V.M., Larruga J.M., Pinto F.M. & González A.M., 2001. Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the *Drosophila subobscura* subgroup. *Insect Molecular Biology*, 10(6): 573-578.
- Brehm A., Harris D.J., Hernández M., Perez J.A., Larruga J.M., Pinto F.M. & González A.M., 2004. Phylogeography of *Drosophila subobscura* from north Atlantic islands inferred from mtDNA A+T rich region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 829-834.
- Brisout de Barneville C., 1863. In: Grenier A., *Matériaux puor servir à la faune des Coléoptères Français*. Paris (2): 1-130.
- Buroker N.E., Brown J.R., Gilbert G.A., O' Hara P.J., Beckenbach A.T., Thomas W.H. & Smith M.J., 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics*, 124: 157-163.

- Caccone A., Garcia B.A. & Powell J.R., 1996. Evolution of the mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Molecular Biology*, 5: 51-59.
- Camin J.H. & Sokal R.R., 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution*, 19: 311-326.
- Caterino M.S., Cho S. & Sperling F.A.H., 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, 45: 1-54.
- Clary D.O. & Wolstenholme D.R., 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 252-271.
- Clary D.O. & Wolstenholme D.R., 1987. *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A+T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *Journal of Molecular Evolution*, 25: 116-125.
- Clayton, D.A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28: 693-705.
- Clement M., Posada D. & Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1659.
- Conti P., 1900. Les espèces du genre *Matthiola*. *Mémoires de l'herbier Boissier*, 18: 1-84.
- Crowson R.A., 1955. *The natural classification of the families of Coleoptera*. E.W. Classey Ltd., Hampton, Middlesex., 214 pp.
- Crozier R.H. & Crozier Y.C., 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133: 97-117.
- De Biase A., 2000. Tesi di Dottorato – Variabilità genetica e livelli di specializzazione trofica in insetti antofagi del genere *Meligethes* (Coleoptera, Nitidulidae). Dottorato di Ricerca in Biologia Animale, XIII ciclo, Università degli Studi di Roma “La Sapienza”, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali.
- De Biase A., Antonini G., Mancini E. & Audisio P., 2003. Molecular taxonomy of two sympatric sibling species of the pollen-beetle genus *Meligethes* (Coleoptera, Nitidulidae). *Zootaxa*, 190: 1-16.
- Dotson E.M. & Beard C.B., 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Molecular Biology*, 10: 205-215.
- Drès M. & Mallet J., 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of Royal Society of London*, 367: 471-492.
- Easton A.M., 1947. An addition to Nearctic Nitidulidae (Coleoptera). *Annals and Magazine of Natural History* (London), (11) 14: 60-64.
- Easton A.M., 1957. The *Meligethes* of Japan (Coleoptera, Nitidulidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 109 (14): 395-420.

- Easton A.M., 1959. A new Nearctic species of *Meligethes* (Col., Nitidulidae). *Entomologist's Monthly Magazine*, 95: 58-60.
- Eck R.V. & Dayhoff M.O., 1966. *Atlas of protein sequence and structure*. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, MD.
- Edwards A.W.F. & Cavalli-Sforza L.L., 1963. The reconstruction of evolution. *Heredity*, 18: 553. Abstr.
- Efron B., 1982. *The jackknife, the bootstrap and other resampling plans*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- Efron B., Halloran E. & Holmes S., 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 7085-7090.
- Ericson B., 1999. Nya fynd av rapsbaggar (Coleoptera: Nitidulidae: *Meligethes*) med tre för Sverige nya arter. *Entomologisk Tidskrift*, 120: 117-125.
- Fabricius J.C., 1775. *Systema entomologiae sistens insectorum classes, ordines, genera, species, adjectis synonymis, locis, descriptionibus, observationibus*. Korte, Flensburgi et Lipsiae. 832 pp.
- Fabricius J.C., 1787. *Mantissa Insectorum sistens eorum species nuper detectas adjectis characteribus genericis, differentiis specificis, emendationibus, observationibus*. Hafniae, Proft., 348 pp.
- Farrell B.D. & Mitter C., 1990. Phylogeny of host-affiliation: have *Phyllobrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) and the Lamiales diversified in parallel? *Evolution*, 44: 1389-1403.
- Farrell B.D., 1998. "Inordinate fondness" explained: why are there so many beetles? *Science*, 281: 555-559.
- Farris J.S., 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics*, 5: 417-419.
- Fauron C.M.R. & Wolstenholme D.R., 1976. Structural heterogeneity of mitochondrial DNA molecules within the genus *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 73: 3623-3627.
- Felsenstein J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a *maximum likelihood* approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 368-376.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 (4): 783-791.
- Felsenstein J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual Review of Genetics*, 22: 521-565.
- Feng D. & Doolittle R.F., 1987. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution*; 25: 351-360.

- Fitch W.M., 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20: 406-416.
- Flook P.K., Rowell C.H. & Gellissen G., 1995. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 928-941.
- Förster A., 1849. Erster Nachtrag zu der Käferfauna der Rheinprovinz. *Verhandlungen des Naturhistorischen Vereins der Preussischen Rheinlande und Westfalens*, 6 (Suppl.): 1-45.
- Frey J.K., 1993. Modes of peripheral isolate formation and speciation. *Systematic Biology*, 42: 373-381.
- Friedrich M. & Muqim N., 2003. Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castanaeum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 502-512.
- Fukatsu T., 1999. Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. *Molecular Ecology*, 8: 1935-1945.
- Funk D.J., 1999. Molecular systematics of cytochrome oxidase I and 16S from *Neochlamisus* leaf beetles and the importance of sampling. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (1): 67-82.
- Funk D.J., Futuyma D.J., Ortì G. & Meyer A., 1995. Mitochondrial DNA sequences and multiple data sets: a phylogenetic study of phytophagous beetles (Chrysomelidae: *Ophraella*). *Molecular Biology and Evolution*, 12: 627-640.
- Funk D.J. & Omland K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequencies, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34: 397-423.
- Futuyma D.J., 1998. *Evolutionary Biology*, 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Futuyma D.J., 1999. *Potential evolution of host range in herbivorous insects*. Pp. 42-53. In: Spencer, N.R. Ed., Proceedings of the X International Symposium on biological weed control. Bozeman, Montana, USA.
- Futuyma D.J., 2000. Some current approaches in the evolution of plant-herbivory interactions. *Plant Species Biology*, 15:1-9.
- Goldman N., 1993. Statistical tests of models of DNA substitution. *Journal of Molecular Evolution*, 36: 182-198.
- Green P.J., 1995. Reversible jump Markov chain Monte Carlo computation and Bayesian model determination. *Biometrika*, 82: 711-732.
- Gu X., Fu X.-Y. & Li W.-H., 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 546-557.
- Hall J.C., Sytsma K.J. & Iltis H.H., 2002. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. *American Journal of Botany*, 89: 1826-1842.

- Hare M.P. & Avise J.C., 1998. Population structure in the American oyster as inferred by nuclear gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 119-128.
- Harrison R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4 (1): 6-11.
- Harrison R.G., 1991. Molecular changes and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 281-308.
- Hasegawa M., Kishino H. & Tano T., 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 21: 160-174.
- Hastings W.K., 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57: 97-109.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. & deWaard J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: 313-322.
- Hendrixson B.E. & Bond J.E., 2005. Testing species boundaries in the *Antrodiaetus unicolor* complex (Araneae: Mygalomorphae: Antrodiaetidae): "Paraphyly" and cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 405-416.
- Hewitt G.M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87-112.
- Hey J., 2000. Human mitochondrial DNA recombination: can it be true? *Trends in Ecology and Evolution*, 15 (5): 181-182.
- Hillis D.M. & Bull J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182-192.
- Hillis D.M. & Moritz C., 1990. *Molecular Systematics*. Sinauer Associated, Sunderland, Massachusetts, 647 pp.
- Hoelzer G.A., 1997. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees revisited. *Evolution*, 51: 622-626.
- Holder M.T., Anderson J.A. & Holloway A.K., 2001. Difficulties in detecting hybridization. *Systematic Biology*, 50: 978-982.
- Huelsenbeck J.P., Larget B., Miller R.E. & Ronquist F., 2002. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology*, 51 (5): 673-688.
- Huelsenbeck J.P. & Rannala B., 1997. Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, 276: 227-232.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R. & Bollback J.P., 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294: 2310-2314.

- Jaenike J., 1990. Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 243-273.
- Janz N., Nylin S. & Wahlberg N., 2006. Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. *BCM Evolutionary Biology*, 6:4.
- Jarman S.N. & Elliot N.G., 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anasphididae, 'living fossils' from Triassic. *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 624-633.
- Jelínek J., 1964. On the validity of the species *Meligethes basalis* Reitter (Col., Nitidulidae). *Acta societatis entomologicae czechosloveniae*, 61: 159-161.
- Jelínek J., 1981. Result of the Czechoslovak-Iranian Entomological Expedition to Iran 1970 and 1973. *Acta entomologica musei nationalis pragrae*, 40: 105-119.
- Jelínek J., 1982a. New and little known species of the genus *Meligethes* from Turkey and neighbouring countries (Coleoptera, Nitidulidae). *Türkiye Bitki Koruma Derg*, 5 (4): 201-214.
- Jelínek J., 1982b. New palaeartic species of the genus *Meligethes* (Coleoptera, Nitidulidae). *Acta entomologica bohemoslovaca*, 79: 289-300.
- Jelínek J., 1997. New descriptions and records of Brachypteridae and Nitidulidae from the Palaeartic region (Coleoptera). *Folia Heyrovskyana*, 5 (3): 123-138.
- Jelínek J. & Marek O., 1966. Two new palaeartic species of the genus *Meligethes* Steph. (Coleoptera, Nitidulidae). *Acta entomologica bohemoslovaca*, 63 (6): 453-458.
- Jordal B.H., Emerson B.C. & Hewitt G.M., 2006. Apparent 'sympatric' speciation in ecologically similar herbivorous beetles facilitated by multiple colonisations of an island. *In press*.
- Judd W.S., Sanders R.W. & Donoghue M.J., 1994. Angiosperm family pairs: preliminary cladistic analyses. *Harvard Papers of Botany*, 5: 1-51.
- Junqueira A.C.M., 2004. The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphorida). *Gene*, 339: 7-15.
- Kelley S.T., Farrell B.D. & Mitton J.B., 2000. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Heredity*, 84: 218-227.
- Kim C.G., Zhou H.Z., Imura Y., Torminaga O., Su Z.H. & Osawa S., 2000. Pattern of morphological diversification in the *Leptocarabus* ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as deduced from mitochondrial ND5 gene and nuclear 28S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 137-145.
- Kim I., Cha S.Y., Yoon M.H., Hwang J.S., Lee S.M., Sohn H.D. & Jin B.R., 2005. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the oriental mole cricket, *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Gene*, 353: 155-168.

- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kirejtshuk A.G., 1978. New species of the genus *Meligethes* Stephens (Coleoptera, Nitidulidae) from the USSR and review of the group of the species related to *Meligethes umbrosus* Sturm. *Entomologisches Obozrenie*, 57 (3): 578-595.
- Kirejtshuk A.G., 1987. New taxa of Nitidulidae (Coleoptera) from the East Hemisphere (part 1). *Omosita nearctica* sp.n., vicariant with the palaeartic *O. colon* (L.). *Trudy Zoologicheskogo Instituta, Akademia Nauka, Saint Petersburg*, 164: 63-94.
- Kirejtshuk A.G., 1997. New palearctic nitidulid beetles, with notes on synonymy position of some species (Coleoptera, Nitidulidae). *Zoosystematica Rossica*, 6 (1/2): 255-268.
- Kluge A.G. & Farris J.S., 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology*, 18: 1-32.
- Knowles L.L., 2004. The burgeoning field of statistical phylogeography. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 1-10.
- Kraatz G., 1858. Beitrag zur Käferfauna Griechenlands. Drittes Stück. *Berliner Entomologische Zeitschrift*, 2: 123-148.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. & Nei M., 2001. MEGA2: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Lawrence J., 1982. Coleoptera. pp. 482-553. In: Parker P.S. (ed.), *Synopsis and Classification of Living Organisms*. McGraw, New York XVII.
- Lessinger A.C., Martins Junqueira A.C., Lemos T.A., Kemper E.L., Da Silva F.R., Vettore A.L., Arruda P. & Azeredo Espin A.M.L., 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Molecular Biology* 9: 521-529.
- Lewis D.L., Farr C.L., Farquhar A.L. & Kaguni L.S., 1994. Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 523-538.
- Lewis D.L., Farr C.L. & Kaguni L.S., 1995. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. *Insect Molecular Biology*, 4: 263-278.
- Lewis P.O., 2001. Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends in Ecology and Evolution*, 16 (1): 30-37.
- Lewis S.M., Chen S., Strathern J.N. & Rattray A.J., 2005. New approaches to the analysis of palindromic sequences from the human genome: evolution and polymorphism of an intronic site at the NF1 locus. *Nucleic Acids Research*, 33(22), e186.
- Löytynoja A. & Milinkovitch M.C., 2001. SOAP, cleaning multiple alignments from unstable blocks. *Bioinformatics*, 17:573-574.

- Macaulay V., Richards M. & Sykes B., 1999. Mitochondrial DNA recombination - no need to panic. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 266: 2037-2039.
- Maddison W.P. & Knowles L.L., 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 55 (1): 21-30.
- Mardulyn P., 2001. Phylogeography of the Vosges mountains populations of *Gonioctena pallida* (Coleoptera: Chrysomelidae): a nested clade analysis of mitochondrial DNA haplotypes. *Molecular Ecology*, 10: 1751-1763.
- Mardulyn P., Termonia A. & Milinkovitch M.C., 2003. Structure and evolution of the mitochondrial Control Region of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae): a hierarchical analysis of nucleotide sequence variation. *Journal of Molecular Evolution*, 56: 38-45.
- Mardulyn P. & Milinkovitch M.C., 2005. Inferring contemporary levels of gene flow and demographic history in a local population of the leaf beetle *Gonioctena olivacea* from mitochondrial DNA sequence variation. *Molecular Ecology*, 14: 1641-1653.
- Masta S.E., Sullivan B., Lamb T. & Routman E.J., 2002. Phylogeography, species boundaries, and hybridization among toads of the *Bufo americanus* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 302-314.
- Mau B. & Newton M., 1997. Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 6: 122-131.
- Mau B., Newton M. & Larget B., 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, 55: 1-12.
- Maxam A.M. & Gilbert W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 560-564.
- McCracken K.G. & Sorenson M.D., 2005. Is homoplasy or lineage sorting the source of incongruent mtDNA and nuclear gene trees in the stiff-tailed ducks (Nomonyx-Oxyura)? *Systematic Biology*, 54 (1): 35-55.
- McKechnie S.W., Hoffmann A.A., Kovacs I.V., Cacoyianni Z., Naughton N.E. & Katsabanas S., 1993a. Genetic variation among Australian populations of native budworm *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). In: *Pest control and sustainable agriculture*. Corey S.A., Dall D.J., Milne W.M. eds CSIRO, Melbourne, pp. 428-431.
- McKechnie S.W., Spackman M.E., Naughton N.E., Kovacs I.V., Ghosn M. & Hoffmann A.A., 1993b. Assessing budworm population structure in Australia using the AT-rich region of mitochondrial DNA. *Beltwide Cotton Conference Proceedings*, 2: 838-839.
- McMillan W.O. & Palumbi S.R., 1997. Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae). *Journal of Molecular Evolution*, 45(5): 473-484.



- Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H. & Teller E., 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21: 1087-1091.
- Meyer C.P. & Paulay G., 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3 (12): 2229-2238.
- Mitchell, S.E., Cockburn, A.F. & Seawright J.A., 1993. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and gene organization. *Genome*, 36: 1058-1073.
- Mitchison G. & Durbin R., 1995. Tree-based maximum likelihood matrices and hidden Markov models. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 1139-1151.
- Mitter C., Farrell B.D. & Futuyma D.J., 1991. Phylogenetic studies of insect-plant interactions: insights into the genesis of diversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 290-293.
- Monforte A., Barrio E. & Latorre A., 1993. Characterization of the length polymorphism in the A+T-rich region of the *Drosophila obscura* group species. *Journal of Molecular Evolution*, 36: 214-223.
- Monnerot M., Solignac M. & Wolstenholme D.R., 1990. Discrepancy in divergence of the mitochondrial and nuclear genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*. *Journal of Molecular Evolution*, 30: 500-508.
- Moran P. & Kornfield I., 1995. Retention of an ancestral polymorphism in the Mbuna species flock (Teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 1015-1029.
- Moritz C., Dowling T. E. & Brown W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.
- Morrison D.A., 2005. Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. *International Journal for Parasitology*, 35: 567-582.
- Mullis K.B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G.T. & Erlich H.A., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 51: 263-273.
- Nakhleh L., Ruths D. & Innan H., 2005. *Gene trees, species trees, and species networks*. In R. Guerra & R. Alison eds *Meta-analysis and combining information in genetics*.
- Nardi F., Carapelli A., Fanciulli P.P., Dallai R. & Frati F., 2001. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (7): 1293-1304.
- Needelman S.B. & Wunsch C.D., 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453.
- Nei M., 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annual Review of Genetics*, 30: 371-403.

- Nei M. & Kumar S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333 pp.
- Neigel J.E. & Avise J.C., 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. Pp. 515-534 in Karlin S. & Nevo E. eds. *Evolutionary process and theory*. Academic, New York.
- Nyman T., 2002. The willow bud galler *Euura mucronata* Hartig (Hymenoptera: Tenthredinidae): one polyphage or many monophages? *Heredity*, 88: 288-295.
- Odorico D.M. & Miller D.J., 1997. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among 5 species of *Acropora* (Cnidaria: Scleratina): patterns of variation consistent with reticulate evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 465-473.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Page R.D.M. & Holmes E.C., 1998. *Molecular evolution - A phylogenetic approach*. Blackwell Science, USA, 346 pp.
- Pamilo P. & Nei M., 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 568-583.
- Pestano J., Brown, R.P., Suárez N.M. & Baéz M., 2003. Diversification of sympatric *Sapromyza* (Diptera: Lauxaniidae) from Madeira: six morphological species but only four mtDNA lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27: 422-428.
- Phillips A., Janies D. & Wheeler W., 2000. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16 (3): 317-330.
- Posada D. & Crandall K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Posada D. & Crandall K.A., 2001a. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*, 50 (4): 580-601.
- Posada D. & Crandall K.A., 2001b. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16 (1): 37-45.
- Powell J. R., 1997. Molecular evolution. In : *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: the Drosophila Model*, Oxford University Press, New York Oxford, 562 pp.
- Pride D.T., 2000. SWAAP Version 1.0.0 - Sliding windows alignment analysis program: a tool for analyzing patterns of substitutions and similarity in multiple alignments. Distributed by the author.
- Quicke D.L.J., 1993. *Principles and techniques of contemporary taxonomy*. Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, London, 311 pp.

- Rand D.M., 1993. Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *Journal of Molecular Evolution*, 37: 281-295.
- Rannala B. & Yang Z., 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 304-311.
- Ratray A., 2004. A method for cloning and sequencing long palindromic DNA junctions. *Nucleic Acids Research*, 32(19), e155.
- Redenbach Z. & Taylor E.B., 2002. Evidence for historical introgression along a contact zone between two species of char (Pisces: Salmonidae) in northwestern North America. *Evolution*, 56: 1021-1035.
- Rees D.J., Emerson B.C., Oromì P. & Hewitt G.M., 2001. Mitochondrial DNA, ecology and morphology: interpreting the phylogeography of the *Nesotes* (Coleoptera: Tenebrionidae) of Gran Canaria (Canary Islands). *Molecular Ecology*, 10: 427-434.
- Reitter E., 1871. Revision der europäischen *Meligethes*-Arten. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn*, 9: 39-169.
- Reitter E., 1877. Beiträge zur Käferfauna von Japan (Drittes Stück). *Deutsche entomologische Zeitschrift*, 21 (1): 175-176.
- Reitter E., 1900. Beitrag zur Coleopteren-Fauna des russischen Reiches. *Deutsche entomologische Zeitschrift*, 44 (1): 49-59.
- Renfu S., Nick J.H., Campbell H. & Barker S.C., 2001. Numerous gene rearrangements in the mitochondrial genome of the wallaby louse, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera). *Molecular Biology and Evolution*, 18: 858-865.
- Richmond J.Q. & Reeder T.W., 2002. Evidence for parallel ecological speciation in scincid lizards of the *Eumeces skiltonianus* species group (Squamata: Scincidae). *Evolution*, 56: 1498-1513.
- Roehrdanz R.L., Degrugillier M.E. & Black IV W.C., 2002. Novel rearrangements of arthropod mitochondrial DNA detected with Long-PCR: applications to arthropod phylogeny and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 19(6): 841-849.
- Rokas A., Atkinson R.J., Webster L.M.I., Csóka G. & Stone G.N., 2003a. Out of Anatolia: longitudinal gradients in genetic diversity support an eastern origin for a circum-Mediterranean oak gallwasp *Andricus quercustozae*. *Molecular Ecology*, 12: 2153-2174.
- Rokas A., Melika G., Abe Y., Nieves-Aldrey J.-L., Cook J.M. & Stone G.N., 2003b. Lifecycle closure, lineage sorting, and hybridization revealed in a phylogenetic analysis of European oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) using mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 36-45.
- Rosenberg N.A & Nordborg M., 2002. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 3: 380-390.
- Rozas J. & Rozas R., 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174-175.

- Rüber L., Meyer A., Sturmbauer C. & Verheyen E., 2001. Population structure in two sympatric species of the Lake Tanganyika cichlid tribe Eretmodini: evidence for introgression. *Molecular Ecology*, 10: 1207-1225.
- Rzhetsky A. & Nei M., 1993. Theoretical foundation of the minimum-evolution method for phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 1073-1095.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. & Arnheim N., 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- Saito S., Tamura K. & Aotsuka T., 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, 171: 1695-1705.
- Saitou N. & Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sambrook J. & Russell D., 2000. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 999 pp.
- Shadel G.S. & Clayton D.A., 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry*, 66: 409-435.
- Shao R. & Barker S.C., 2003. The highly rearranged mitochondrial genome of the plague thrips, *Thrips imaginis* (Insecta: Thysanoptera): convergence of two novel gene boundaries and an extraordinary arrangement of rRNA genes. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 362-370.
- Shao R., Downton M., Murrell A. & Barker S.C., 2003. Rates of gene rearrangement and nucleotide substitution are correlated in the mitochondrial genomes of insects. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 1612-1619.
- Schilsky J., 1894. Käfer Europas Nach der Natur beschrieben. In Küster, H.C. & Kraatz, G.: *Käfer Europas*, 30: 1-8.
- Schluter D., 2000. *The ecology of adaptative radiation*. Oxford University Press, Oxford.
- Schluter D. & Nagel L.M., 1995. Parallel speciation by natural selection. *American Naturalist*, 146: 292-301.
- Schultheis A.S., Weigt L.A. & Hendricks, A.C., 2002a. Arrangement and structural conservation of the mitochondrial control region of two species of plecoptera: utility of tandem repeat-containing regions in studies of population genetics and evolutionary history. *Insect Molecular Biology*, 11(6): 605-610.
- Schultheis A.S., Weigt L.A. & Hendricks, A.C., 2002b. Gene flow, dispersal, and nested clade analysis among populations of the stonefly *Petropberla tarteri* in the southern Appalachians. *Molecular Ecology*, 11: 317-327.

- Siebert D.J., 1992. Tree statistics; trees and “confidence”, consensus trees; alternatives to parsimony; character weighting; character conflict and its resolution. *In Cladistics: a practical course in systematics*. Oxford University Press. New York.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. & Flook P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 1-51.
- Smith T.F., Waterman M.S. & Fitch W.M., 1981. Comparative biosequence metrics. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 38-46.
- Solignac M., Monnerot M. & Mounolou J.-C., 1986. Concerted evolution of a sequence repeats in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 24: 53-60.
- Sota T., Ishikawa, R., Ujie M., Kusumoto F. & Vogler A.P., 2001. Extensive trans-species mitochondrial polymorphisms in the carabid beetles *Carabus* subgenus *Ohomopterus* caused by repeated introgressive hybridisation. *Molecular Ecology*, 10: 2833–2847.
- Spanos L., Koutoumbas G., Kosyfakis M. & Louis C., 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruitfly, *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 9: 139-144.
- Spornraft K., 1967. Familie: Nitidulidae (50), *In: Freude/Harde/Lohse: Die Käfer Mitteleuropas*. Goecke & Everts, Krefeld, 7: 20-77.
- Spornraft K., 1987. Zwei für Mitteleuropa neue Nitiduliden (Coleoptera, Nitidulidae). *Nachrichtenblatt der Bayerischen Entomologen*, 36 (3): 73-75.
- Spornraft K., 1992. Nitidulidae, Kateretidae. *In: Lohse G.A. & Lucht, W.H., Die Käfer Mitteleuropas*, 2, Supplement band mit katalogteil. Goecke & Everts, Krefeld, 13: 90-111.
- Stephens J.F., 1830. *Illustrations of British Entomology*. Mandibulata, London, 3, 374 pp.
- Stewart J.B. & Beckenbach A.T., 2003. Phylogenetic and genomic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the spotted asparagus beetle *Crioceris duodecimpunctata*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 513-526.
- Sturm J., 1845. *Deutschlands Insecten*. XVI. Band., Käfer, Nürnberg, 114 pp.
- Swofford D.L., 2002. *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford D.L. & Berlocher S.H., 1987. Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Systematic Zoology*, 36 (3): 293-325.
- Taanman, J.-W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1410: 103-123.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G. & Cosson J.F., 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.

- Tautz D., Actander P., Minelli A., Thomas R.H. & Vogler A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 70-74.
- Taylor M.F.J., McKechnie, S.W., Pierce N. & Kreitman M., 1993. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10(6): 1259-1272.
- Templeton A.R., Crandall K.A. & Sing C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Tsujino F., Kosemura A., Inhoira K., Hara T., Otsuka Y.F., Obara M.K. & Matsuura E.T., 2002. Evolution of the A+T-rich region of mitochondrial DNA in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 55: 573-583.
- Vandewoestijne S., Baguette M., Brakefield P.M. & Saccheri I.J., 2004. Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 630-646.
- Vila M. & Björklund M., 2004. The utility of the neglected control region for evolutionary studies in Lepidoptera (Insecta). *Journal of Molecular Evolution*, 58: 280-290.
- Williams S.T. & Knowlton N., 2001. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (8): 1484-1493.
- Yang Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 306-314.
- Yang Z., 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 367-372.
- Yang Z. & Rannala B., 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 717-724.
- Yukuhiro K., Sezutsu H., Itoh M., Shimizu K. & Banno Y., 2002. Significant levels of sequence divergence and gene rearrangements have occurred between the mitochondrial genomes of the mulberry silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1385-1389.
- Zhang D.X., Szymura J.M. & Hewitt G.M., 1995. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 40: 382-391.
- Zhang D.X. & Hewitt G.M., 1996a. The use of DNA markers in population genetics and ecological studies of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). In: *The ecology of agricultural pests: biochemical approaches* (Symondson, W.O. & Liddell J.E. eds). pp. 213-220. Chapman & Hall, Londra.

- Zhang D.X. & Hewitt G.M., 1996b. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*, 11 (6): 247-251.
- Zhang D.X. & Hewitt G.M., 1997. Insect mitochondrial Control Region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical systematics and evolution*, 25 (2): 99-120.
- Zhang D.X., Szymura J.M. & Hewitt G.M., 1995. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 40: 382-391.
- Zink R.M. & Blackwell-Rago R.C., 2000. Species limits and recent population history in the curve-billed trasher. *Condor*, 102: 881-886.
- Zink R.M. & McKittrick M.C., 1995. The debate over species concepts and its implications for ornithology. *Auk*, 112: 701-719.









```

*      1860      *      1880      *      1900      *      1920      *      1940      *
TH3.3 ATATTTGAAATGCGGTTTTGTAGGGTTTACCTAGCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATGCTTAGCTTGTCTATTA
TH5.2 ATATTTGAAATGCGGTTTTGTAGGGTTTACTTAGCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTAATTTCTTACTTTTTAGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTAGCTTGTCTATTA
TH5.3 ATATTTGAAATGCGGTTTTGTAGGGTTTACTTAGCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTAATTTCTTACTTTTTAGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTAGCTTGTCTATTA
TH8.1 ATATTTGAAATGCGGTTTTTGTAGGGTTATTTAGCCTTTGTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGATTTCTATGCTTAGCTTGTCTGATTA
TH13.3 ATATTTGAAATGCGGTTTTTGTAGGGTTATTTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTGTTTTATTTACAGGATTTCTATGCTTAGCTTGTCTGATTA
TH14.1 ATATTTGAAATGCGGTTTTGTAGGGTTATTTAGCCTTTGTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTCTATTTTAGTTTTCTATGCTTAGCCTGTTGATTA
TH15.1 ATATTTGAAATGCGGTTTTGTAGGGTTATTTAGCCTTTGTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTCTATTTTAGTTTTCTATGCTTAGCCTGTTGATTA
TH18.5 ATATTTGAAATGCGGTTTTGTAGGGTTATTTAGCCTTTGTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTCTATTTTAGTTTTCTATGCTTAGCCTGTTGATTA

1960      *      1980      *      2000      *      2020      *      2040      *      2060      *
TH3.3 AGCTTCAAGCAATTCATGTTTTAGTTTTGTTAGCTTTTTCAATATTTAACTTACTTGGATTGGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTATCCTTTGCTATTGCTAGTCCAATCTAAT
TH5.2 AGCTTCAAGCAATTCATGTTTTAGTTTTGTTAGCTTTTTCAATATTTAACTTACTTGGATTGGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTATCCTTTGCTATTGCTAGTCCAATCTAAT
TH5.3 AGCTTCAAGCAATTCATGTTTTAGTTTTGTTAGCTTTTTCAATATTTAACTTACTTGGATTGGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTATCCTTTGCTATTGCTAGTCCAATCTAAT
TH8.1 AATTTCAACCAATTCATGTTTTAGTTTTGATTAGCTTTTTCAATTTTTAACTTACTTGAAGTTTGAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAAT
TH13.3 GGCTTCAACCAATTCATGTTTTAGTTTTGATTAGCTTTTTCAATTTTTAACTTACTTGAAGTTTGAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAAT
TH14.1 AGCTTCAATCAATTCATGTTTTAGTTTTAATTAGGCTTTTCCAATTTTTAACTTACTTGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAAT
TH15.1 AGCTTCAATCAATTCATGTTTTAGTTTTAATTAGGCTTTTCCAATTTTTAACTTACTTGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAAT
TH18.5 AGCTTCAATCAATTCACGTTTTAGTTTTAATTAGGCTTTTCCAATTTTTAACTTACTTGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAAT

2080      *      2100      *      2120      *      2140      *      2160      *      2180
TH3.3 TTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTCTATTAAGCTCCAACCAATTCATGTTTTAGTTTTGTTTTAGCTTTTTCCAATGTTTTAACTTACCTG
TH5.2 TTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATTCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTT
TH5.3 TTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATTCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTT
TH8.1 TTCTTACTTTTTCATTTTTATTTACAGGATTTCTATGCTTTAGCCTTTGCTAGTCCAACCAATTCATGTTTTAGTTTTAGTTTGAAGCTTTTTCAATGTTTTAACTTACCTG
TH13.3 TTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGATTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAACCAATTCATGTTTTAGTTTTAGTTTGAAGCTTTTTCAATGTTTTAACTTACCTG
TH14.1 TTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTT
TH15.1 TTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATTCATGTTTTAGTTTTAGTTTGAAGCTTTTTCAATGTTTTAACTTACCTG
TH18.5 TTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATTCATGTTTTAGTTTTAGTTTGAAGCTTTTTCAATGTTTTAACTTACCTG

*      2200      *      2220      *      2240      *      2260      *      2280      *      2300
TH3.3 GACTTTGAAGTTTGGTAAGTTTTACTTAGTTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTAAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH5.2 GACTCTGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTATCCTTTGCTATTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH5.3 GACTCTGAAGTTTGGTAAGTTTTACCTATCCTTTGCTATTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH8.1 AATCTTACTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGATTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH13.3 AACTCTGAGTCTGGTAAGTTTTACTTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGATTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH14.1 AACTCTGAGTCTGGTAAGTTTTACTTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH15.1 AACTCTGAGTCTGGTAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH18.5 AACTCTGAGTCTGGTAAGTTTTACTTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTCTATGCTTTAGCTTTGTTGCTAGTCCAATCTAATTT

*      2320      *      2340      *      2360      *      2380      *      2400      *
TH3.3 CAATCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTCCAGTACTGAGTGGTAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTATTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH5.2 CAATCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTT
TH5.3 CAACCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTT
TH8.1 CAACCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTT
TH13.3 CAACCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTT
TH14.1 CAGCCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCCAGTACTGAGTGGTAAGTTTTACCTAGCCTTTGCTATTGCTAGTCCAATCTAATTT
TH15.1 CAATCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTT
TH18.5 CAGCCAATTTCAATGTTTTAGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTTCAATGTTTTAGCTTTTT

2420      *      2440      *
TH3.3 CTAACCTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATGCTTTAGCTTT
TH5.2 CTTACTTTTTCGTTTTATTTAGGGTTTTATGCTTTAGCTTT
TH5.3 CTAACCTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATGCTTTAGCTTT
TH8.1 CTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATGCTTTAGCTTT
TH13.3 CTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATGCTTTAGCTTT
TH14.1 CTTACTTTTTCGTTTTATTTAGGTTTTTATGCTTTAGCTTT
TH15.1 CTTACTTTTTCGTTTTATTTACAGGTTTTTATGCTTTAGCTTT
TH18.5 CTTACTTTTTCGTTTTATTTAGGTTTTTATGCTTTAGCTTT

```

# APPENDICE I B - Sequenze nucleotidiche – REGIONE DI CONTROLLO “porzione SR”

|        |  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|--------|--|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|
|        | *  | 20  | * | 40  | * | 60  | * | 80  | * | 100 | * |     |   |
| TH3.2  | ATGGTTTTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTTTGAAAGTTTGGTAAGTTTT                             |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | AGGGTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGCTTTTGGTTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTAGTAGTTTGGTAAGTTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | AGGTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGCTTTTGGTTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTAGTAGTTTGGTAAGTTTT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | AGGATTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTTATTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTACCTGAACCTCTAGTAGTCTGGTAAGTTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | AGGATTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTTATTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTAGTAGTTTGGTAAGTTTT |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | AGGTTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGCTTTTGGTTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTAGTAGTTTGGTAAGTTTT                |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | AGGTTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGCTTTTGGTTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTAGTAGTTTGGTAAGTTTT                |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | AGGTTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGCTTTTGGTTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTAGTAGTTTGGTAAGTTTT                |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|        |  | 120 | * | 140 | * | 160 | * | 180 | * | 200 | * | 220 | * |
| TH3.2  | ACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | ACCTAGTTTTTGTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGCTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | ACCTAGTTTTTGTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGCTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | ACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | ACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAATCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTCTATGTTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | ACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGACCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | ACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGACCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | ACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGACCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGTTT                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|        |  | 240 | * | 260 | * | 280 | * | 300 | * | 320 | * | 340 | * |
| TH3.2  | GATTAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTTTAGACTTTGAAAGTTTGGTAAGTTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | GATTAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTTTAGACTTTGAAAGTTTGGTAAGTTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | GATTAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTTTAGACTTTGAAAGTTTGGTAAGTTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | GATTAAAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTATCTGAACCTCTAGTAGTCTGGTAAGTTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAATCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG            |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | GATTAAAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTATCTGAACCTCTAGTAGTCTGGTAAGTTTTTACCTAGCCTTTGCTGTTGCTAATCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG            |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | GATTAGTTTTTCCAATGTTTTAACTTTATTTGGACTCTGGAAAGTTTGGTAAGTTTTTACCTATCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTGATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG              |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | GATTAGTTTTTCCAATGTTTTAACTTTATTTGGACTCTGGAAAGTTTGGTAAGTTTTTACCTATCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTGATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG              |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | GATTAGTTTTTCCAATGTTTTAACTTTATTTGGACTCTGGAAAGTTTGGTAAGTTTTTACCTATCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTGATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACCCAG              |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|        |  | 360 | * | 380 | * | 400 | * | 420 | * | 440 | * | 460 | * |
| TH3.2  | GGGTTTTATGTTTTAACTTTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTT            |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | GGGTTTTATGTTTTAACTTTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTT            |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | GGGTTTTATGTTTTAACTTTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTT            |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | GATTTCTATGCTTTAGCTTTTTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTTATTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTGTAGTTTGGTAAGTTTACCT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | GATTTCTATGCTTTAGCTTTTTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTTATTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTGTAGTTTGGTAAGTTTACCT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | GATTTCTATGCTTTAGCTTTTTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTTATTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTGTAGTTTGGTAAGTTTACCT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | GATTTCTATGCTTTAGCTTTTTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTTATTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTGTAGTTTGGTAAGTTTACCT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | GATTTCTATGCTTTAGCTTTTTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTTATTAGCTTTTCCAAATGTTTTAACTTTTCTAGACTCTGTAGTTTGGTAAGTTTACCT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|        |  | 480 | * | 500 | * | 520 | * | 540 | * | 560 | * | 580 | * |
| TH3.2  | AGTTTTTGTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTT                       |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | AGTTTTTGTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTT                       |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | AGTTTTTGTGTTGCTAGCTCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGCTTTTATGCTTTAGCTTGTTCATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGCTTT                       |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | AGTCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTT                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | AGTCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAACCAATTTTCATGTTTTAGTTT                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | ATCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGTTT                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | ATCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGTTT                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | ATCCTTTGTTGTTGCTAGCCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACAGGATTTTCTATGCTTTAGCTTGTTCGATTAAGCTCCAATCAATTTTCATGTTTTAGTTT                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|        |  | 600 | * | 620 | * | 640 | * | 660 | * | 680 | * | 700 | * |
| TH3.2  | TTAGCTTTTCCAATGTTTTAGCTTTTCTAGACTTAGTAGTTTGGTAATTTTTATTAGCCTTTGCTGTTGCCATTTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACATGGGT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | TTAGCTTTTCCAATGTTTTAGCTTTTCTAGACTTAGTAGTTTGGTAATTTTTATTAGCCTTTGCTGTTGCCATTTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACATGGGT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | TTAGCTTTTCCAATGTTTTAGCTTTTCTAGACTTAGTAGTTTGGTAATTTTTATTAGCCTTTGCTGTTGCCATTTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACATGGGT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | TAAGCTTTTTCAATGTTTTAACTTTACCTGAACCTAGCAGTCTGGTAAGTTTTTATAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTATAGGGT                   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | TAAGCTTTTTCAATGTTTTAACTTTACCTGAACCTAGCAGTCTGGTAAGTTTTTATAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTATAGGGT                   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | TTAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTACCTGAACCTAGCAGTCTGGTAAGTTTTTATAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACATGGGT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | TTAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTACCTGAACCTAGCAGTCTGGTAAGTTTTTATAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACATGGGT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | TTAGCTTTTCCAATGTTTTAACTTTACCTGAACCTAGCAGTCTGGTAAGTTTTTATAGCCTTTGCTGTTGCTAGTCCAATCTAATTTCTTACTTTTTTCGTTTTATTACATGGGT                  |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|        |  | 720 | * | 740 | * | 760 | * | 780 | * | 800 | * | 820 | * |
| TH3.2  | TTTATTTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | TTTATTTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | TTTATTTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | TTTATTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | TTTATTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | TTTATTTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | TTTATTTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | TTTATTTTAGTTTTTATTAAGATTTTACCAATTTTCATAGGTTTCGATTAATTTTACTTTTTCTAATATTTTAACTTTATCTAGACTTTATATTTATGAATTTATTTAATTTA                    |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
|        |  | 840 | * | 860 | * | 880 | * | 900 | * | 920 | * | 940 | * |
| TH3.2  | TTATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAATTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.2  | TTATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAATTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH5.3  | TTATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAATTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH8.1  | ATATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAAGTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH13.3 | ATATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAAGTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH14.1 | ATATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAAGTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH15.1 | ATATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAAGTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |
| TH18.5 | ATATTAATTTTAGGTAATTTATTTTTTAGTGTTTTTAAATTTAAGTATAAATGCAACTATTCATTTTGATTATTTAAGTTGATTTATCAAAAATGCTAAGTTTTTAGTTAAT                     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |

TH3.3 \* 940 \* 960 \* 980 \* 1000 \* 1020 \*  
TH5.2 TATTGGTTTTATTGTTTTATTCTTTTCTTGTAAATTTAGGTTTTAAGAACATGGATTTAAATCTTTTTATTAATAAAGTAGATAAAATTTAAAAATTTCTCTAAGTTT  
TH5.3 TATTGGTTTTATTGTTTTATTCTTTTCTTGTAAATTTAGGTTTTAAGAACATGGATTTAAATCTTTTTATTAATAAAGTAGATAAAATTTAAAAATTTCTCTAAGTTT  
TH8.1 TATTGGTTTTATTGTTTTATTCTTTTCTTGTAAATTTAGGTTTTAAGAACATGGATTTAAATCTTTTTATTAATAAAGTAGATAAAATTTAAAAATTTCTCTAAGTTT  
TH13.3 TATTGGTTTTATTGTTTTATTCTTTTCTTGTAAATTTAGGTTTTAAGAACATGGATTTAAATCTTTTTATTAATAAAGTAGATAAAATTTAAAAATTTCTCTAAGTTT  
TH14.1 TATTGGTTTTATTGTTTTATTCTTTTCTTGTAAATTTAGGTTTTAAGAACATGGATTTAAATCTTTTTATTAATAAAGTAGATAAAATTTAAAAATTTCTCTAAGTTT  
TH18.5 TATTGGTTTTATTGTTTTATTCTTTTCTTGTAAATTTAGGTTTTAAGAACATGGATTTAAATCTTTTTATTAATAAAGTAGATAAAATTTAAAAATTTCTCTAAGTTT

TH3.3 1040 \* 1060 \* 1080 \* 1100 \* 1120 \* 1140 \*  
TH5.2 TGTTGTTTTATTCAAAAAGATTCAATTTTCTGCCTTTTTTATTTTTTATTATTAGTTTTTCTAGATAAAAAAAGGATTCGTAATCTGTTATATTTACCGGTTAAAG  
TH5.3 TGTTGTTTTATTCAAAAAGATTCAATTTTCTGCCTTTTTTATTTTTTATTATTAGTTTTTCTAGATAAAAAAAGGATTCGTAATCTGTTATATTTACCGGTTAAAG  
TH8.1 TGTTGTTTTATTCAAAAAGATTCAATTTTCTGCCTTTTTTATTTTTTATTATTAGTTTTTCTAGATAAAAAAAGGATTCGTAATCTGTTATATTTAGTCAGTTAAAG  
TH13.3 TGTTGTTTTATTCAAAAAGATTCAATTTTCTGCCTTTTTTATTTTTTATTATTAGTTTTTCTAGATAAAAAAAGGATTCGTAATCTGTTATATTTAGTCAGTTAAAG  
TH14.1 TGTTGTTTTATTCAAAAAGATTCAATTTTCTGCCTTTTTTATTTTTTATTATTAGTTTTTCTAGATAAAAAAAGGATTCGTAATCTGTTATATTTAGTCAGTTAAAG  
TH18.5 TGTTGTTTTATTCAAAAAGATTCAATTTTCTGCCTTTTTTATTTTTTATTATTAGTTTTTCTAGATAAAAAAAGGATTCGTAATCTGTTATATTTAGTCAGTTAAAG

TH3.3 1160 \* 1180 \* 1200 \* 1220 \* 1240 \* 1260 \*  
TH5.2 TAGTATAAAAATAAATAATAGGCATTTAGGCTCAAAAATTTATTTTTGTCTTTTAAAAAAGGGGTCATTATTTAAATCTAGTTAAAAATCTCAATCTTTTTTAAAAAA  
TH5.3 TAGTATAAAAATAAATAATAGGCATTTAGGCTCAAAAATTTATTTTTGTCTTTTAAAAAAGGGGTCATTATTTAAATCTAGTTAAAAATCTCAATCTTTTTTAAAAAA  
TH8.1 CAGTATAAAAAATAAATAATAGGCATTTAGGCTCAAAAATTTATTTTTGTCTTTTAAAAAAGGGGTCATTATTTAAATCTAGTTAAAAATCTCAATCTTTTTTAAAAAA  
TH13.3 CAGTATAAAAAATAAATAATAGGCATTTAGGCTCAAAAATTTATTTTTGTCTTTTAAAAAAGGGGTCATTATTTAAATCTAGTTAAAAATCTCAATCTTTTTTAAAAAA  
TH14.1 TAGTATAAAAAATAAATAATAGGCATTTAGGCTCAAAAATTTATTTTTGTCTTTTAAAAAAGGGGTCATTATTTAAATCTAGTTAAAAATCTCAATCTTTTTTAAAAAA  
TH18.5 TAGTATAAAAAATAAATAATAGGCATTTAGGCTCAAAAATTTATTTTTGTCTTTTAAAAAAGGGGTCATTATTTAAATCTAGTTAAAAATCTCAATCTTTTTTAAAAAA

TH3.3 \* 1280 \* 1300 \* 1320 \* 1340 \* 1360 \* 1380 \*  
TH5.2 ACTAAAAAAGGGGTCAAATTTGTTATGTCAAAAAATCACTAACTTCAAAAATTTGCAAAAATGTTGATTGAAATAGTGGGTAAGGCCCTTTTTGTCATTTTTTTTACTTT  
TH5.3 ACTAAAAAAGGGGTCAAATTTGTTATGTCAAAAAATCACTAACTTCAAAAATTTGCAAAAATGTTGATTGAAATAGTGGGTAAGGCCCTTTTTGTCATTTTTTTTACTTT  
TH8.1 AATAAAAAAAGGGGTCAAATTTGTTATGTCAAAAAATCACTAACTTCAAAAATTTGCAAAAATGTTGATTGAAATAGTGGGTAAGGCCCTTTTTGTCATTTTTTTTACTTT  
TH13.3 AATAAAAAAAGGGGTCAAATTTGTTATGTCAAAAAATCACTAACTTCAAAAATTTGCAAAAATGTTGATTGAAATAGTGGGTAAGGCCCTTTTTGTCATTTTTTTTACTTT  
TH14.1 AATAAAAAAAGGGGTCAAATTTGTTATGTCAAAAAATCACTAACTTCAAAAATTTGCAAAAATGTTGATTGAAATAGTGGGTAAGGCCCTTTTTGTCATTTTTTTTACTTT  
TH18.5 AATAAAAAAAGGGGTCAAATTTGTTATGTCAAAAAATCACTAACTTCAAAAATTTGCAAAAATGTTGATTGAAATAGTGGGTAAGGCCCTTTTTGTCATTTTTTTTACTTT

TH3.3 \* 1400 \* 1420 \* 1440 \* 1460 \* 1480 \*  
TH5.2 TTTTAAAAAGGGTCATTTTTCAAAAAGCTAGTAAATCGAATCATTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH5.3 TTTTAAAAAGGGTCATTTTTCAAAAAGCTAGTAAATCGAATCATTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH8.1 TTTTAAAAAGGGTCATTTTTCAAAAAGCTAGTAAATCGAATCATTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH13.3 TTTTAAAAAGGGTCATTTTTCAAAAAGCTAGTAAATCGAATCATTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH14.1 TTTTAAAAAGGGTCATTTTTCAAAAAGCTAGTAAATCGAATCATTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH18.5 TTTTAAAAAGGGTCATTTTTCAAAAAGCTAGTAAATCGAATCATTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA

TH3.3 1500 \* 1520 \* 1540 \* 1560 \* 1580 \* 1600 \*  
TH5.2 AAAGGCTTAAAAATTTAAAACGTTTTTTTATGATTGTTTTCTATACCTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH5.3 AAAGGCTTAAAAATTTAAAACGTTTTTTTATGATTGTTTTCTATACCTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH8.1 AAAGGCTTAAAAATTTAAAACGTTTTTTATGATTGTTTTCTATACCTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH13.3 AAAGGCTTAAAAATTTAAAACGTTTTTTATGATTGTTTTCTATACCTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH14.1 AAAGGCTTAAAAATTTAAAACGTTTTTTTATGATTGTTTTCTATACCTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH18.5 AAAGGCTTAAAAATTTAAAACGTTTTTTTATGATTGTTTTCTATACCTTTTCAAAAATAAATTTTTTGTGTTTTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA

TH3.3 1620 \* 1640 \* 1660 \* 1680 \* 1700 \* 1720 \*  
TH5.2 CCTAATCCTTTTTTTGTATACGAATTTGAATCCTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH5.3 CCTAATCCTTTTTTTGTATACGAATTTGAATCCTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH8.1 CCTAATCCTTTTTTTGTATACGAATTTGAATCCTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH13.3 CCTAATCCTTTTTTTGTATACGAATTTGAATCCTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH14.1 CCTAATCCTTTTTTTGTATACGAATTTCAATCCTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA  
TH18.5 CCTAATCCTTTTTTTGTATACGAATTTCAATCCTTTTTTCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTGCAAAAATTTCAAAAAA

TH3.3 \* 1740 \* 1760 \* 1780 \* 1800 \* 1820 \* 1840 \*  
TH5.2 TGATTGGTATAGTTAGTACTAGTCATCTAAAACTGAAATAGTATCTTTTTCTAAAAAGATTGTTTTTCTAATAATAAAAAACAACCCATCGCGGAGTTTCATCAATTTT  
TH5.3 TGACTGGTATAGTTAGTACTAGTCATCTAAAACTGAGATTAGGCATTTTTTCTAAAAAGATTGTTTTTCTAATAATAAAAAACAACCCATCGCGGAGTTTCATCAATTTT  
TH8.1 TGACTGGTATAGTTAGTACTAGTCATCTAAAACTGAGATTAGGCATTTTTTCTAAAAAGATTGTTTTTCTAATAATAAAAAACAACCCATCGCGGAGTTTCATCAATTTT  
TH13.3 TGACTGGTATAGTTAGTACTAGTCATCTAAAACTGAAATAGGATTTTTCTTAAAAAGATTGTTTTTCTAATAATAAAAAACAACCCATCGCGGAGTTTCATCAATTTT  
TH14.1 TGACTGGTATAGTTAGTACTAGTCATCTAAAACTGAAATAGGATTTTTCTTAAAAAGATTGTTTTTCTAATAATAAAAAACAACCCATCGCGGAGTTTCATCAATTTT  
TH18.5 TGTTGGTATAGTTAGTACTAGTCATCTAAAACTGAGATTAGGATTTTTCTTAAAAAGATTGTTTTTCTAATAATAAAAAACAACCCATCGCGGAGTTTCATCAATTTT

```

*      1860      *      1880      *      1900      *      1920      *      1940      *
TH3.3 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAAATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC
TH5.2 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAAATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC
TH5.3 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAAATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC
TH8.1 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAAATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC
TH13.3 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAAATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC
TH14.1 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAAATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC
TH15.1 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAAATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC
TH18.5 TCAGTTGATTCGGATTTGTATTCAAAAAAAAAAGATTTTTAAAAATGCATTTTTTGCAAATTTTGGCATTTTAGACATTTTTTAAAAATACCAAGGAATCCTAATCATATCC

```

```

1960      *      1980      *      2000      *      2020      *      2040      *      2060      *
TH3.3 GAAATTTATTTAAACACTGTATTTCTAGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATCTATTTTAAATTTACTTAAAGTGTATATTTTTTTAG
TH5.2 GAAATTTATTTAAACACTGTATTTCTAGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATCTATTTTAAATTTACTTAAAGTGTAAATTTTTTTAG
TH5.3 GAAATTTATTTAAACACTGTATTTCTAGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATCTATTTTAAATTTACTTAAAGTGTAAATTTTTTTAG
TH8.1 AAAATTTATTAGAAACACTGTATTTTTCAGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATTTTGTATAAATATCCTTTAAATGTTATATTTTTTTAG
TH13.3 AAAATTTATTAGAAACACTGTATTTTGGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATTTTGTATAAATATCCTTTAAATGTTATATTTTTTTAG
TH14.1 GAAATTTATTTAAACACTGTATTTTTCAGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATTTTATCTAAATTTTAAAAAGTGTATATTTTTTTAG
TH15.1 GAAATTTATTTAAACACTGTATTTTTCAGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATTTTATCTAAATTTTAAAAAGTGTATATTTTTTTAG
TH18.5 GAAATTTATTTAAACACTGTATTTTTCAGTACTTTTAGTTTAAATATATAATTTAATTAATTTTGTAAAAATTTTATTTTATCTAAATTTTAAAAAGTGTATATTTTTTTAG

```

```

2080      *      2100      *      2120      *      2140      *
TH3.3 TACTGAGTATGCATATATATATGATAGGGTTAGATATTTTAAATTAATTTGTTTTTAAATTAATAAAAAATAAATATG
TH5.2 TACTGAGTATGCATATATATATGATAGGGTTATTTATTTTAAATTAATTTGTTTTTAAATTAATAAAAAATAAATATG
TH5.3 TACTGAGTATGCATATATATATGATAGGGTTATTTATTTTAAATTAATTTGTTTTTAAATTAATAAAAAATAAATATG
TH8.1 TATTAAGTATAAAGATATATATATAGGTTAATTTATTTTAAATTTAATTTATTTTAAATTTAATAAAAAATAAATATG
TH13.3 TATTAAGTATAAAGATATATATATAGGTTAATTTATTTTAAATTTAATTTATTTTAAATTTAATAAAAAATAAATATG
TH14.1 CACTAAGTATATAGATATATCTTATAGGTTAATTTATTTTAAATTTAATTTATTTTAAATTTAAACAAAAATAAATATG
TH15.1 CACTAAGTATATAGATATATCTTATAGGTTAATTTATTTTAAATTTAATTTATTTTAAATTTAAACAAAAATAAATATG
TH18.5 CACTAAGTATATAGATATATCTTATAGGTTGATTATTTTAAATTTAATTTATTTTAAATTTAAACAAAAATAAATATG

```











## APPENDICE I D - Sequenze nucleotidiche – REGIONE DI CONTROLLO (B)

- porzione della zona variabile per (a) *M. cristofaroi*, (b) *M. epeirosi* e (c) *M. fulvipes*

(a)

```

CS1.1      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      1
ATTCATATAAATATACAAATGGAAAAGATGACATGAATTTAGAAGAGATTGGAGAACTAAACAATAATGGCAAAATTTGATGATAGAGAGAACAAGAGATAATTTGTGACCATGAGAT

CS1.1      20      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
ACAAAGCAATAATCAGGGTGGTAGTAATAATCCCTATATAAATGCGAATGAAAAAAGGGGGTTAATTTAGAAAAATAAAAGAACAAGAGATGATAACTATAGTAATAACAACACT

CS1.1      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
AAGCAAGAGCTGAAGAAGTCAAAATCGACAAAAGATGTATGGTCACAACACTTACACTGGCCAATGTTGAGACAAAATGTAGCAGAAGAAAACAACATATATGCCATTTGCAATCA

CS1.1      360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *
CCTCAAAAAAGTGAAGGAATACACAGACGCAATAGCAAAATGAGAAAAAGAAAAAGAAAGATTAAAAATTACACCAAAAAGCCATCAGGGAAAAAGGAAACGGGAAGCAAGTGAAG

CS1.1      480      *      500      *      520      *      540      *      560      *      580      *
GCAAAACGAGAAGGCACAGGTTTTAAGCAAAAAGAAAGCACAACACAGCAAAACAGTAACCTCTGCAAGAAAAAAGTTGTGAGTAGGGAATCTGTTCCGAGGAAAGACTTTAGCGAG

CS1.1      600      *      620      *      640      *      660      *      680      *      700
AGTGAATGGGGCCGAATACAACAATCCACAAGAAATAACTGTAGGAACCTTATGTTATAATAATGTATAATCAAAATATTTCCAGGAATAGTGGAAACTATAGACAATGATGAATA

CS1.1      *      720      *      740      *      760      *      780      *      800      *      820
TGGAGTTCGCGCTATGACTCGATCTGGCCCTAATGCTTTAAATGGCCAGATCGGGTTGACCAATCTGGTATGAAAAGTCTTCAATTATAAAAAAATGAACCACCTAACTTATT

CS1.1      *      840      *      860      *      880      *
AGGCGAGGTTGTTATGAGTGTCTGAAATTTGTAATATTTTTAAAAATATGTTTTGTCTAATATAC
    
```

(b)

```

ES1.1      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      1
TAGATGAAGTAGTTTTGGATGATTATGTAGTAGCTGTTAGGGCTTCGCTGGATCAGAATGANCAAAAACAGAGGAATGTCATTTTTGTGGTCATACTGATTCACCCCACATATCCTA

ES1.1      20      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
GAAACGGTTTTAAGAAATTTTTGATATCTTTTTAGGTCCAGACTTATAGAGCATTGCTCGTTTTCAAATATACACCGTGTCAAAGTTATCTGCTTACCATTGCTAGCTCCGTTATT

ES1.1      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
AAGTTAAATTAGCAATTAATAATGGTGAACAAGAAAACAATGAAACGTCGTTTTCGAAAATATCAAAAAATAACATTTTTTAAATGGGACACCCCTGAATATATTTACATATTTT

ES1.1      360      *      380      *      400      *      420      *      440
TAAAGGCAATTTAATTTAAACAATAAATAATATGTTATAACTACCCTAAGCTTAAAAATAAATAAACAATGAATAATTTTCT
    
```

(c)

```

FL4.1      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
CAAAACAATTCGAAGGAGAAGAAGTTGTTGAAGTGAGTCCAAAATCTTAACATGACTTTCTGTGGTTGTTCTGTGATGACGTCGAGATCGGCTCTGGTTATCATGTAGCACG

FL4.1      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
CATAGCTTATGAAAGTGTTAAAATATCCGACTGCGGCTCAGGAGAGACAAGATGGAATCCCGGAAGAGAAATATCCTGTATTTGGGATAATATCGCAAGCTTTGACCTTTTACG

FL4.1      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
GGGCTATTTTGTGATTGTACAACATAATTGAGTGGATGTTCAAGATTTGAAAATTCACATGCGTGGGGAATGTATTCGTGAGGCGTATGGACGTTACAACCTTGTGCTGGTCA

FL4.1      360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460
AAATGGTACATTTGCTCCGATACCATTAAAGGCGTCAAGCCACCATGGAAGAAGAAGAAGAAGAACGTCACAATCACTATGGTCACAATAACTACTGTGTAGTTACTACACCATATTA

FL4.1      *      480      *      500      *      520      *      540      *
TGGTGACCAACAGCTATCAAAAGTTATCAACACTGTCTCCAATGAATTTCTTTGAAGTCTAATAAAAATTTAAAAAAATGTGAAGAATA
    
```

## APPENDICE II A – Procedure sperimentali – Estrazione del DNA

### Protocollo di lisi

Il campione biologico viene omogenizzato meccanicamente in una provetta (su ghiaccio) mediante l'uso di un pestello automatico. All'omogenato vengono aggiunti 5  $\mu\text{L}$  di proteinasi k in soluzione (20 mg/ml) e 200  $\mu\text{L}$  di tampone (Proteinasi K *buffer*). Il tutto viene incubato a 65°C su un blocco termostato per almeno 3 ore.

Dopo la lisi, il DNA totale è stato estratto dall'omogenato del tessuto utilizzando un protocollo di estrazione standard fenolo/cloroformio : alcool isoamilico 1:24, qui di seguito descritto, o mediante il kit PureGene *Tissue & Cell* Gentra secondo le indicazioni fornite dal produttore.

### Protocollo di estrazione del DNA (fenolo/cloroformio:alcohol isoamilico 1:24)

Viene aggiunto all'omogenato un volume di fenolo equilibrato pari al volume del campione. Si mescola il tutto fino ad ottenere un'emulsione e si centrifuga per 15 secondi a 12.000 rotazioni per minuto (r.p.m.) in una microcentrifuga. Il supernatante viene trasferito in una nuova provetta, e si ripete il ciclo fino ad ottenere la fase acquosa completamente trasparente. Viene quindi aggiunto un volume (1:1) di cloroformio/alcohol isoamilico 1:24 , e si mescola fino ad ottenere un'emulsione. Si centrifuga la nuova miscela per 15 secondi a 12.000 r.p.m. e la fase acquosa viene trasferita in una nuova provetta. La fase acquosa ottenuta viene trasferita in una nuova provetta; a questa viene aggiunto un doppio volume di etanolo 95° e 1/10 di volume di acetato di sodio (NaAc) 3M pH 5.2. Si mescola e si lascia riposare a -20°C per almeno 2 ore. Il DNA viene fatto precipitare mediante centrifugazione a 12.000 r.p.m. per 10 minuti.

Il supernatante viene rimosso, mentre il DNA precipitato (*pellet*) rimane sul fondo della provetta. Viene aggiunto etanolo 70°, si mescola e si ripete la precipitazione centrifugando per 2 minuti a 12.000 r.p.m. L'etanolo viene rimosso e il precipitato di DNA viene fatto asciugare a 35°-37°C su un blocco termostato. Infine il DNA viene sospeso in 50  $\mu\text{L}$  di tampone TE 1X, e conservato a +4°C.

Mediante una corsa su gel d'agarosio si verifica la quantità e la qualità del DNA estratto.

## APPENDICE II B – Procedure sperimentali – Reazione a catena della polimerasi (PCR e LONG PCR)

### Reazione a catena della polimerasi (PCR e LONG PCR)

Tutti i cicli termici per le reazioni di *Long PCR* e di PCR sono stati impostati ed automatizzati su una macchina PCR *Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400*.

Per le reazioni di *Long PCR* è stato utilizzato il kit commerciale prodotto dalla Roche *Expand Long Template PCR System*, mentre per le reazioni di PCR sono stati utilizzati *Taq* polimerasi, Buffer 10X e  $\text{MgCl}_2$  Invitrogen.

Di seguito vengono riportati la composizione della miscela di reazione di **Long PCR** e il ciclo termico utilizzato per l'amplificazione dell'intera Regione di Controllo.

### Miscela di reazione (50 $\mu\text{L}$ ):

- |                                   |      |               |
|-----------------------------------|------|---------------|
| • <i>Acqua sterile distillata</i> | 16.1 | $\mu\text{L}$ |
| • <i>Buffer (3)</i>               | 5.0  | $\mu\text{L}$ |
| • <i>dNTPs</i>                    | 25.0 | $\mu\text{L}$ |

- *Primer + (20 pmoli/μL)* 1.5 μL
- *Primer - (20 pmoli/μL)* 1.5 μL
- *Taq* 0.4 μL
- *DNA stampo* 0.5 μL

**Ciclo termico:**

- *Denaturazione iniziale: 2 minuti a 92° C*
  - *Denaturazione: 10 secondi a 92° C*
  - *Annealing: 30 secondi a 48° C*
  - *Estensione: 4 minuti a 60° C*
- } 10 cicli
- *Denaturazione: 10 secondi a 92° C*
  - *Annealing: 30 secondi a 48° C*
  - *Estensione: 4 minuti (+ 20 sec. x ciclo) a 60° C*
- } 25 cicli
- *Estensione finale: 7 minuti a 60° C*

I prodotti di *Long PCR* vengono infine conservati a -20°C.

Di seguito vengono riportati la composizione della miscela di reazione di **PCR** e il ciclo termico utilizzato per l'amplificazione della porzione di ca. 800 bp. all'interno della "zona variabile" della Regione di Controllo.

**Miscela di reazione (50 μL):**

- *Acqua sterile distillata* a 50 μL
- *Buffer 10X* 5.0 μL
- *MgCl<sub>2</sub>* 1.5 μL
- *dNTPs* 5.0 μL
- *Primer + (20 pmoli/μL)* 2.0 μL
- *Primer - (20 pmoli/μL)* 2.0 μL
- *Taq* 0.25 μL
- *DNA stampo* 0.5 μL

**Ciclo termico:**

- *Denaturazione iniziale: 2 minuti a 92° C*
  - *Denaturazione: 1 minuto a 92° C*
  - *Annealing: 30 secondi a 48° C*
  - *Estensione: 1 minuto a 60° C*
- } 33 cicli
- *Estensione finale: 7 minuti a 60° C*

I prodotti PCR vengono infine conservati a -20°C.

## **Analisi elettroforetica dei prodotti PCR**

Un'aliquota del prodotto PCR, contenente il frammento amplificato, viene miscelata con un colorante pesante (*dye* 6X: 0.25% bromofenolo blu e 40% [w/v] saccarosio in H<sub>2</sub>O) e caricata nel pozzetto di un gel d'agarosio (1.0%). Il gel è immerso in una vaschetta di plexiglas provvista di elettrodi e contenente una soluzione elettrolitica (costituita da Tris Acetato EDTA [TAE buffer 1X]). Mediante l'applicazione di un potenziale di circa 70-120 volts, il frammento di DNA migra nel gel ad una velocità inversamente proporzionale al logaritmo del suo peso molecolare. La migrazione genera una banda la cui posizione rispetto al pozzetto dipende dalla dimensione del frammento: quanto più la banda è distante dal pozzetto, tanto più basso è il peso molecolare del frammento. La dimensione di qualsiasi regione amplificata può essere determinata calibrando il gel, ossia facendo correre simultaneamente in un pozzetto adiacente un marcatore (*ladder*), costituito da una miscela di frammenti di peso molecolare noto. Il *ladder* permette di rilevare la grandezza della regione ottenuta per amplificazione e quindi di determinare se tale regione corrisponde a quella desiderata, almeno in termini di peso molecolare. Le bande di DNA ottenute per elettroforesi vengono visualizzate per mezzo di un trans-illuminatore a raggi ultravioletti (U.V.) per fluorescenza di un agente intercalante (bromuro di etidio) precedentemente incorporato nel gel.

## **APPENDICE II C – Procedure sperimentali – Clonaggio (T/A cloning)**

### **Clonaggio dei prodotti PCR**

Tutti i prodotti PCR sono stati clonati mediante la tecnica di clonaggio detta “T/A cloning” che permette di introdurre un frammento PCR all'interno di un vettore plasmidico per mezzo dei due residui di adenina che vengono normalmente aggiunti rispettivamente in 5' e in 3' ai frammenti di PCR per attività terminal transferasica dell'enzima *Taq* polimerasi. Il vettore che viene quindi utilizzato (T-vector) è dotato, in condizioni di linearità, di un singolo residuo di timina posto in ciascuna delle due estremità libere. Attraverso una reazione di ligasi, mediata dall'enzima DNA ligasi, le adenine libere alle due estremità del frammento PCR reagiscono con le timine ad esse complementari presenti sulle estremità del vettore, portando alla formazione di un plasmide circolare contenente il frammento di interesse. Prodotti inevitabili ed indesiderati delle reazioni di ligasi provengono dalla chiusura o ricircularizzazione del vettore su se stesso o dall'inserzione in esso di frammenti aspecifici. Affinchè il prodotto principale della reazione di ligasi corrisponda ad un plasmide contenente il frammento PCR di interesse, è opportuno ottimizzare il rapporto delle quantità molari relative dell'inserto e del vettore che vengono messe in reazione.

La miscela che contiene i prodotti di ligasi viene quindi diluita ed utilizzata per trasformare delle cellule competenti, ovvero cellule batteriche in grado di integrare DNA circolare al loro interno mediante *shock* termico. Una volta trasformate, le cellule competenti vengono fatte crescere su terreno selettivo in presenza di un antibiotico: solo le cellule che avranno integrato il plasmide formeranno delle colonie sulla piastra di coltura, dal momento che il vettore contiene un gene per la resistenza ad uno specifico anticorpo. Una parte delle colonie conterranno il plasmide ricircularizzato (colonie negative) mentre il resto delle colonie (colonie “ricombinanti” o positive) presenteranno un plasmide costituito da un vettore legato ad un inserto. Le colonie positive vengono selezionate innanzitutto mediante un procedimento di *screening* su base colorimetrica e poi attraverso il procedimento di *screening colony PCR* viene accertata l'effettiva integrazione del frammento di interesse nel vettore plasmidico. In quest'ultima procedura le colonie batteriche positive vengono sottoposte a lisi cellulare, e il lisato viene utilizzato come DNA stampo in una reazione PCR con due *primer* esterni all'inserto: se l'amplificato corrisponde all'inserto di interesse la colonia viene selezionata e fatta crescere in un

brodo selettivo. Le cellule prodotte vengono infine sottoposte ad estrazione e purificazione del plasmide mediante Miniprep.

Nel caso specifico i frammenti PCR sono stati clonati nel vettore p-Gem-T-Easy Vector (PROMEGA) Tale vettore, lungo 3015 nucleotidi, contiene un sito per la resistenza all'ampicillina, e due promotori della RNA polimerasi (SP6 e T7) che fiancheggiano un *polylinker* che si trova all'interno della regione codificante per  $\alpha$ -peptide dell'enzima  $\beta$ -glattosidasi. La sequenza dell' $\alpha$ -peptide risulta divisa in due parti quando il vettore si trova nello stato lineare, con i due residui di timina esposti sulle estremità. L'inattivazione dell' $\alpha$ -peptide per inserimento di un prodotto PCR inibisce la produzione di  $\beta$ -glattosidasi: questo permette, in un terreno di cultura contenente X-gal e IPTG, di individuare i cloni ricombinanti dal momento che essi generano colonie bianche, a differenza delle colonie in cui non è avvenuto l'inserimento del frammento (vettore ricircularizzato) e che sviluppano, quindi, per reazione enzima-substrato, una colorazione blu.

I prodotti PCR sono stati inseriti nel vettore pGEM-T Easy Vector rispettando il rapporto 3:1 tra inserto e plasmide, mediante una reazione di ligasi che è stata eseguita in un volume finale pari a 10  $\mu$ l contenenti 120 ng d'inserto, 40 ng di vettore pGEM-T-easy, 5  $\mu$ l del tampone 2X di reazione della ligasi e 3 Unità Weiss di T4 DNA ligasi (Promega). Della miscela di ligasi sono stati utilizzati 4  $\mu$ l per la trasformazione delle cellule del ceppo batterico JM109, rese competenti seguendo il protocollo *standard* con cloruro di calcio (Sambroock *et al.*, 1989).

La miscela di ligasi è stata diluita con acqua pura fino ad un volume di 20  $\mu$ l e inoculata in 100  $\mu$ l di cellule competenti. Le cellule inoculate sono state lasciate 15 minuti in ghiaccio, poi messe a bagnomaria per 45-50 secondi a 42°C (fase di *shock* termico) e infine raffreddate 2 minuti in ghiaccio. Sono stati poi aggiunti 800  $\mu$ l di SOC (Brodo cellulare potenziato: 10 g/l Triptone Peptone; 5 g/l Estratto di lievito; 5 g/l NaCl) e le cellule sono state lasciate crescere per 1-2 ore a 37° C in un volume finale di 900  $\mu$ l. Dopo aver risospeso il *pellet* batterico si è proceduto al piastramento delle cellule trasformate su terreno solido LB-agar (Luria Bertani 10 g/l Triptone Peptone; 5 g/l Estratto di lievito; 5 g/l NaCl; 15g/ Agar) in presenza di ampicillina (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) e di IPTG e X-gal. Le piastre sono state incubate per 16-24 ore in un incubatore ad aria a 37° C. La verifica dei cloni ricombinanti è stata effettuata mediante *colony screening PCR*, con 15 minuti di lisi batterica a 94°C, utilizzando 2  $\mu$ l di estratto e procedendo alla reazione di PCR con i *primer* SP6 e T7 (nelle stesse condizioni generali indicate in questo studio per le amplificazioni tramite PCR, ad eccezione della temperatura di *annealing*, pari, in questo caso, a 50°C).

## **APPENDICE II D – Procedure sperimentali - Sequenziamento**

Il sequenziamento automatico impiega nucleotidi marcati con quattro differenti fluorofori che, se eccitati da un raggio laser, emettono luce ad una determinata lunghezza d'onda. Tali nucleotidi sono inoltre modificati in ddNDT (2', 3' dideossinucleosidi 5' fosfato) e questo fa sì che là dove essi si inseriscono si interrompa la polimerizzazione del filamento nascente. Effettuando quindi una reazione PCR con una miscela di dNTP e di ddNTP marcati (oltre ad un appropriato primer per l'innesco della sintesi) si ottiene una serie di frammenti di amplificazione più o meno lunghi, a seconda del momento di incorporazione del nucleotide modificato. I frammenti marcati vengono separati automaticamente per corsa su gel e ciascuna banda viene analizzata per l'emissione di fluorescenza della lunghezza d'onda specifica per ogni tracciante. I picchi di emissione risultanti, corrispondenti ciascuno ad una singola base, sono poi elaborati da un *software* che fornisce il cromatogramma da cui si ricava la sequenza nucleotidica del frammento.

## APPENDICE III A – File Nexus per Paup\* 4b10 per la Regione di Controllo

I comandi iniziali sono validi per tutti i file nexus (in grassetto), di seguito vengono riportati i comandi per il ML, la MP non corretta, il NJ, la MP corretta e l'analisi Bayesiana.

```
BEGIN TAXA;
DIMENSIONS NTAX=50;
TAXLABELS (lista dei taxa)
;
End;
BEGIN CHARACTERS;
DIMENSIONS NCHAR=754; (gap esclusi)
FORMAT DATATYPE=DNA MISSING=? GAP=.;
MATRIX (matrice dei dati)
END;
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
log file=CR_MLmodel.out;
set criterion=likelihood; [maximum likelihood]
Lset Base=(0.3765 0.0910 0.1023) Nst=2 TRatio=1.7495 Rates=gamma Shape=0.6332 Pinvar=0.3115;
hsearch
  start=stepwise
  addseq=random
  swap=TBR
  nreps=100
  allswap=yes;
describe all;
savetrees file=CR_MLmodel.tre append=yes;
logstop;
endblock;
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
set criterion=parsimony; [unweighted parsimony]
hsearch
  start=stepwise
  addseq=random
  swap=SPR
  nreps=100
  allswap=yes;
describe all;
savetrees file=CR_nonwei.tre;
bootstrap
  nreps=100
  search=heuristic; [bootstrap hsearch, unweighted parsimony]
savetrees
  file=CR_nonweicons.tre
  from=1
  to=1; [salva consenso bootstrap]
log stop;
endblock;
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
set criterion=distance; [criterio di ricerca=distanza]
Lset Base=(0.3765 0.0910 0.1023) Nst=2 TRatio=1.7495 Rates=gamma Shape=0.6332 Pinvar=0.3115;
dset
distance=ml;
NJ;
describe;
savetrees file=CR_NJ.tre;
bootstrap
```



```

nreps=100
search=heuristic; [bootstrap hsearch, NJ]
set autoclose=yes;
savetrees
  file=CR_NJcons.tre
  from=1
  to=1; [salva consenso bootstrap]
log stop;
endblock;
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
usertype mymat stepmatrix=4
      a          c          g          t
[a]      .          1.7495      1          1.7495
[c]      1.7495      .          1.7495      1
[g]      1          1.7495      .          1.7495
[t]      1.7495      1          1.7495      .
;
set criterion=parsimony; [weighted parsimony]
ctype mymat:all; [carica la stepmatrix mymat]
hsearch
  start=stepwise
  addseq=random
  swap=TBR
  nreps=100
  allswap=yes;
describe all;
savetrees file=CR_weight_pars.tre;
bootstrap
  nreps=100
  search=heuristic; [bootstrap hsearch, weighted parsimony]
savetrees
  file=CR_parscons.tre
  from=1
  to=1; [salva consenso bootstrap]
log stop;
endblock;
begin data;
  dimensions ntax=50 nchar=754;
  format datatype=dna missing=? gap=-;
  matrix
begin mrbayes;
lset
  nst=6
  rates=gamma;
  set autoclose=yes;
  mcmcp ngen=600000 printfreq=1000 samplefreq=100
  savebrlens=yes filename=CRBayes;
  mcmc;
  sumt filename=CRBayes.t burnin=1800 contype=halfcompat;
end;

```

## APPENDICE III B – File Nexus per Paup\* 4b10 per la COI

I comandi iniziali sono validi per tutti i file nexus (in grassetto), di seguito vengono riportati i comandi per il ML, la MP non corretta, il NJ, la MP corretta e l'analisi Bayesiana.

```
BEGIN TAXA;
DIMENSIONS NTAX=48;
TAXLABELS (lista dei taxa)
;
End;
BEGIN CHARACTERS;
DIMENSIONS NCHAR=1542;
FORMAT DATATYPE=DNA MISSING=? GAP=.;
MATRIX (matrice dei dati)
END;
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
log file=Co1_MLmodel.out;
set criterion=likelihood; [maximum likelihood]
Lset Base=(0.3268 0.1695 0.1407) Nst=6 Rmat=(1.0000 36.1893 1.0000 1.0000 9.4187) Rates=gamma Shape=0.8632
Pinvar=0.7538;
hsearch
  start=stepwise
  addseq=random
  swap=TBR
  nreps=100
  allswap=yes;
describe all;
savetrees file=Co1_MLmodel.tre append=yes;
endblock;
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
log file=Co1_nonweiMP.out;
set criterion=parsimony; [unweighted parsimony]
hsearch
  start=stepwise
  addseq=random
  swap=TBR
  nreps=100
  allswap=yes;
describe all;
savetrees file=Co1_nonwei.tre;
bootstrap
  nreps=100
  search=heuristic; [bootstrap hsearch, unweighted parsimony]
savetrees
  file=Co1_nonweicons.tre
  from=1
  to=1; [salva consenso bootstrap]
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
log file=Co1_NJmodel.out;
set criterion=distance; [criterio di ricerca=distanza]
Lset Base=(0.3268 0.1695 0.1407) Nst=6 Rmat=(1.0000 36.1893 1.0000 1.0000 9.4187) Rates=gamma Shape=0.8632
Pinvar=0.7538;
dset
distance=ml;
NJ;
describe;
savetrees file=Co1_NJ.tre;
bootstrap
```

```

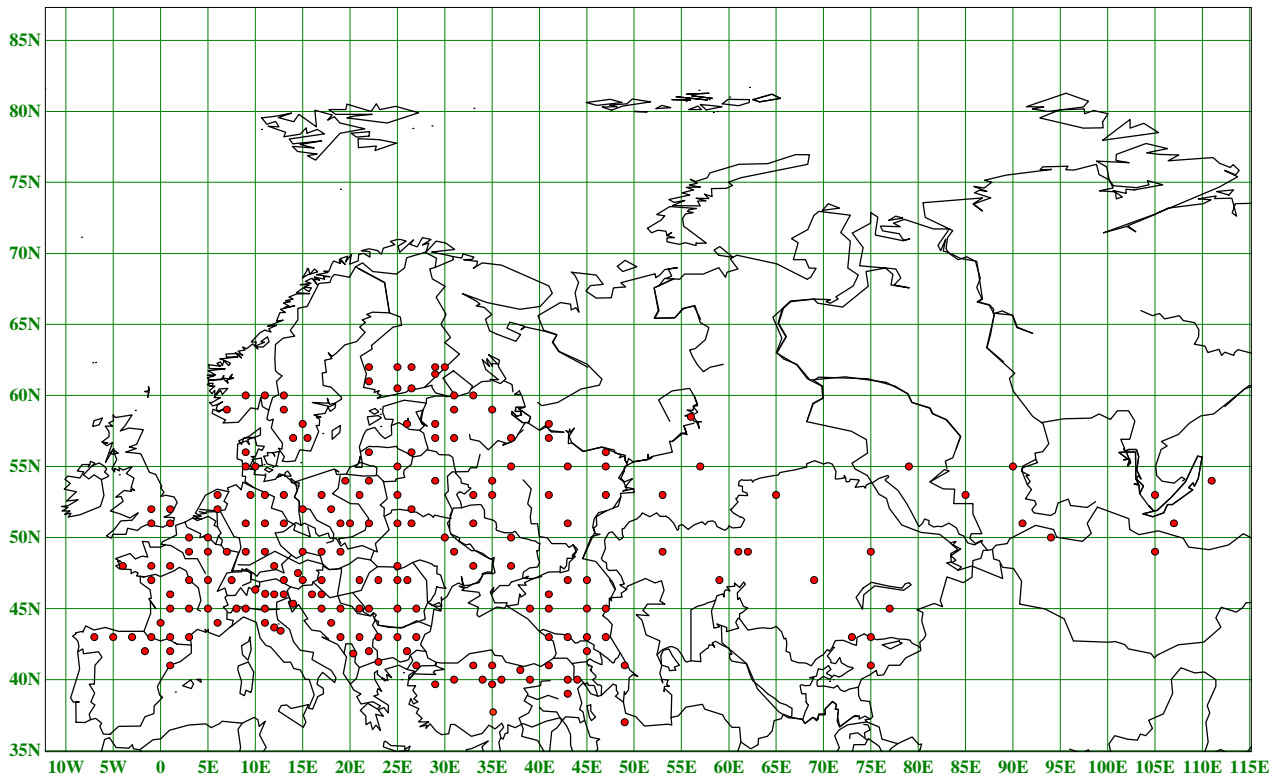
nreps=100
search=heuristic; [bootstrap hsearch, NJ]
savetrees
file=Co1_NJcons.tre
from=1
to=1; [salva consenso bootstrap]
BEGIN PAUP;
set autoclose=yes;
set maxtrees=200;
set increase=no;
log file=Co1_weighpars_model.out;
usertype mymat stepmatrix=4

      a          c          g          t
[a]   .          1.0000      36.1893     1.0000
[c]   1.0000      .          1.0000      1
[g]   1           1.0000      .          1.0000
[t]   1.0000     9.4187      1.0000      .
;
set criterion=parsimony; [weighted parsimony]
ctype mymat:all; [carica la stepmatrix mymat]
hsearch
start=stepwise
addseq=random
swap=TBR
nreps=100
allswap=yes;
describe all;
savetrees file=Co1_weight_pars.tre;
bootstrap
nreps=100
search=heuristic; [bootstrap hsearch, weighted parsimony]
savetrees
file=Co1_parscons.tre
from=1
to=1; [salva consenso bootstrap]
begin mrbayes;
lset
nst=6
rates=gamma;
set autoclose=yes;
mcmc ngen=600000 printfreq=1000 samplefreq=100
savebrlens=yes filename=co1Bayes;
mcmc;
sumt filename=co1Bayes.t burnin=1 400 contype=halfcompat;
end;

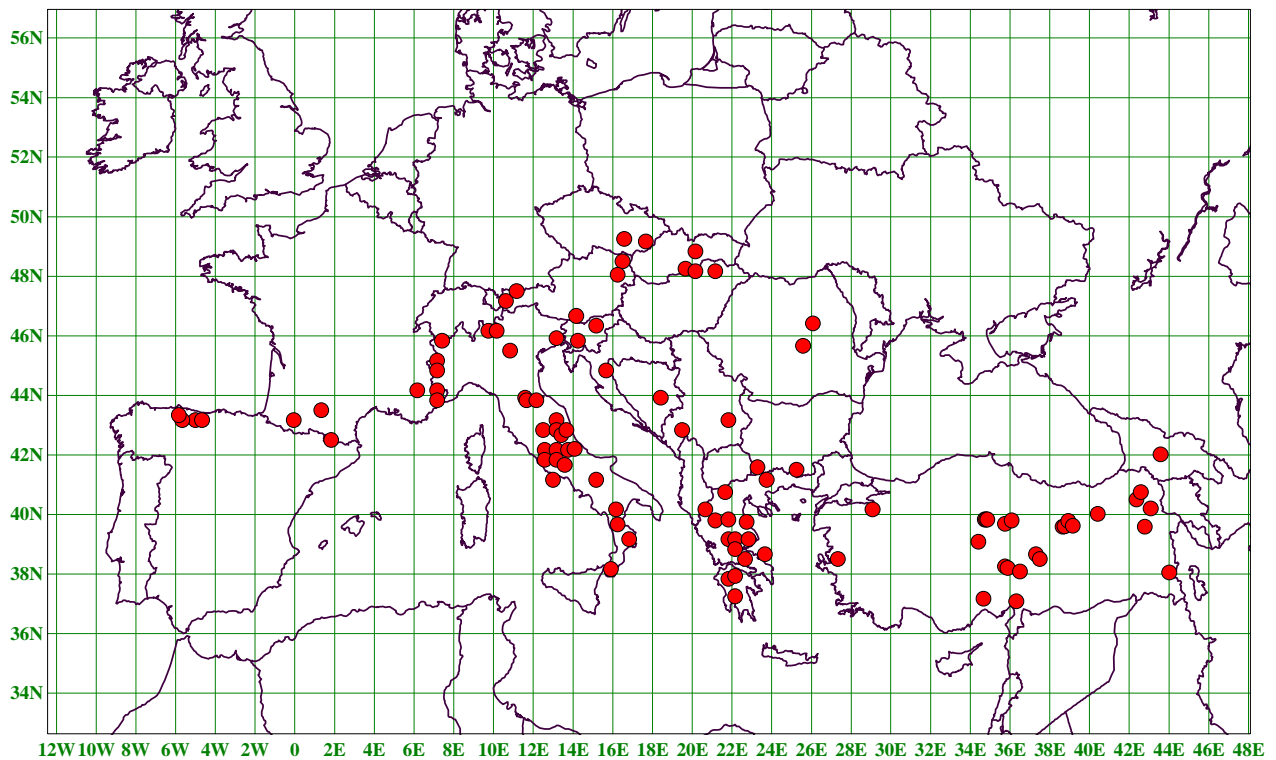
```

**APPENDICE IV – Distribuzione geografica delle specie del sottogruppo di *M. coracinus***

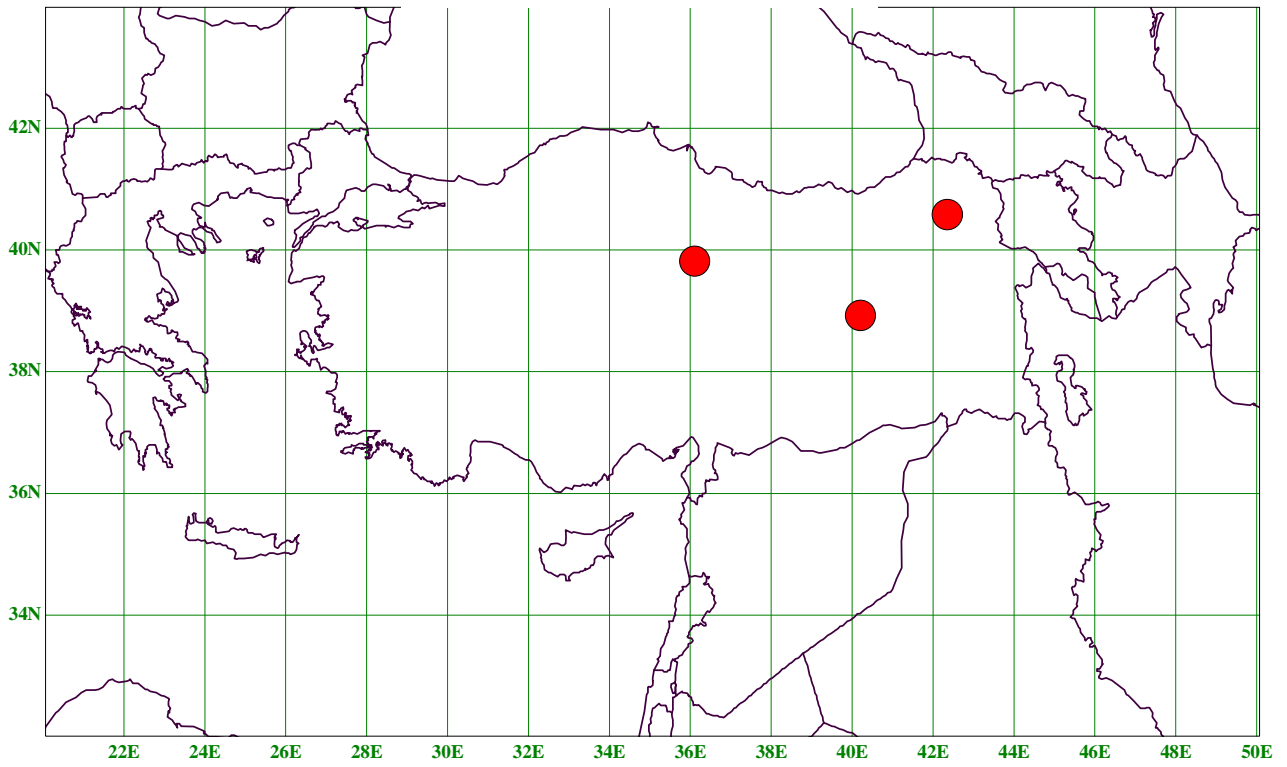
**a) *Meligethes coracinus***



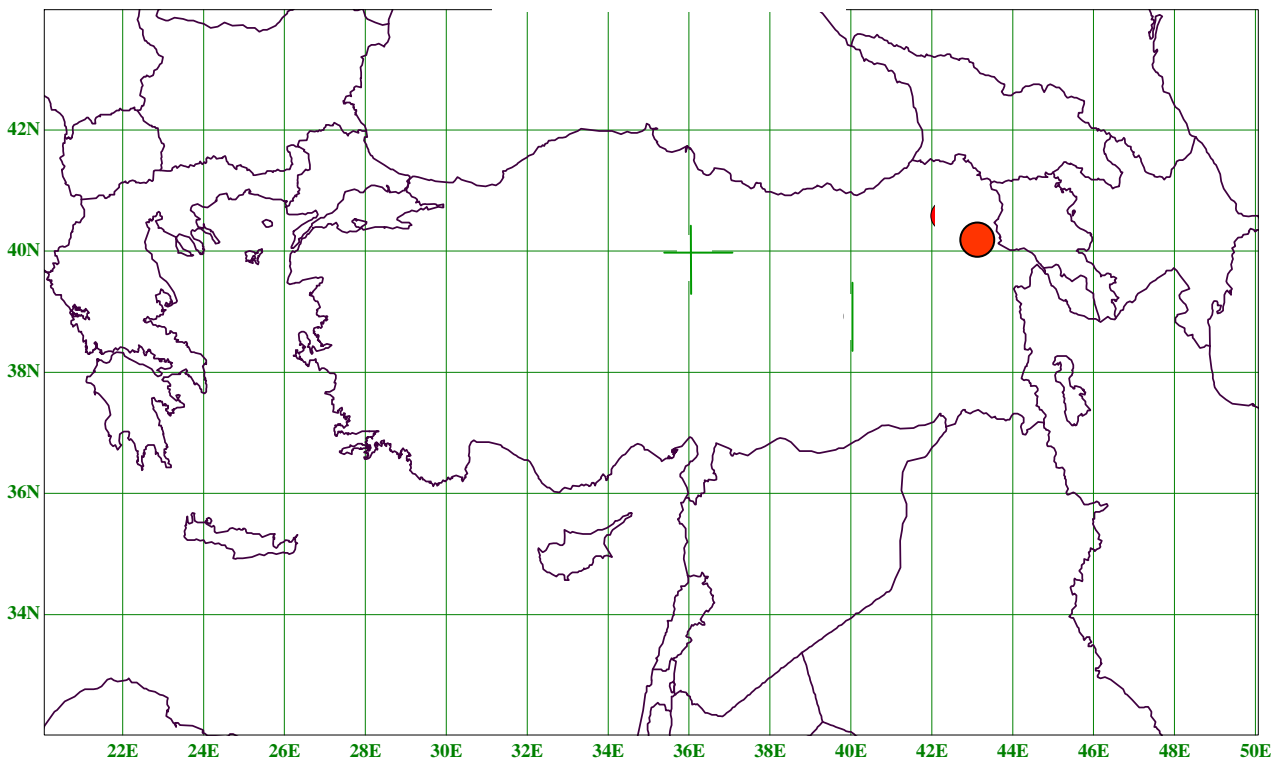
**b) *Meligethes erysimicola***



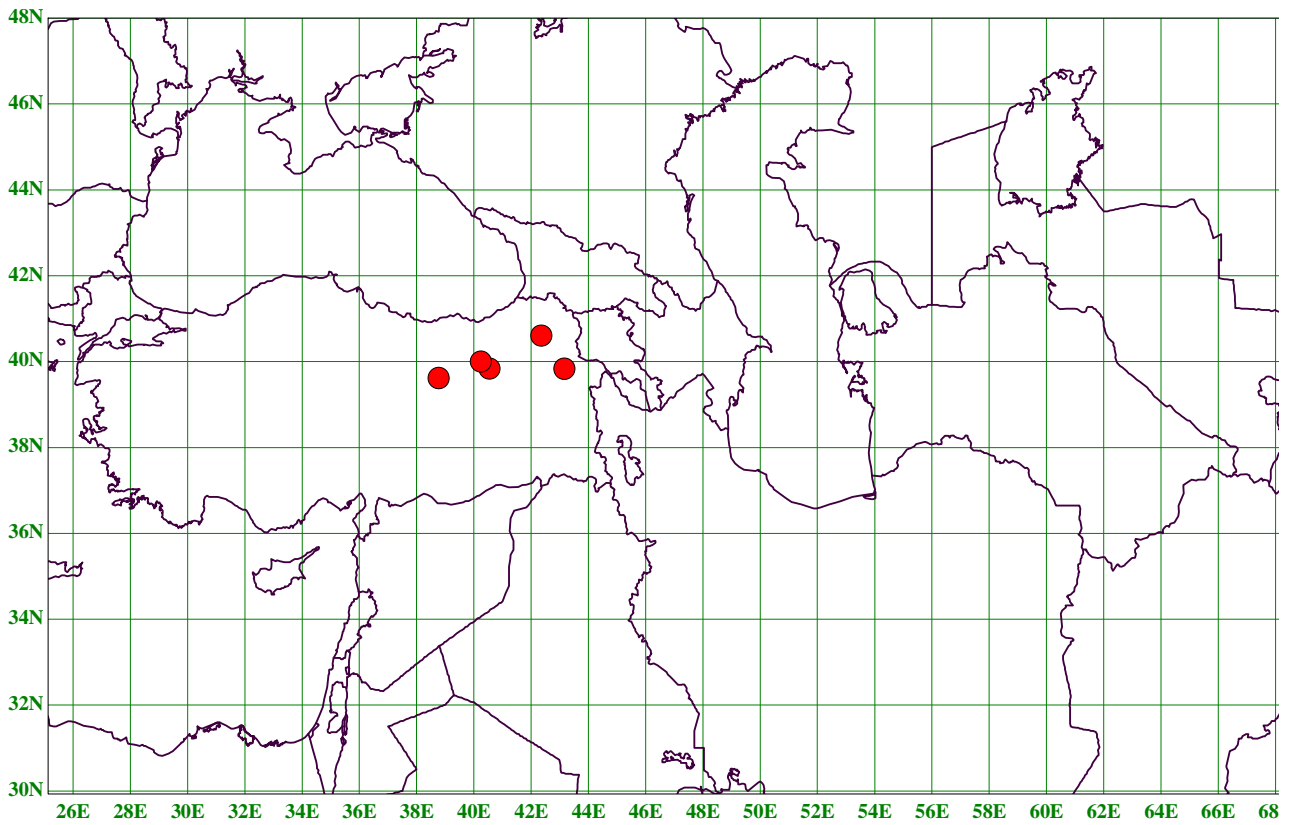
c) *Meligethes* sp. cfr. *coracinus*



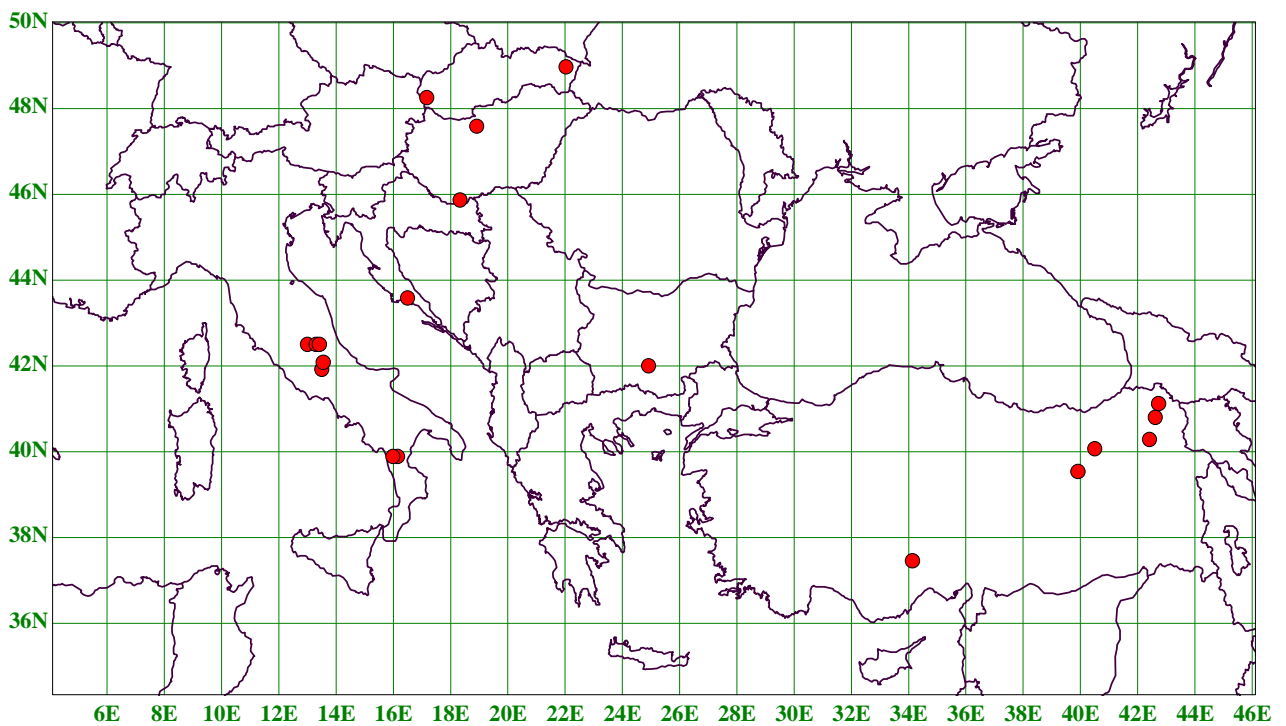
d) *Meligethes longulus*



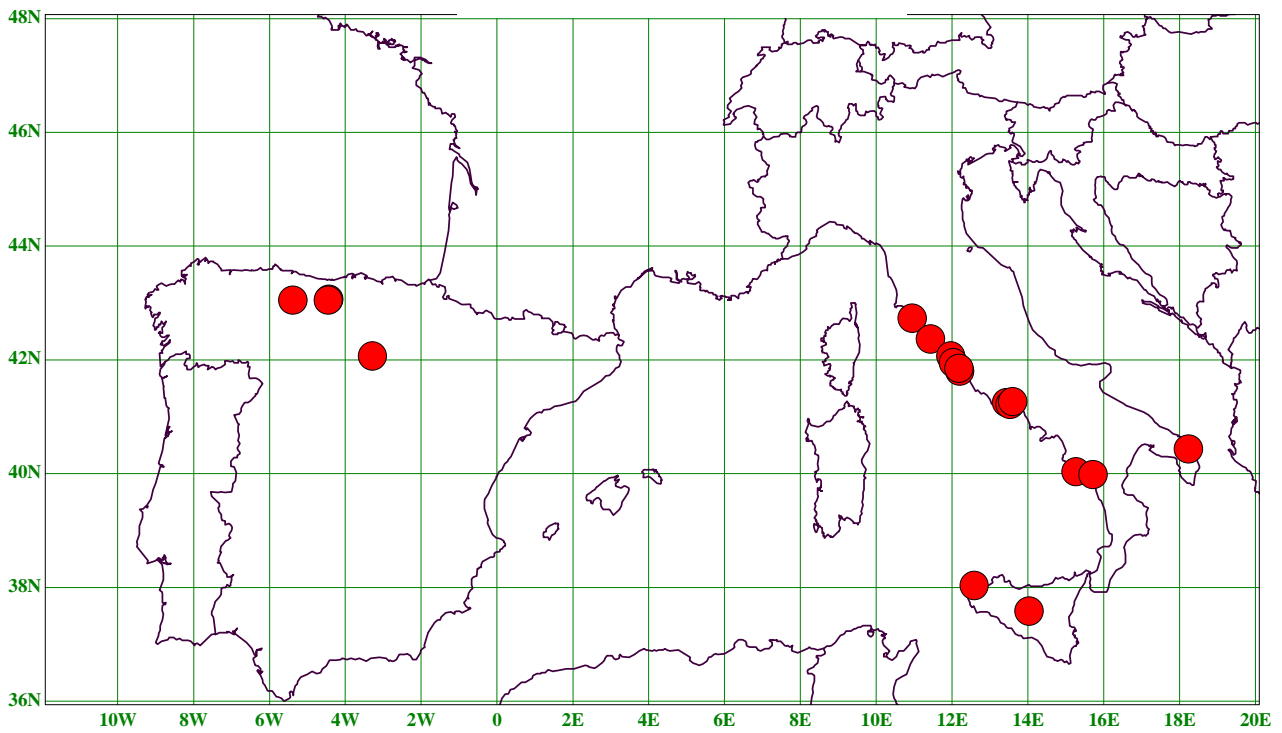
e) *Meligethes* sp. 2 cfr. *longulus*



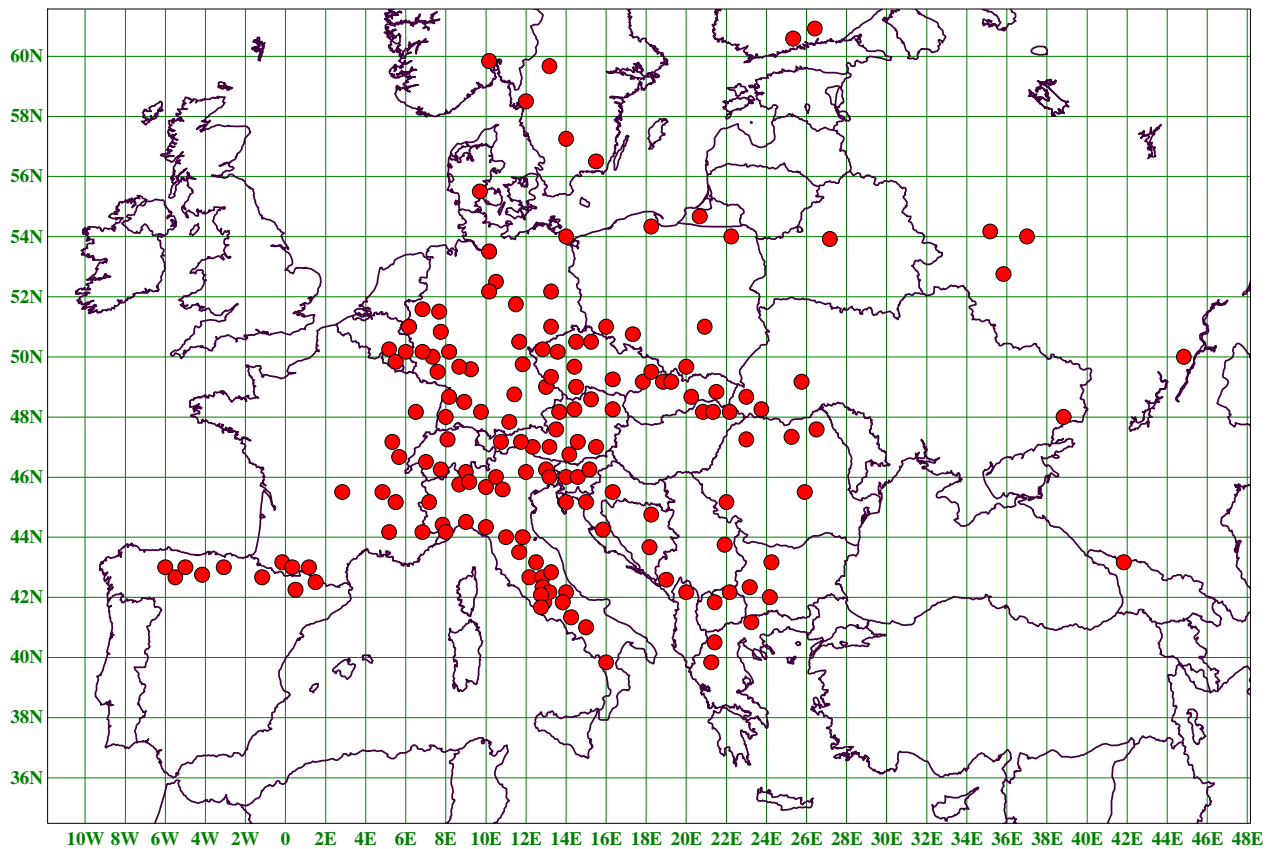
f) *Meligethes arankae*



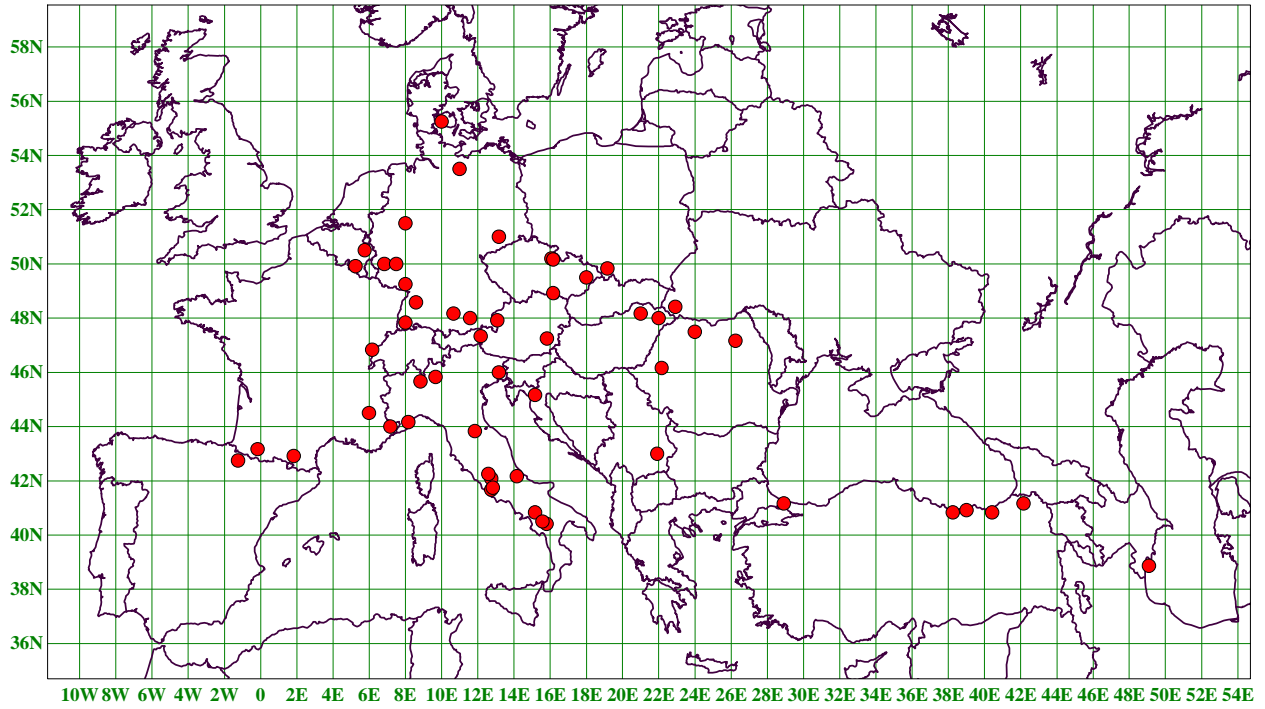
g) *Meligethes thalassophilus*



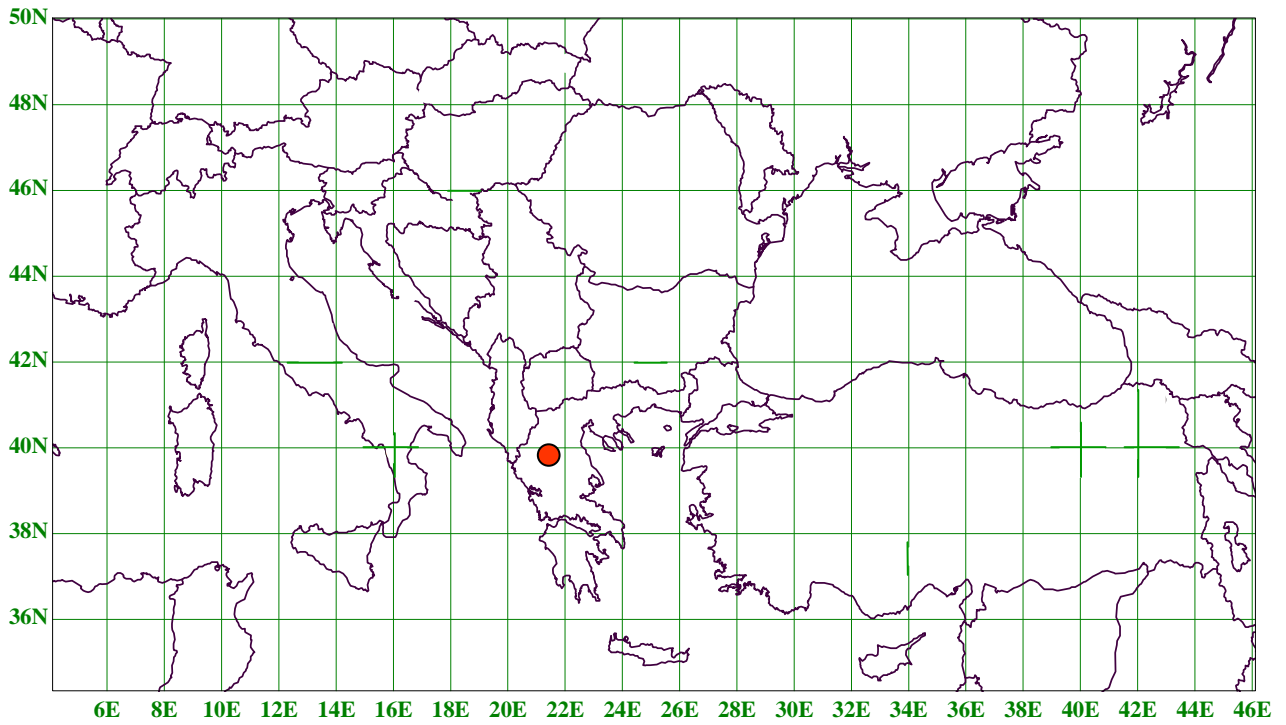
h) *Meligethes subaeneus*



i) *Meligethes matronalis*

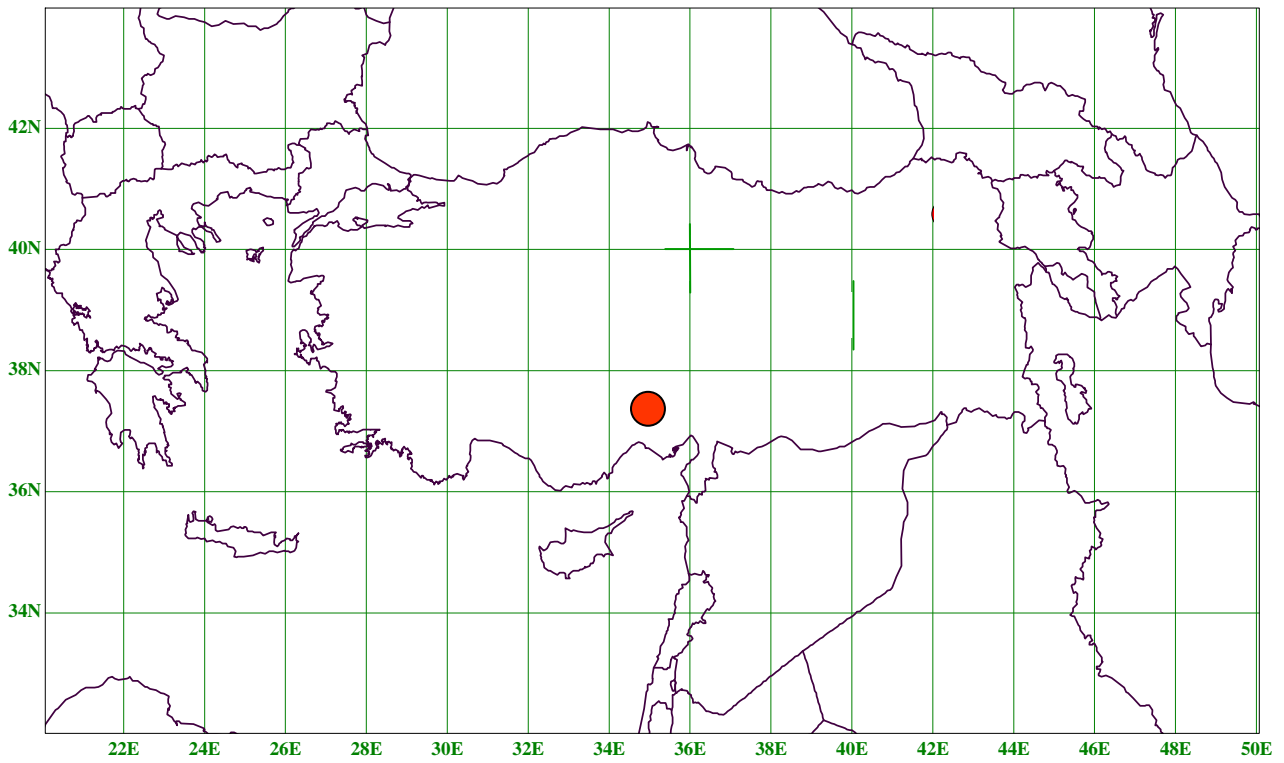


1) *Meligethes epeirosi*





m) *Meligethes cristofaroi*



n) *Meligethes fulvipes*

