

Filogeografia comparata di *Parnassius apollo* e *P. mnemosyne*. Un contributo genetico-molecolare alla biogeografia dell'Appennino

PAOLO GRATTON, VALENTINA TODISCO, VALERIO SBORDONI
*Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata,"
via della Ricerca Scientifica, I-00133 Roma
e-mail: paolo.gratton@uniroma2.it*

Keywords: Comparative Phylogeography, *Parnassius*, mtDNA, Pleistocene, Apennine

SUMMARY

Genetic data may greatly contribute to understand the role of climate change in shaping the distribution of species and faunal assemblages. In this paper we propose a comparative analysis involving two related butterflies, *Parnassius apollo* and *P. mnemosyne*, sharing an almost identical range of occurrence but differing in their feeding ecology and local distribution. We analyzed mtDNA data under different coalescent-based models to trace the origin of the populations of these species in the Apennine range.

Our results suggest that *P. apollo* and *P. mnemosyne* may have attained their present geographic distribution following similar colonization routes, though in different times, according to their specific ecological requirements. In fact, genetic data are consistent with the hypothesis that *P. mnemosyne*, requiring forested habitat, may have been completely absent from Central Apennine during the Last Glaciation, while the more xerophile *P. apollo* probably benefited from Glacial conditions to expand its range through the Apennine range.

INTRODUZIONE

Le glaciazioni pleistoceniche hanno lasciato una traccia profonda sulla struttura e sulla distribuzione del popolamento animale e vegetale delle regioni temperate (Hewitt, 1996, 2000), e lo studio degli areali di distribuzione delle specie montane ha tradizionalmente rappresentato uno dei temi privilegiati della ricerca biogeografica in Italia e nel mondo. In Italia e nelle altre penisole mediterranee, la frequente occorrenza di taxa o di sister taxa montani a distribuzione discontinua o disgiunta artico-alpina, boreo-alpina, alpino-appenninica ecc. offriva lo spunto per interpretare in chiave storico-ecologica il significato della distribuzione di un determinato taxon come il risultato del succedersi di eventi di espansione demografica e di frammentazione. Nella biogeografia tradizionale la

definizione temporale di questi eventi fa essenzialmente riferimento a due ordini di informazioni: a) una buona conoscenza del taxon in esame; b) le datazioni disponibili su base stratigrafica e paleoclimatica derivanti dallo studio dei pollini fossili e da altre evidenze paleontologiche. Il grado di differenziamento tassonomico tra popolazioni o specie allopatriche, vicarianti e geograficamente frammentate era spesso utilizzato come il riferimento temporale, relativo, per assegnare un dato evento cladogenetico a una determinata fase del pleistocene.

L'approccio genetico alla sistematica e filogenesi, condotto dapprima tramite lo studio degli allozimi (Avise et al., 1987) e, successivamente, attraverso la filogenesi molecolare di sequenze di DNA (Taberlet et al., 1998) ha notevolmente arricchito il kit strumentale del biogeografo. Gli ultimi 10-15 anni hanno visto un'esplosione di studi filogeografici, con ricostruzioni particolarmente vivide della storia e geografia di numerosi organismi vegetali e animali, tra cui varie specie di farfalle (DeChaine e Martin, 2004, 2005; Deffontaine et al., 2005; Schmitt, 2007). Nella maggior parte di questi studi la datazione degli eventi demograficamente significativi e del confinamento in rifugi è frequentemente ipotizzata, tramite l'orologio molecolare, utilizzando tassi di mutazione taxon specifici, di solito ricavati da calibrazioni ottenute dalla filogenesi. Nelle farfalle, ad esempio, viene frequentemente utilizzato un tasso di divergenza attorno a 0,02 (Brower, 1994; DeChaine e Martin, 2004, 2005) che ha dimostrato di tracciare, in maniera ragionevole, la tempistica di eventi cladogenetici sulla scala delle centinaia di migliaia e di milioni di anni.

Tuttavia, studi recenti (Ho et al., 2005; Ho e Larson, 2006) hanno evidenziato che l'uso di tassi di mutazione "filogenetici" applicati a studi di popolazione possono portare a una sistematica sovrastima della datazione di eventi evolutivi recenti.

Parnassius apollo e *Parnassius mnemosyne*, rappresentano specie paradigmatiche di farfalle a costumi montani. Pur mostrando un areale di distribuzione largamente sovrapponibile a grande scala (Fig. 1), differiscono notevolmente per le specifiche caratteristiche ecologiche. In particolare sono le diverse esigenze trofiche delle larve che determinano la preferenza di *P. apollo* per microambienti montani xerofitici, dove i bruchi si nutrono di Crassulaceae appartenenti ai generi *Sedum* e *Sempervivum* (Nakonieczny et al., 2005). *P. mnemosyne*, al contrario, si rinviene in habitat ecotonali in ambienti forestali mesofili, dove crescono le piante nutrici, del genere *Corydalis* (Fumariaceae) (Konvicka e Kuras, 1999; Bergström, 2005). Tali differenze ecologiche possono spiegare perché, ad esempio, *P. apollo* sia abbondante nelle vallate alpine relativamente aride (Valle d'Aosta, Alto Adige), e nella penisola Iberica, dove, al contrario, *P. mnemosyne* è molto scarso o completamente assente.

In questo lavoro abbiamo analizzato sequenze del genoma mitocondriale nel tentativo di ricostruire e comparare, attraverso la stima di parametri demografici

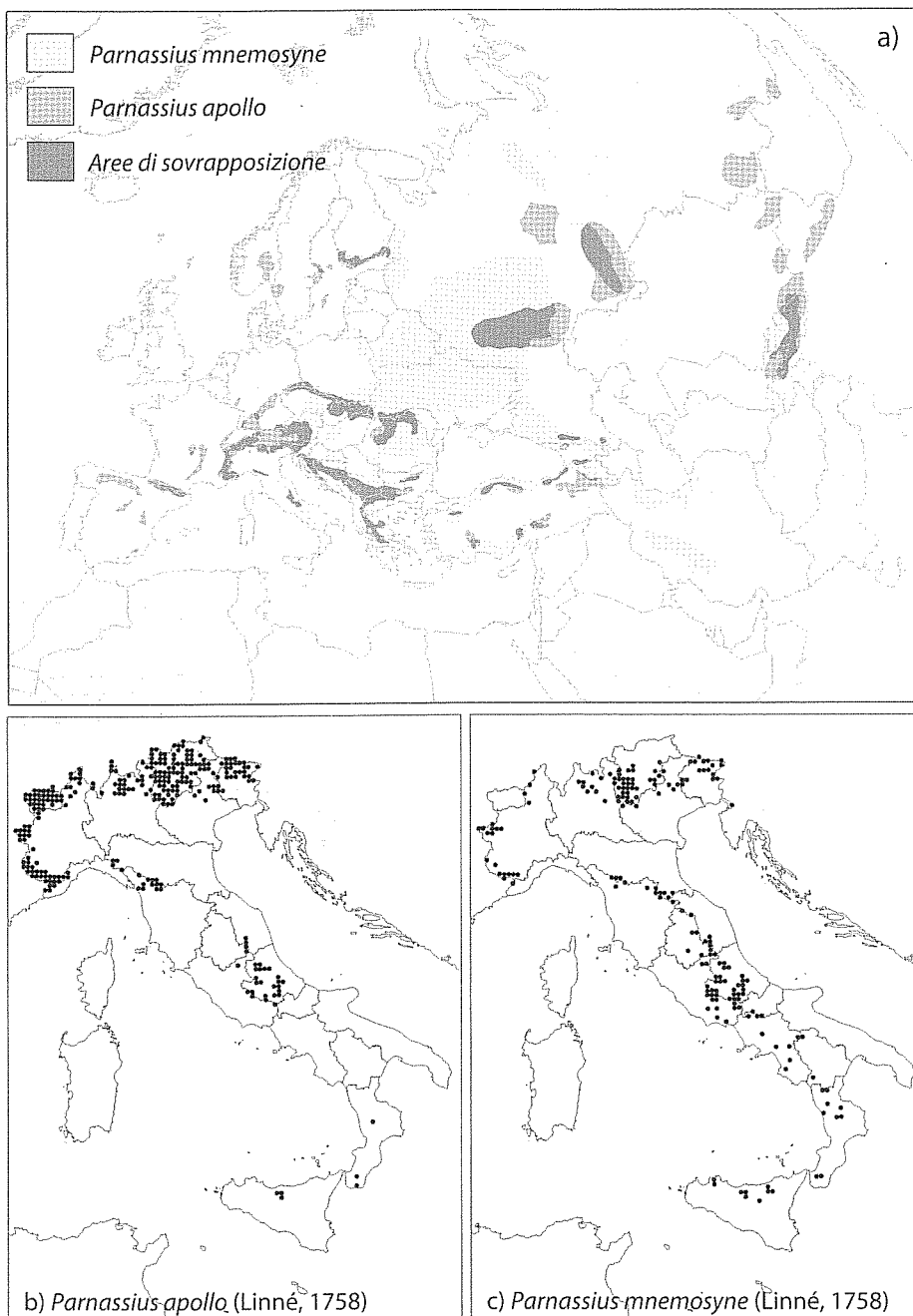


Fig. 1 - 1a) Distribuzione approssimativa di *P. apollo* e *P. mnemosyne*. 1b) Distribuzione di *P. apollo* in Italia secondo Ruffo e Stoch (2004). 1c) Distribuzione di *P. mnemosyne* in Italia secondo Ruffo e Stoch (2004).

ed evolutivi, la storia del popolamento dell'Appennino da parte delle due specie di *Parnassius*. L'adozione di un tasso di mutazione *time-dependent*, opportunamente calcolato per una delle due specie (Gratton et al., in prep.), e di strumenti analitici basati sulla stima Bayesiana dei parametri di modelli di coalescenza, ci ha permesso di ottenere risultati incoraggianti. Un simile approccio potrebbe essere eventualmente esteso ad altri organismi che, come le nostre due specie di farfalle, hanno subito in maniera diversa, nel corso della loro storia evolutiva, gli effetti del cambiamento climatico nel pleistocene.

MATERIALI E METODI

Campioni e tecniche molecolari

Le analisi che compongono il nucleo del presente lavoro si basano su campioni di *P. apollo* (N = 85) e *P. mnemosyne* (N = 115) provenienti dalle regioni Alpina e Appenninica (Fig. 2). Parte dei campioni sono stati raccolti direttamente dagli autori tra il 2003 e il 2006 (Autorizzazione del Ministero dell'Ambiente DPN/2D/2005/21020), la restante parte deriva da collezioni private. Il DNA è stato estratto da una/due zampe e sono stati amplificati e sequenziati frammenti tra loro completamente sovrapposti di 869bp e 931bp, rispettivamente per *P. apollo* e *P. mnemosyne*, del gene mitocondriale per la Citocromo Ossidasi I (COI), seguendo procedure già descritte da Gratton (2006) e Konopinski (2007).

Analisi dei dati

I dati analizzati in dettaglio in questo lavoro fanno parte di progetti più ampi che comprendono dati di sequenza provenienti dall'intero areale delle due specie (*P. apollo* N = 165, *P. mnemosyne* N = 445). Tali dati sono stati impiegati, insieme a quelli relativi ai campioni alpini e appenninici, nella costruzione di network di Median-Joining (MJ) (Bandelt et al., 1999), per la ricostruzione delle genealogie degli aplotipi. La diversità nucleotidica delle sequenze mitocondriali ($\theta(\pi)$) è stata calcolata utilizzando il software DNASP (Rozas et al., 2003).

L'equilibrio demografico in differenti gruppi di sequenze è stato testato applicando le statistiche D (Tajima, 1989), e F_s (Fu, 1997). ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al., 2005) è stato utilizzato per calcolare i valori delle due statistiche e testarne la significatività. La distribuzione attesa del *mismatch* secondo il modello di espansione demografica improvvisa (*Sudden Expansion*) e il parametro $\tau = 2\mu t$ sono stati calcolati utilizzando ARLEQUIN 3.0 (Schneider e Excoffier, 1999). Un test di *goodness of fit*, implementato in ARLEQUIN 3.0, è stato impiegato per valutare la consistenza delle distribuzioni osservate con le attese in base al modello. I limiti di confidenza dei parametri sono stati calcolati utilizzando lo stesso programma attraverso 1000 repliche di *bootstrap*.

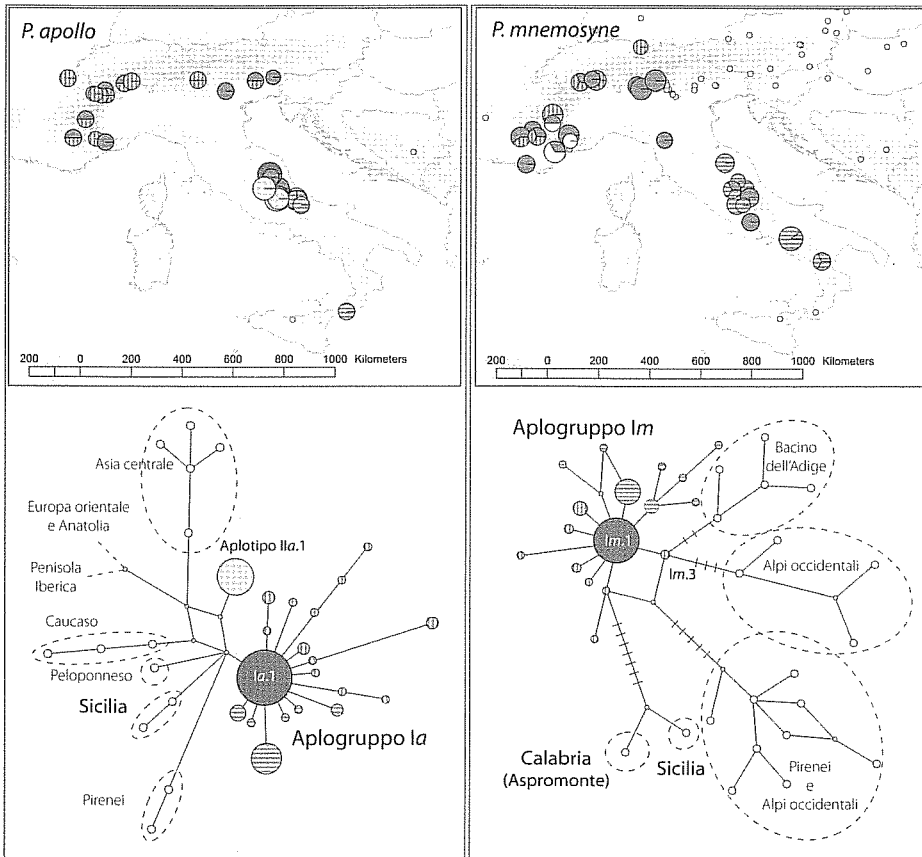


Fig. 2 - Networks di Median-Joining degli aplotipi mitocondriali (COI) di *P. apollo* e *P. mnemosyne* e loro distribuzione nei campioni analizzati in questo lavoro. Gli aplogruppi *Ia*, *Ila* e *Im* sono evidenziati e la loro frequenza illustrata nei grafici a torta riportati sulle mappe. La dimensione dei cerchi è proporzionale alla frequenza dell'aplotipo (nei network) e alla dimensione dei campioni per ogni località (nelle mappe). La barratura verticale indica gli aplotipi dei gruppi *Ia* e *Im* presenti solo in campioni alpini. La barratura orizzontale quelli presenti solo in campioni appenninici.

Il programma BEAST 1.4.5 (Drummond e Rambaut, 2007) è stato utilizzato per stimare il tempo di coalescenza (time to Most Recent Common Ancestor, tMRCA) di insiemi definiti di sequenze. Questo software impiega un algoritmo di campionamento basato su catene di Markov (Drummond et al., 2002) per ottenere un campione della distribuzione delle probabilità a posteriori di diversi parametri demografici, incluso il tMRCA e la dimensione della popolazione, consentendo di impostare modelli genealogici corrispondenti a diversi scenari demografici. Le analisi in BEAST 1.4.5 sono state condotte applicando il modello HKY+ Γ (Hasegawa et al., 1985) e impostando il Bayesian Skyline Plot (BSP; Drummond et al., 2005) come modello per la genealogia delle sequenze. Il BSP

non assume un andamento demografico monotono, e appare il più adatto per tracciare la storia demografica di popolazioni sottoposte ai cambiamenti climatici e ambientali dell'Europa pleistocenica e olocenica. Il parametro "t" del modello di Isolamento con Migrazione (IM; Nielsen e Wakeley, 2001) è stato stimato impiegando il software IM (Hey e Nielsen, 2004). Dal momento che i test basati sulle statistiche D e Fs hanno respinto l'ipotesi di stabilità demografica, in questa analisi è stato applicato un modello di divergenza che permette cambiamenti indipendenti nella dimensione delle popolazioni (Hey, 2005).

Scelta di un appropriato tasso di mutazione

Studi recenti (Ho et al., 2005; Ho e Larson, 2006) hanno messo in evidenza che l'uso di tassi di mutazione "filogenetici" applicati a studi di popolazione può portare a una sistematica sovrastima della datazione di eventi evolutivi recenti. Per questo motivo, nella traduzione dei parametri demografici ed evolutivi su una scala di tempi assoluti, abbiamo scelto di utilizzare una stima del tasso di evoluzione ottenuta su una delle due specie in esame e basata su un set di dati con un livello comparabile di divergenza nucleotidica. Gratton et al. (in prep.) hanno ottenuto una stima del valore medio del tasso di sostituzione (0,08/Ma) in popolazioni nord-europee di *P. mnemosyne*. Tale tasso di mutazione è stato ottenuto con un'analisi basata su modelli di coalescenza, assumendo che la colonizzazione della regione baltica da parte di *P. mnemosyne* sia avvenuta a partire da 10.000-11.000 anni fa, dopo lo scioglimento della calotta glaciale Scandinava. Per le ragioni appena esposte, questa stima appare molto più verosimilmente applicabile al nostro studio rispetto a quelle ottenute in lavori "filogenetici" (ad esempio, Brower, 1994).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Descrizione del pattern filogeografico

La struttura filogeografica delle due specie nella regione Alpino-Appenninica mostra almeno un chiaro elemento comune, insieme ad alcune importanti differenze. La distribuzione geografica e la genealogia degli aplotipi mitocondriali (mappe e Median-Joining networks in Fig. 2), evidenziano due aplogruppi predominanti nella maggior parte delle popolazioni alpine e appenniniche, che abbiamo chiamato *Ia* in *P. apollo* e *Im* in *P. mnemosyne*. *Ia* e *Im* sono entrambi costituiti da un aplotipo ancestrale ampiamente distribuito e da una corona di aplotipi discendenti a distribuzione più localizzata. In *P. apollo* tutte le sequenze dei campioni alpini fanno parte dell'aplogruppo *Ia*, mentre in una porzione dei campioni dell'Appennino centrale è presente un aplotipo (*Ila.1*) del tutto distinto (Fig. 2). In *P. mnemosyne* la situazione sembra essere più complessa. Sulle Alpi

infatti si possono distinguere tre diverse linee mitocondriali. Le sequenze delle popolazioni del bacino dell'Adige costituiscono un aplogruppo separato, mentre nei campioni delle Alpi occidentali coesistono, accanto all'aplogruppo *Im*, una seconda linea esclusiva di quest'area e una terza diffusa anche sui Pirenei e sul Massiccio Centrale. In aggiunta a questa già notevole diversità, le popolazioni delle Alpi orientali (Veneto, Friuli, Austria e Slovenia) presentano sequenze fortemente divergenti rispetto al resto della catena, e che appartengono a un clade completamente distinto, diffuso nell'Europa centrale e orientale (Gratton, 2006), ragion per cui sono state del tutto escluse dalla presente analisi. A fronte della grandissima diversità genetica osservata nella regione alpina, le popolazioni appenniniche di *P. mnemosyne* sono estremamente uniformi, presentando solo l'aplogruppo *Im*. Una differenza minore ma comunque molto interessante tra *apollo* e *mnemosyne* riguarda i campioni dell'Aspromonte, nel sud della Calabria. Mentre in *P. apollo* queste sequenze appartengono all'aplogruppo *Ia*, in *P. mnemosyne* esse appartengono a una linea molto divergente rispetto all'aplogruppo *Im*, e sono invece molto vicine a quelle osservate nella popolazione dei Monti Nebrodi in Sicilia (Fig. 2).

Stime di parametri evolutivi

Entrambe le statistiche *D* di Tajima (1989) e *F_s* di Fu (1997), hanno evidenziato significative tracce di espansione demografica negli aplogruppi *Ia* (*P. apollo*) e *Im* (*P. mnemosyne*) (Tab. I). La distribuzione del *mismatch* negli aplogruppi *Ia* e *Im* è stata confrontata con un modello di Espansione Improvvisa (Fig. 3, Tab. I) per ottenere una stima dell'età di tale espansione. Il *goodness of fit test* non ha mostrato significative deviazioni delle distribuzioni osservate dalle distribuzioni attese secondo il modello, per cui il parametro $\tau = 2\mu t$ può essere usato per stimare l'età (*t*) dell'espansione demografica. I valori stimati di τ e i limiti di confidenza del 5% e 95% sono esposti in Tab. I. Applicando un tasso di mutazione di $\mu = 0,08/\text{Ma}$ (vedi Materiali e metodi), si ottiene che l'espansione demografica è datata a 18.400 (2.800-34.000) anni fa e 7.700 (5.500-10.500) anni fa rispettivamente per *apollo* e *mnemosyne* (Fig. 3). Dal momento che entrambi gli aplogruppi *Ia* e *Im* presentano sequenze appartenenti a popolazioni sia alpine che appenniniche, i nostri risultati indicano un'espansione demografica recente che ha coinvolto sia la regione appenninica che quella alpina in entrambe le specie.

I nostri dati non consentono di identificare con certezza la direzione dell'espansione geografica che deve avere accompagnato le espansioni demografiche, ma forniscono indicazioni interessanti, permettendo di valutare le diverse ipotesi. Come accennato in precedenza, in *P. mnemosyne* le Alpi occidentali sono una zona di alta variabilità genetica, dove coesistono tre diverse linee mitocondriali. Inoltre, l'aplotipo *Im.3*, che appare in una posizione basale all'interno dell'aplogruppo

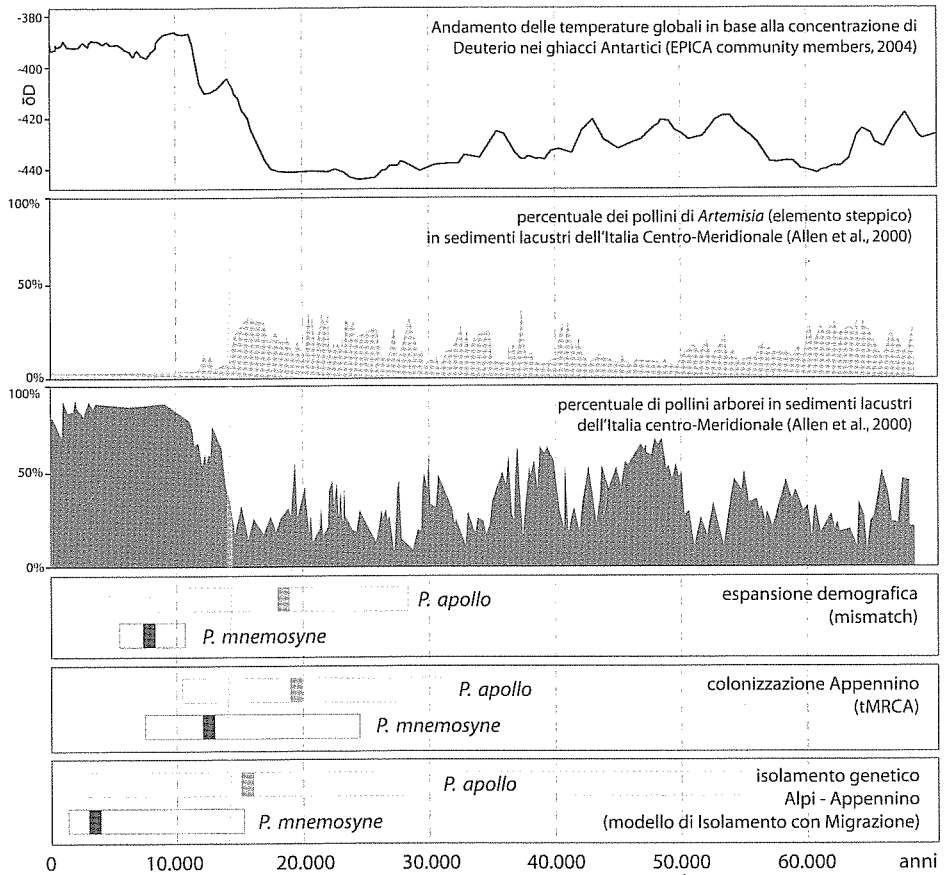


Fig. 3 - Stime di parametri evolutivi e demografici in *P. apollo* e *P. mnemosyne* confrontate con dati paleoclimatici. I valori centrali dei parametri sono indicati da rettangoli (grigio: *P. apollo*; nero: *P. mnemosyne*), gli intervalli di confidenza da barre non colorate.

Im nel MJ network (e la possibilità che questo aplotipo non sia direttamente derivato dall'aplotipo centrale è ulteriormente suggerita dal fatto che *Im.3* sia il solo aplotipo della "corona" a essere stato osservato in siti geograficamente distanti, nelle Alpi Marittime e in Savoia), è esclusivo delle Alpi occidentali. I dati dunque suggeriscono che questa regione sia considerata come una zona in cui il popolamento di *P. mnemosyne* ha persistito a lungo e rappresenti il più probabile luogo di origine delle successive espansioni. In *P. apollo* le popolazioni dell'Appennino centrale presentano un'elevata variabilità genetica per la presenza dell'aplotipo "basale" *Ila.1*, ma la variabilità nucleotidica nell'aplogruppo *Ia* è più bassa nei campioni appenninici ($\theta(\pi) = 0,0016$) che in quelli alpini ($\theta(\pi) = 0,0022$), dove si concentra la maggior parte dei rami più lunghi del MJ network (Fig. 2). La struttura generale del network

in Fig. 2 evidenza, in effetti, diversi aplogruppi del tutto distinti, ognuno confinato a una singola area, più o meno isolata (Caucaso, Sicilia, Peloponneso, Pirenei, Asia centrale, Appennino centrale). L'aplotipo *Ila.1* e l'aplogruppo *Ia* possono essere dunque interpretati come due dei numerosi relitti di un'antica e vasta frammentazione, in seguito alla quale la linea mitocondriale *Ia* fu in grado di espandersi sulle montagne italiane. Seppure in modo non decisivo, la distribuzione della diversità genetica suggerisce che tale espansione sia avvenuta a partire da rifugi presenti sulle Alpi.

Indipendentemente da quale sia stata la reale direzione dell'espansione, l'analisi esposta qui di seguito è stata condotta assumendo come "ipotesi di lavoro" che sia in *P. apollo* che in *P. mnemosyne* si sia verificata un'espansione dell'areale che ha portato popolazioni di origine alpina portatrici delle linee *Ia* e *Im*, a colonizzare la catena appenninica. A partire da questo modello ideale, abbiamo utilizzato una analisi Bayesiana della coalescenza per individuare la finestra temporale in cui potrebbe essere avvenuta la colonizzazione degli Appennini che abbiamo ipotizzato. Le sequenze degli aplogruppi *Ia* e *Im* sono state analizzate in BEAST 1.4.5 (Drummond e Rambaut, 2007), imponendo un vincolo topologico alla genealogia delle sequenze che riflettesse la nostra ipotesi di lavoro. Se la colonizzazione è avvenuta come un singolo evento e/o ha coinvolto pochi individui, tutte le sequenze mitocondriali trovate negli Appennini discenderanno probabilmente, a causa dell'effetto del fondatore, da una singola sequenza progenitrice e formeranno quindi da un sotto-clade monofiletico.

Dal momento che nessuno degli aplotipi della "corona" è in comune tra Alpi e Appennini, non ci sono evidenze che possano escludere un singolo evento di colonizzazione. Di conseguenza è possibile adottare il tempo di coalescenza (time to Most Recent Common Ancestor, tMRCA) delle sequenze appenniniche vincolate a formare un gruppo monofiletico, come una stima della data minima (più recente) in cui può essere avvenuta la colonizzazione. Inoltre, se la migrazione verso una nuova area è coincisa con una rapida espansione sia demografica che spaziale, come sembra del tutto verosimile, il tMRCA tenderà a corrispondere con l'effettiva data della colonizzazione. La Fig. 3 mostra i valori mediani e gli intervalli di credibilità al 95% della distribuzione campionata della probabilità posteriore per il tMRCA dei sotto-cladi appenninici delle linee mitocondriali *Ia* e *Im*. I parametri sono stati riportati su una scala di tempi assoluti applicando un tasso di mutazione di 0,08/Ma (vedi Materiali e metodi). Le mediane delle distribuzioni del tMRCA sono di 19.000 (I.C. 95%: 10.100-32.100) anni per *P. apollo* e 13.100 (5.200-24.500) anni per *P. mnemosyne*. Come anche nelle analisi del *mismatch* (Fig. 3), le due specie mostrano valori sfalsati, sebbene gli intervalli di credibilità siano ampiamente sovrapposti. In *P. apollo* l'intervallo di credibilità è pressoché interamente compreso nel glaciale Würm, e le date

più probabili (attorno al valore mediano) corrispondono all'ultimo Massimo Glaciale. Per *P. mnemosyne*, al contrario, le massime probabilità (attorno a 12-13.000 anni fa), corrispondono a un periodo in cui le temperature globali erano già vicine a quelle dell'Olocene e le foreste temperate avevano già iniziato la loro espansione post-glaciale nella penisola italiana (Fig. 3).

Ulteriori informazioni sono state ottenute applicando agli stessi dati il modello di Isolamento con Migrazione (vedi Materiali e metodi). In questo caso il processo biologico che ha portato all'attuale distribuzione della variabilità genetica viene modellato come un'improvvisa separazione di una popolazione originariamente panmittica, con la formazione di due popolazioni distinte geneticamente (sebbene potenzialmente connesse da un certo grado di flusso genico) nelle Alpi e negli Appennini. La Fig. 3 mostra le stime del parametro " τ " che indica il tempo trascorso dalla separazione delle popolazioni alpina e appenninica. Applicando ancora un tasso di mutazione di 0,08/Ma, si ottiene che l'evento con massima probabilità è avvenuto durante l'Olocene (massimo a 3.716 anni; Intervallo di Credibilità al 90% 1.500-15.000 anni) per *mnemosyne*, e durante il tardo Pleistocene per *apollo* (nonostante non sia stato possibile ottenere una distribuzione chiusa della probabilità posteriore e, di conseguenza, calcolare un intervallo di credibilità, la distribuzione ha presentato un chiaro massimo a 14.963 anni).

Tab. I - Valori delle statistiche D (Tajima, 1989) e Fs (Fu, 1997) con le associate significatività statistiche (p); valori stimati del parametro $\tau = 2\mu t$, con i limiti di confidenza associati del 5% e 95%, secondo il modello di espansione demografica improvvisa; *goodness of fit test*: probabilità (P) della distribuzione osservata di *mismatch* secondo il modello di espansione improvvisa.

Aplogruppo	Ia	Im
N (campione)	26	103
N. di aplotipi	15	17
FS (Fu, 1997)		
Fs	-12,911	-13,030
p	0,000	0,000
D (Tajima, 1989)		
D	-1,996	-1,810
p	0,005	0,013
Espansione Improvvisa		
τ	2,549	1,156
τ 5%	1,062	0,824
τ 95%	4,018	1,566
P	0,907	0,085

Storia del popolamento appenninico di *apollo* e *mnemosyne*

Benché attraverso i nostri dati non sia possibile definire con certezza quale sia stata la direzione degli eventi di colonizzazione che hanno portato al popolamento dell'Appennino da parte delle due specie di *Parnassius*, alcuni risultati sono emersi con grande chiarezza. Innanzi tutto, sia *P. apollo* che *P. mnemosyne* presentano tracce genetiche di una espansione demografica e spaziale relativamente recente che ha coinvolto la catena alpina e la penisola italiana. In secondo luogo, mentre il pattern filogeografico osservato in *P. apollo* implica la sua presenza sugli Appennini durante le ultime fasi glaciali (testimoniata dal tempo di coalescenza delle sequenze appenniniche dell'aplogruppo *Ia* ma anche e soprattutto dalla presenza dell'aplotipo *Ila.1*), nessuna evidenza di un popolamento pleistocenico in Italia centrale è osservabile nei dati riguardanti *P. mnemosyne*. La nostra analisi mostra che la distribuzione della variabilità mitocondriale nell'ultima specie è del tutto coerente con una sua completa estinzione nell'Appennino centrale durante il Würm e una colonizzazione a partire da rifugi nelle Alpi occidentali dopo l'ultimo massimo glaciale. Né la datazione stimata dell'espansione demografica (5.500-10.500 anni fa), né la finestra temporale secondo l'ipotesi di colonizzazione a partire dalle Alpi (7.500-44.300 anni fa), né il tempo di separazione ottenuto applicando il modello di Isolamento con Migrazione (1.500-15.500 anni fa) implicano la presenza di *mnemosyne* nella regione prima della fine dell'ultimo glaciale.

Nel complesso, i nostri dati appaiono invece del tutto coerenti con uno scenario in cui le due specie hanno seguito percorsi di espansione simili in tempi ravvicinati ma climaticamente contrastanti. Le date stimate per l'espansione demografica e la colonizzazione dell'Appennino in *apollo* coincidono perfettamente con la fase freddo-arida corrispondente all'ultimo massimo glaciale. Al contrario, dopo la fine dell'ultimo periodo glaciale, quando i dati genetici mostrano che *mnemosyne* attraversava una fase di espansione demografica, il modello Isolamento con Migrazione suggerisce che le popolazioni di *apollo* sulle Alpi e sugli Appennini si trovavano ormai isolate sulle rispettive catene montuose.

I nostri risultati evidenziano il potenziale dello studio analitico delle sequenze di DNA nel rivelare come la distribuzione delle specie e delle associazioni faunistiche sia stata modellata da cambiamenti climatici avvenuti in tempi relativamente brevi. D'altra parte, mostrando le influenze opposte della transizione tra fasi glaciali e interglaciali su *P. apollo*, specie più xerofila e *P. mnemosyne*, specie mesofila, i nostri dati mostrano un perfetto accordo con le abbondanti evidenze palinologiche (Allen et al., 2000; Magri et al., 1999) che indicando che durante l'ultimo glaciale l'Italia centro-meridionale era caratterizzata da una predominanza di ambienti aridi con una vegetazione steppica (Fig. 3). Sotto questo aspetto, i pochi dati disponibili sul sud della

Calabria (Aspromonte) possono risultare interessanti. In questa regione, contrariamente a quanto si osserva in Italia centrale, le popolazioni di *P. mnemosyne* sono geneticamente molto distinte, e tale risultato è in accordo con recenti studi genetici su specie mesofile (Canestrelli et al., 2007) che implicano la persistenza di rifugi forestali in Calabria durante l'ultima glaciazione. Al contrario, le sequenze di *P. apollo* dell'Aspromonte sono molto simili a quelle alpine, e appartengono allo stessa linea mitocondriale *Ia*, la cui espansione è datata durante l'ultimo massimo glaciale. Ciò indica che *apollo* deve aver approfittato della fase fredda e arida per colonizzare queste estreme regioni meridionali. D'altra parte la presenza nelle Madonie in Sicilia di aplotipi ben differenziati suggerisce che *P. apollo* abbia colonizzato l'isola, e dunque la Calabria, in tempi ben più antichi. Se un campionamento più esteso confermerà che tutte le sequenze calabresi hanno una recente origine dalle Alpi, ciò porterebbe a concludere che la specie si estinse completamente in questa regione durante uno dei passati periodi interglaciali, proprio come potrebbe avvenire durante l'attuale fase climatica.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Maciej Konopinski dell'Istituto per la Conservazione della Natura di Cracovia per aver gentilmente messo a disposizione alcune sequenze di *Parnassius mnemosyne* utilizzate in questo lavoro e Donatella Cesaroni dell'Università di Roma Tor Vergata per aver partecipato all'analisi dei risultati. La ricerca è stata finanziata con i fondi di ricerca d'Ateneo dell'Università di Roma Tor Vergata (V. Sbordoni). Valentina Todisco ha fruito di una borsa di studio erogata tramite l'Osservatorio della Biodiversità del Lazio (Accordo di Programma Regione Lazio-Università di Tor Vergata).

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN J.R.M., WATTS W.A., HUNTLEY B. 2000 - Weichselian palynostratigraphy, palaeovegetation and palaeoenvironment: the record from Lago Grande di Monticchio, southern Italy. *Quat. Int.*, **73**: 91-110.
- AVISE J.C., ARNOLD J., BALL R.M., BERMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J. E., REEB C.A., SAUNDERS N.C. 1987 - Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **18**: 489-522.
- BANDELT H.J., FORSTER P., ROHL A. 1999 - Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, **16**: 37-48.
- BERGSTRÖM A. 2005 - Oviposition site preferences of the threatened butterfly *Parnassius mnemosyne*-implications for conservation. *J. Insect Conserv.*, **9**: 21-27.
- BROWER A.V.Z. 1994 - Rapid Morphological Radiation and Convergence among Races of the Butterfly *Heliconius erato* inferred from Patterns of Mitochondrial DNA Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 6491-6495.
- CANESTRELLI D., CIMMARUTA R., NASCETTI G. 2007 - Phylogeography and historical demography of the Italian treefrog, *Hyla intermedia*, reveals multiple refugia, population expansions and secondary contacts within peninsular Italy. *Mol. Ecol.*, **16**: 4808-4821.
- DECHAINE E.G., MARTIN A.P. 2004 - Historic cycles of expansion and contraction in *Parnassius smintheus* (Papilionidae) inferred using mitochondrial DNA. *Evolution*, **58**: 113-127.

- DECHAINE E.G., MARTIN A.P. 2005 - Historical biogeography of two alpine butterflies in the Rocky Mountains: broad-scale concordance and local-scale discordance. *J. Biogeogr.*, **32**: 1943-1956.
- DEFFONTAINE V., LIBOIS R., KOTLIK P., SOMMER R., NIEBERDING C., PARADIS E., SEARLE J.B., MICHAUX J.R. 2005 - Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Mol. Ecol.*, **14**: 1727-1739.
- DRUMMOND A.J., NICHOLLS G.K., RODRIGO A.G., SOLOMON W. 2002 - Estimating Mutation Parameters, Population History and Genealogy Simultaneously From Temporally Spaced Sequence Data. *Genetics*, **161**: 1307-1320.
- DRUMMOND A.J., RAMBAUT A., SHAPIRO B., PYBUS O.G. 2005 - Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Mol. Biol. Evol.*, **22**: 1185-1192.
- DRUMMOND A.J., RAMBAUT A. 2007 - BEAST: Bayesian evolutionary analysis sampling trees. *BMC Evol. Biol.*, **7**: 214.
- EPICA COMMUNITY MEMBERS 2004 - Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature*, **429**: 623-628.
- EXCOFFIER L., LAVAL G., SCHNEIDER S. 2005 - Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online*, **1**: 47-50.
- FU Y.-X. 1997 - Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, **147**: 915-925.
- GRATTON P. 2006 - Phylogeography and conservation genetics of *Parnassius mnemosyne* L., 1758 (Lepidoptera, Papilionidae). Tesi di Dottorato, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".
- HASEGAWA M., KISHINO H., YANO T. 1985 - Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, **22**: 160-74.
- HEWITT G.M. 1996 - Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, **58**: 247-276.
- HEWITT G.M. 2000 - The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**: 907-913.
- HEY J., NIELSEN R. 2004 - Multilocus Methods for Estimating Population Sizes, Migration Rates and Divergence Time, with Applications to the Divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, **167**: 747-760.
- HEY J. 2005 - On the Number of New World Founders: A Population Genetic Portrait of the Peopling of the Americas. *PLoS Biol.*, **3**: e193.
- HO S.Y.W., PHILLIPS M.J., COOPER A., DRUMMOND A.J. 2005 - Time Dependency of Molecular Rate Estimates and Systematic Overestimation of Recent Divergence Times. *Mol. Biol. Evol.*, **22**: 1561-1568.
- HO S.Y.W., LARSON G. 2006 - Molecular clocks: when times are a-changin'. *Trends Genet.*, **22**: 79-83.
- KONOPINSKI M.K. 2007 - A set of primers conserved in genus *Parnassius* (Lepidoptera, Papilionidae) for amplification and sequencing of 1016bp fragment of cytochrome oxidase subunit I from museum specimens. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.02045.x. *Mol. Ecol. Notes*.
- KONVICKA M., KURAS T. 1999 - Population structure, behaviour and selection of oviposition sites of an endangered butterfly, *Parnassius mnemosyne*, in Litovelské Pomoraví, Czech Republic. *J. Insect Conserv.*, **3**: 211-223.
- MAGRI D. 1999 - Late Quaternary vegetation history at Lagaccione near Lago di Bolsena (central Italy). *Rev. Palaeobot. Palynol.*, **106**: 171-208.
- NAKONIECZNY M., KEDZIORSKI A. 2005 - Feeding preferences of the Apollo butterfly (*Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*) larvae inhabiting the Pieniny Mts (southern Poland). *C. R. Biol.*, **328**: 235-242.
- NIELSEN R., WAKELEY J. 2001 - Distinguishing Migration from isolation a Markov Chain Monte Carlo Approach. *Genetics*, **158**: 885-896.
- ROZAS J., SANCHEZ-DELBARRIO J.C., MESSEGUER X., ROZAS R. 2003 - DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**: 2496-2497.
- RUFFO S., STOCH F. (eds.) 2005 - Checklist e distribuzione della fauna italiana. *Mem. Mus. Civ. Stor. Nat. Verona* (2. Ser.), Sez. Sci. Vita, **16**.
- SCHMITT T. 2007 - Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Front. Zool.*, **4**: 11.
- SCHNEIDER S., EXCOFFIER L. 1999 - Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**: 1079-1089.
- TABERLET P., FUMAGALLI L., WUST-SAUCY A.G., COSSON J.F. 1998 - Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.*, **7**: 453-464.
- TAJIMA F. 1989 - Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, **123**: 585-595.