

Strutturazione genetica e filogeografia di specie del genere *Mylabris* (Coleoptera, Meloidae) negli Appennini Centrali

VALERIO KETMAIER, MARINA COBOLLI*, MARCO A. BOLOGNA**

Unit of Evolutionary Biology/Systematic Zoology, Institute of Biochemistry and Biology,
University of Potsdam, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam (Germany);
e-mail: ketmaier@rz.uni-potsdam.de

*Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università di Roma "La Sapienza",
viale dell'Università 32, 00185 Roma (Italy); e-mail: marina.cobolli@uniroma1.it

**Dipartimento di Biologia Ambientale, Università "Roma Tre",
viale G. Marconi 446, 00146 Roma (Italy); e-mail: bologna@uniroma3.it

Key words: *Mylabris*, Meloidae, phylogeography, genetics, mitochondrial DNA, genetic divergence, paleogeographic events

SUMMARY

In this study we have used sequence polymorphisms of a fragment of the mitochondrial DNA region encoding for the Cytochrome Oxidase I gene (COI; 637 base pairs) to analyze intra- and inter-specific genetic variability and divergence in three species of the blister beetle genus *Mylabris* (*M. flexuosa*, *M. pusilla*, *M. variabilis*). Samplings have been conducted in the Central Apennines and included three main mountain massifs (Velino-Sirente, Gran Sasso and Majella). The study includes nine populations for a total of 125 individuals sequenced. These 125 sequences defined a total of 16 unique haplotypes (3 for *M. flexuosa*; 11 for *M. pusilla* and 2 for *M. variabilis*). Genetic data and phylogenetic analyses confirmed the previous placement (based on morphology as well as mitochondrial and nuclear genes of *M. flexuosa* and *M. pusilla* in a different subgenus (*Micrabris*) from *M. variabilis* (subgenus *Mylabris*). Intra-specific genetic divergence is lower in *M. variabilis* and *M. flexuosa* ($0.1-0.2 \pm 0.09\%$) than in *M. pusilla* ($1.3 \pm 0.8\%$). Results of multiple mismatch analyses suggest that *M. flexuosa* experienced a sudden demographic expansion during the last Quaternary glacial maxima while *M. pusilla* did not. Such a different pattern in the past demography of the two species can be explained in light of differences in their ecological requirements.

INTRODUZIONE

Mylabris Fabricius, 1775, è un genere paleartico, con marginale presenza anche in aree limitrofe della Regione Orientale e include circa 160 specie (Bologna, in stampa). Fa parte della numerosa tribù Mylabrini (sensu Bologna & Pinto, 2001), esclusiva del Vecchio Mondo, caratterizzata da ipermetabolia

come nel resto della famiglia, ma con sviluppo larvale, tranne poche eccezioni, ai danni delle ooteche di ortotteri celiferi. Le relazioni filogenetiche nell'ambito della tribù sono state evidenziate in base a caratteri morfologici (Bologna, 1991), ma anche molecolari (Bologna et al., 2005), che hanno confermato la validità dei generi (e dei sottogeneri di *Mylabris*) analizzati. I Mylabrini, e in particolare *Mylabris*, nelle aree temperate sono tipicamente legati a formazioni aperte, primarie o di derivazione, perlopiù di carattere steppico, ma anche a formazioni desertiche. Nel Bacino Mediterraneo, la Penisola Iberica e quella Anatolica, sono aree a elevata endemicità e diversità specifica; la fauna italiana comprende 9 specie, di cui una sola endemica - *Mylabris obsoleta* (Nowicki, 1871) (Bologna, 1991] - oltre ad altre 9 specie a distribuzione strettamente limtrofa ai confini italiani o la cui presenza è meritevole di conferma.

In particolare, il sottogenere nominale, ad ampia distribuzione paleartica, include ca. 20 specie, perlopiù endemiche di ristrette aree perimediteranee (Bologna, in preparazione). Il sottogenere *Micrabris* Kuzin, 1954, è invece molto ricco in specie (ca. 50), perlopiù endemiche di ristrette aree montane del sistema alpino-himalayano, dalla Catena dell'Atlante e dalla Penisola Iberica, a est fino alla Birmania, o in alcuni casi distribuite anche in aree step-piche planiziali dal Bacino Pannonico alla Mongolia (Bologna, 2008); la validità di alcune di queste specie merita conferma e le relazioni filogenetiche sono del tutto da chiarire.

Negli Appennini centrali sono presenti poche specie del genere *Mylabris*, tre di basse e medie quote [*M. (M.) variabilis* (Pallas, 1781), *M. (Eumylabris) fabricii* Soumacov, 1924, *Mylabris (Micrabris) obsoleta*], e due tipicamente montane, riferibili al sottogenere *Micrabris*, seppur a due gruppi di specie distinti, ed entrambe di elevato interesse biogeografico (*M. (Micrabris) flexuosa* Olivier, 1811 e *M. (Micrabris) pupilla* Olivier, 1811).

Nel presente lavoro sono state analizzate tre specie per le quali sono riportate alcune sintetiche informazioni. (a) *Mylabris (M.) variabilis* è una specie euriecia che, seppur termofila e sostanzialmente distribuita dal livello del mare a 1.000 m slm., ha in Italia popolazioni isolate in condizioni mediomontane più xeriche fino a ca. 1.500 m di quota negli Appennini centrali e a quote ancora maggiori in quelli meridionali, ove può raggiungere 1.900 m slm in Calabria e Sicilia. (b) *M. (Micrabris) flexuosa* è un endemismo sud-europeo occidentale, citato in letteratura come specie ad ampia distribuzione dalla Spagna all'Asia centrale, ma in realtà (Bologna, 1991, 2008) distribuito con popolazioni isolate solo nei Pirenei, nel Massiccio Centrale francese, nei due versanti delle Alpi Occidentali (e nel Vallese), con isolatissime e non confermate popolazioni nel versante meridionale delle Alpi Centro-Orientali, popolazioni più continue nei principali massicci degli Appennini Centrali (Monte Cucco ?, Sibillini, Reatini, Laga?, Gran Sasso, Duchessa-Velino-Sirente, Marsicani, Majella-Morrone, Simbruini-Ernici),

nonché con ulteriori popolazioni isolate nel solo Massiccio del Pollino in Italia meridionale. Una popolazione citata nel 1860 dei Monti Peloritani in Sicilia è verosimilmente estinta da molti anni. Si tratta di un elemento stenoecio montano di pascoli primari o secondari di alta quota (di norma tra 1.800-2.450 m slm). La sua distribuzione relitta è legata all'espansione di ecosistemi di prateria fredda a basse quote durante le fasi ipotermiche del Quaternario legate alle glaciazioni e alle successive riduzioni distributive in aree fredde cacuminali sui principali sistemi montani sudeuropei occidentali durante gli interglaciali più caldi. (c) *M. (Micrabris) pusilla*, è distribuita con probabile continuità nelle pianure dall'Ukraina a est fino al Kyrghizstan, con probabile maggiore discontinuità nel Caucaso, Transcaucasia e Turchia orientale, con popolazioni isolate nei Rodopi bulgari, in Grecia settentrionale, Albania, Montenegro, Bosnia-Herzegovina, nel Velebit croato e infine negli stessi massicci degli Appennini centrali già ricordati per *M. flexuosa*. Le popolazioni dinariche e appenniniche sono state descritte come sottospecie ([rispettivamente ssp. *bosnica* (Reitter, 1903) e ssp. *latialis* Magistretti, 1943]. In Europa meridionale è un elemento stenoecio di formazioni steppiche continentali medio-montane: negli Appennini è distribuito di norma tra 1.400 e 1.900 m slm, con poche popolazioni a quote appena inferiori. Anche la distribuzione di questa specie è determinata dai ripetuti fenomeni glaciali quaternari, durante i quali, nelle fasi fredde, le formazioni steppiche si sono ampiamente diffuse dalle aree sudeuropee orientali ai Balcani e fino alla Penisola Italiana attraverso le connessioni transadriatiche dovute agli eustatismi marini; questo ampio areale si è poi frammentato e ridotto nelle ripetute fasi interglaciali termofile in alcune aree medio-montane con caratteristiche ecologiche steppiche continentali.

La presenza di due elementi filogeneticamente correlati del sottogenere *Micrabris*, con subareale appenninico simile, ma distinti per la ripartizione altitudinale, la cui distribuzione sembra correlata agli stessi eventi paleoecologici, alcuni anni orsono ci aveva indotto (Bologna et al., 1988) a un primo tentativo di analisi, attraverso marcatori allozimici, della distanza genetica tra gruppi di popolazioni e di datazione degli eventi di separazione tra le popolazioni. In quel contesto furono studiate una popolazione pirenaica, una delle Alpi Marittime e alcune centro-appenniniche di *M. flexuosa*, alcune popolazioni appenniniche di *M. pusilla*, utilizzando come modello di confronto popolazioni appenniniche di *M. variabilis*. Le distanze genetiche riscontrate avevano consentito di proporre valutazioni sui periodi di isolamento delle popolazioni di entrambe le specie di *Micrabris* che trovavano una chiara rispondenza rispettivamente con picchi glaciali (*M. flexuosa*) e picchi interglaciali (*M. pusilla*). A distanza di anni abbiamo ritenuto significativo studiare la problematica biogeografia inerente le popolazioni appenniniche di queste due specie, analizzando per confronto la stessa specie modello della prima ricerca, ma utilizzando marcatori molecolari quali sequenze di DNA.

Lo scopo del presente lavoro è quindi di analizzare i polimorfismi di sequenza del gene del DNA mitocondriale (mtDNA) codificante per la Citocromo Ossidasi I (COI) in popolazioni delle stesse tre specie di *Mylabris* (*M. flexuosa*, *M. pusilla* e *M. variabilis*) campionate nella medesima area geografica degli Appennini Centrali. I dati verranno quindi utilizzati per verificare: (a) quanto già emerso su base allozimica rispetto al differenziamento fra i sottogeneri *Mylabris* e *Micrabris*; (b) se a differenze nell'ecologia delle specie di *Micrabris* corrispondano differenze anche nei rispettivi pattern di strutturazione genetica; (c) tentare un'interpretazione in chiave storica, tramite orologi molecolari, del popolamento delle specie di *Mylabris* dei massicci montuosi degli Appennini Centrali presi in considerazione.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Gli esemplari utilizzati per lo studio sono stati raccolti manualmente o con retini da sfalcio e conservati in EtOH 96% fino al momento dell'estrazione del DNA. In Tab. I sono riportati i dettagli sulle località di campionamento e sul numero di individui analizzati per ciascuna popolazione inclusa nello studio. La localizzazione geografica delle località di campionamento è mostrata in Fig. 1. Il campionamento ha interessato tre massicci montuosi centro-appenninici, Gran Sasso, Velino-Sirente e Majella, e ha compreso nove popolazioni, tre di *M. flexuosa*, quattro di *M. pusilla* e due di *M. variabilis*, per un totale di 125 individui.

Tab. I - Specie campionate, località di raccolta, numero di esemplari (N) e codice identificativo delle popolazioni studiate. Per ciascuna località è anche riportato il massiccio montuoso di appartenenza. Le località di campionamento sono mostrate in Fig. 1

Specie	Località	Massiccio montuoso	N	Codice
<i>M. (Micrabris) flexuosa</i>	Vado di Pezza	Sirente-Velino	15	MFP
	Block Haus	Majella	21	MFB
	Majelletta	Majella	21	MFM
<i>M. (Micrabris) pusilla</i>	Fonte Cerreto	Gran Sasso	20	MPC
	Vado di Pezza	Sirente-Velino	4	MPP
	Prati del Sirente	Sirente-Velino	22	MPS
	Santo Spirito	Majella	20	MPSS
<i>M. (Mylabris) variabilis</i>	Fonte Cerreto	Gran Sasso	1	MVC
	Prati del Sirente	Sirente-Velino	1	MVS

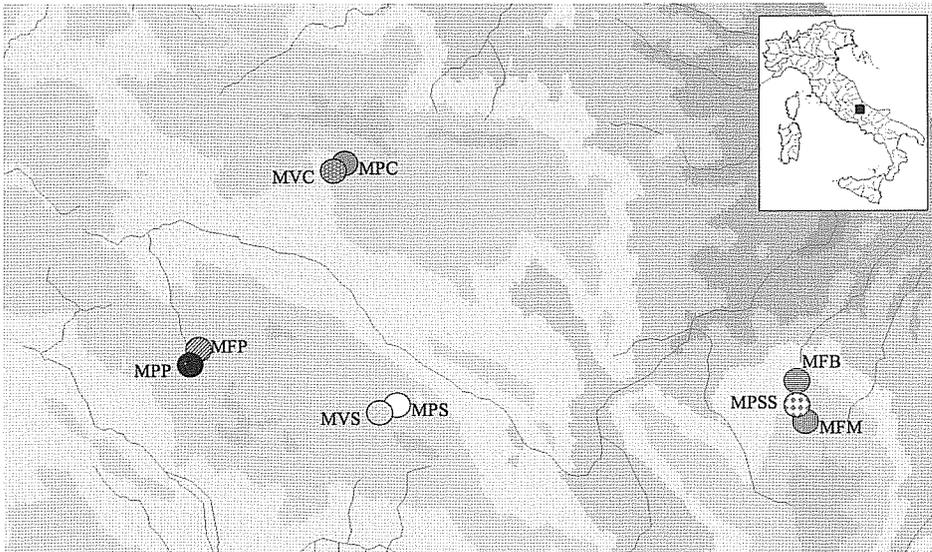


Fig. 1 - Località di raccolta delle popolazioni e specie incluse nello studio. La corrispondenza fra le sigle utilizzate e le località di raccolta è riportata in Tab. I

Estrazione del DNA, amplificazione e sequenziamento del gene Citocromo Ossidasi I (COI)

Il DNA genomico totale è stato estratto da ciascun individuo utilizzando parte del capo mediante il DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice del kit. Del DNA così ottenuto, 1 μ l (corrispondente a circa 100 ng) è stato quindi utilizzato come template nelle successive reazioni d'amplificazione tramite Polymerase Chain Reaction (PCR) di un frammento di circa 650 paia di basi (bp) del gene del DNA mitocondriale (mtDNA) codificante per la Citocromo Ossidasi subunità I (COI). Per l'amplificazione del gene COI sono stati utilizzati i primer riportati in Folmer et al. (1994). Ciascuna reazione di PCR è stata condotta in una soluzione di 50 μ l contenente 1mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM KCl; 0,15 mM MgCl₂; 0,2 mM di ciascun dNTP, 10 μ M di ciascun primer e 1 U di Taq polimerasi (Qbiogene). Il ciclo d'amplificazione ha previsto una prima fase di denaturazione a 94 °C per 2' seguita da 5 cicli ciascuno comprendente una fase di denaturazione a 94 °C per 1' annealing dei primer a 45 °C per 1'30" ed estensione della polimerasi a 72 °C per 1'30". A questi 5 cicli ne sono poi seguiti altri 35 con le medesime condizioni ma con una temperatura di annealing portata a 50 °C. Al termine dei 40 cicli complessivi è seguita una fase finale d'estensione a 72 °C per 6'. L'avvenuta amplificazione è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 1,5%. I prodotti PCR

così ottenuti sono stati quindi purificati mediante QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e sequenziati su di un sequenziatore automatico AB 3100 multicapillary (Applied Biosystems). Per ciascun individuo sono stati sequenziati entrambi gli strand.

Analisi dei dati

I cromatogrammi sono stati controllati e le sequenze allineate utilizzando Sequencher 4.6 (Gene Codes Corporation); l'allineamento è stato poi ulteriormente verificato utilizzando la reading frame aminoacidica del gene. È stato quindi usato PAUP 4.0β10 (Swofford, 2002) per calcolare la variabilità delle sequenze, il numero assoluto di transizioni (Ti) e transversioni (Tv) e per effettuare un test del χ^2 per verificare l'omogeneità nelle frequenze delle quattro basi. Questi calcoli sono stati eseguiti su tutte le posizioni simultaneamente e considerando prima, seconda e terza posizione di ciascun codone singolarmente. ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al., 2006) è stato utilizzato per calcolare il numero totale di aplotipi (H) e la loro frequenza nelle singole popolazioni; il medesimo programma è stato anche impiegato per il calcolo dei seguenti indici di diversità genetica: diversità aplotipica (h), numero medio di differenze fra tutte le coppie di aplotipi (π) e diversità nucleotidica (π_n).

L'allineamento è stato quindi sottoposto ad analisi filogenetiche mediante Massima Parsimonia (MP; Farris, 1970) Neighbor-Joining (NJ; Saitou e Nei, 1987) e analisi Bayesiana (Rannala e Yang, 1996; Mau e Newton, 1997; Larget e Simon, 1999; Mau et al., 1999; Huelsenbeck, 2000). Come outgroup nelle analisi filogenetiche è stato utilizzato un esemplare di *Hycleus jucundus*, appartenente alla medesima tribù (Mylabrini) cui appartiene il genere *Mylabris*. Mediante il programma MODELTEST 3.06 (Posada e Crandall, 1998) si è verificato il modello evolutivo che meglio si adattava al nostro set di dati. Il modello evolutivo prescelto (HKY+ Γ ; Hasegawa et al., 1985; shape parameter $\alpha = 0,560$) è stato quindi applicato nel calcolo delle distanze genetiche (D_{HKY+}) per la costruzione dell'albero NJ e per l'analisi Bayesiana. La robustezza statistica delle ipotesi filogenetiche generate mediante MP e NJ è stata verificata mediante 1.000 repliche bootstrap (Felsenstein, 1985) in PAUP. L'analisi Bayesiana è stata condotta per due milioni di generazioni (quattro Markov chains; una "cold" e tre "heated") utilizzando MrBAYES 3.04 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Gli alberi sono stati salvati ogni 100 generazioni per un totale di 20.000 alberi. Il valore di likelihood di ciascun albero è stato quindi plottato contro il numero di generazioni per verificarne la convergenza verso un valore stazionario. Gli alberi con un valore likelihood superiore a quello individuato come stazionario (circa il primo 10% del totale) sono stati quindi scar-

tati come “burn-in”. Sulla base dei rimanenti 18.000 alberi è stato quindi costruito un 50% majority rule consensus tree con PAUP.

Le relazioni fra gli aplotipi all'interno di ciascuna specie sono stati ricostruiti mediante una network analysis utilizzando il programma TCS (Clemente et al., 2000), che si basa sull'approccio della parsimonia statistica proposto da Templeton et al. (1992). Per questa analisi è stato scelto un criterio restrittivo (99%).

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier et al., 1992) è stata applicata per capire in che percentuale l'eterogeneità genetica inter-specifica sia spiegabile in termini di differenze fra popolazioni piuttosto che al loro interno. Per ciascuna specie il livello di differenziamento fra popolazioni è stato inoltre stimato mediante il calcolo degli *Fst* per coppie di popolazioni; la significatività statistica dei valori di *Fst* è stata valutata mediante 1.000 permutazioni, come implementato in ARLEQUIN. Questo programma è stato anche utilizzato per verificare la presenza o meno di pregressi eventi di espansione rapida nella demografia delle specie in studio (mismatch analysis; Schneider e Excoffier, 1999). È stato calcolato l'indice di *raggedness* di Harpending (1994) che assume un modello di espansione rapida. La differenza nella deviazione della somma dei quadrati (SSD) fra i valori di distribuzione dei mismatch osservati e attesi è stata usata come test statistico (*PSSD*) per verificare la significatività del modello proposto. È importante sottolineare che in questo caso l'ipotesi nulla è che le popolazioni abbiano sperimentato una fase di espansione demografica rapida nel passato; di conseguenza quest'ultima ipotesi dovrà essere scartata per valori di *PSSD* < 0,05. L'analisi è stata condotta, per *M. pusilla* e *M. flexuosa*, su ciascuna popolazione singolarmente, su tutte le popolazioni insieme e considerando raggruppamenti di aplotipi suggeriti dalle analisi filogenetiche. Per questa analisi è stato calcolato il parametro τ (moment estimator of time to the expansion); questo parametro può essere inserito nell'equazione $\tau = 2 \mu t$, ove μ è il tasso di mutazione per il gene in studio, per ricavare t (tempo dalla più recente espansione, in generazioni). Conoscendo il tasso di mutazione μ (assunto essere pari a 1.3% per milione di anni nel caso dei coleotteri; Caccone e Sbordoni, 2001) e il numero di generazioni per anno (1, nel nostro caso) è possibile calcolare il tempo in anni intercorso dall'ultima consistente espansione demografica delle popolazioni.

RISULTATI

Variabilità delle sequenze

Per ciascun individuo incluso nello studio è stato sequenziato un frammento di 637 paia di basi (bp) del mtDNA codificante per il gene COI (entrambi gli strand), per un totale di oltre 160 kb. Non vi sono delezioni/inserzioni nel-

l'allineamento finale utilizzato per le analisi filogenetiche; tutte le differenze evidenziate sono dovute a transizioni o a transversioni. In linea con quanto noto per il mtDNA, la maggior parte della variabilità è nella terza posizione dei codoni (oltre il 91% dei siti è variabile e di questi il 35,3% è informativo per la parsimonia), mentre le seconde posizioni sono le meno variabili (21,6% di siti variabili; 0,9% di siti informativi per la parsimonia). La variabilità complessiva, considerando tutte e tre le posizioni dei codoni simultaneamente, è pari al 48,1% dei siti (13,8% sono i siti informativi per la parsimonia). Le terze posizioni sono anche caratterizzate dal più alto bias in favore delle adenine e timine (la frequenza combinata di queste due basi nucleotidiche è superiore al 69%) e a sfavore delle guanine (9,3%). Il test del χ^2 per l'omogeneità delle frequenze delle quattro basi nucleotidiche non ha evidenziato differenze significative fra esse nei diversi taxa inclusi nello studio (P sempre maggiore di 0,5).

Le sequenze ottenute per questo studio definiscono, per il genere *Mylabris*, un totale di 16 aplotipi: 3 in *M. flexuosa*, 11 in *M. pusilla*, 2 in *M. variabilis*. In Tab. II è riportata la frequenza assoluta di questi aplotipi nelle nove popolazioni analizzate. Le tre specie non condividono nessun aplotipo. All'interno di *M. flexuosa* l'aplotipo 1 è di gran lunga il più comune ed è presente in uguale frequenza nelle tre popolazioni; MFM e MFP posseggono inoltre un aplotipo unico ciascuna. Diversa la situazione in *M. pusilla*: l'aplotipo 7 è l'unico a essere condiviso fra le quattro popolazioni campionate, mentre i rimanenti 10 aplotipi sono tutti esclusivi di singole popolazioni, sebbene la loro frequenza possa variare. Queste differenze fra le due specie sono evidenti anche nelle stime di variabilità genetica riportate in Tab. III. La diversità aplotipica h varia tra $0,095 \pm 0,081$ e $0,133 \pm 0,112$ in *M. flexuosa* e tra $0,100 \pm 0,088$ e $0,705 \pm 0,069$ in *M. pusilla*; ancora più marcate sono le differenze fra le due specie in termini di π ($0,133 \pm 0,172/0,209$ in *M. flexuosa*; $1,400 \pm 0,895-5,600 \pm 3,234$ in *M. pusilla*).

Tab. II - Frequenza degli aplotipi nelle popolazioni e specie di *Mylabris* sequenziate per lo studio. La corrispondenza fra i codici delle popolazioni e le località di raccolta è riportata in Tab. II

Popolazioni	Aplotipi															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
MFP	14	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFB	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFM	20	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPC	-	-	-	8	1	1	8	1	1	-	-	-	-	-	-	-
MPP	-	-	-	-	-	-	4	-	-	1	-	-	-	-	-	-
MPS	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	13	1	2	-	-	-
MPSS	-	-	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	1	-	-
MVC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
MVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Tab. III - Stime di diversità genetica nelle nove popolazioni di *Mylabris* incluse nello studio. Per ciascuna popolazione è riportato il numero di esemplari sequenziati (N), il numero di aplotipi identificati (H), la diversità aplotipica (b), il numero medio di differenze per coppie di aplotipi (π) e la diversità nucleotidica (π_n)

Popolazioni	N	H	b	π	π_n
MFP	15	2	0,133 ± 0,112	0,133 ± 0,209	0,0003 ± 0,003
MFB	21	1	–	–	–
MFM	21	2	0,095 ± 0,081	0,133 ± 0,172	0,0001 ± 0,003
MPC	20	6	0,705 ± 0,069	4,400 ± 2,260	0,006 ± 0,003
MPP	4	2	0,400 ± 0,237	5,600 ± 3,234	0,008? 0,005
MPS	22	4	0,593 ± 0,088	3,216 ± 1,725	0,005? 0,003
MPSS	20	2	0,100 ± 0,088	1,400 ± 0,895	0,002 ± 0,001
MVC	1	1	–	–	–
MVS	1	1	–	–	–

Divergenza genetica, filogeografia e struttura di popolazione

In Tab. IV è mostrata la matrice di distanze genetiche per coppie di aplotipi calcolate applicando il modello HKY + Γ (Hasegawa et al., 1985; shape parameter $\alpha = 0,560$) selezionato tramite MODELTEST. Nella medesima tabella è

Tab. IV - Differenziamento genetico fra le popolazioni e specie incluse nello studio. Sotto la diagonale sono riportati i valori di distanza genetica per tutte le coppie di aplotipi; il modello evolutivo utilizzato per il calcolo delle distanze è HKY + Γ (Hasegawa et al., 1985; shape parameter $\alpha = 0,560$; modello selezionato con MODELTEST). Sopra la diagonale è riportato il numero assoluto di transizioni e transversioni

		<i>M. flexuosa</i>						<i>M. pusilla</i>						<i>M. variabilis</i>			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>H. juncundus</i>	–	64/94	65/94	65/94	69/96	71/94	71/95	68/96	68/96	70/95	69/95	68/96	68/95	69/95	69/95	84/110	85/110
1	0,471	–	1/0	1/0	19/4	22/2	20/3	18/4	18/4	18/3	16/3	18/5	17/3	17/4	18/3	50/27	51/27
2	0,477	0,001	–	2/0	20/4	23/2	21/3	19/4	19/4	19/3	17/3	19/5	18/3	18/4	19/3	51/27	52/27
3	0,477	0,001	0,003	–	20/4	21/2	19/3	19/4	19/4	17/3	15/3	19/5	18/3	16/4	17/3	49/27	50/27
4	0,512	0,039	0,041	0,041	–	6/2	10/3	1/0	10/2	12/3	12/3	1/1	2/1	13/4	12/3	48/27	49/27
5	0,514	0,041	0,043	0,039	0,012	–	6/1	5/2	8/2	8/1	10/1	5/3	6/1	9/2	8/1	42/25	43/25
6	0,519	0,039	0,041	0,037	0,021	0,011	–	9/3	4/1	2/0	4/0	9/4	10/2	3/1	2/0	46/26	46/26
7	0,506	0,037	0,039	0,039	0,001	0,011	0,019	–	9/2	11/3	11/3	0/1	1/1	12/4	11/3	47/27	48/27
8	0,506	0,037	0,039	0,039	0,019	0,016	0,008	0,018	–	2/1	4/1	9/3	10/3	3/2	4/1	49/27	49/27
9	0,513	0,035	0,037	0,034	0,024	0,014	0,003	0,023	0,004	–	2/0	11/4	12/2	1/1	2/0	47/26	47/26
10	0,507	0,032	0,034	0,031	0,024	0,018	0,006	0,023	0,008	0,003	–	11/4	12/2	1/1	2/0	49/26	49/26
11	0,505	0,039	0,041	0,041	0,003	0,012	0,021	0,001	0,019	0,024	0,024	–	1/2	12/3	11/4	47/28	48/28
12	0,500	0,034	0,035	0,035	0,004	0,011	0,019	0,003	0,021	0,023	0,023	0,004	–	13/3	12/2	46/26	47/26
13	0,507	0,035	0,037	0,033	0,028	0,018	0,006	0,026	0,007	0,003	0,003	0,024	0,026	–	1/1	48/27	48/27
14	0,507	0,035	0,037	0,034	0,024	0,014	0,003	0,026	0,008	0,003	0,003	0,024	0,023	0,003	–	48/26	48/26
15	0,714	0,161	0,164	0,158	0,155	0,134	0,147	0,152	0,158	0,150	0,156	0,155	0,147	0,155	0,153	–	1/0
16	0,723	0,164	0,167	0,161	0,158	0,136	0,147	0,155	0,158	0,150	0,156	0,158	0,150	0,155	0,153	0,001	–

inoltre riportato il numero di transizioni e trasversioni osservate per i medesimi confronti a coppie. Le transizioni variano da 1 a 85; le trasversioni sono comprese tra 0 e 110. Il numero più alto di sostituzioni, indipendentemente dalla loro natura, si osserva sempre nei confronti fra l'outgroup e l'ingroup. È possibile identificare tre livelli di divergenza genetica intra-specifica. Un primo livello corrisponde ai confronti fra i due generi (*Hycleus* vs *Mylabris*; $D_{\text{HKY}+\Gamma_{\text{media}}} = 0,528 \pm 0,075$), un secondo livello riguarda il confronto fra *M. variabilis* e *M. pusilla flexuosa* ($D_{\text{HKY}+\Gamma_{\text{media}}} = 0,151 \pm 0,006$ e $0,162 \pm 0,003$, rispettivamente). È possibile riconoscere infine un terzo livello per il confronto tra *M. pusilla* e *M. flexuosa* ($D_{\text{HKY}+\Gamma_{\text{media}}} = 0,037 \pm 0,003$). A livello inter-specifico il differenziamento è risultato modesto in *M. variabilis* ($D_{\text{HKY}+\Gamma_{\text{media}}} = 0,001$; ma sono state analizzate solo due popolazioni e un individuo ciascuna) e in *M. flexuosa* ($D_{\text{HKY}+\Gamma_{\text{media}}} = 0,001 \pm 0,001$), decisamente più elevato in *M. pusilla* ($D_{\text{HKY}+\Gamma_{\text{media}}} = 0,013 \pm 0,008$).

Quanto sopra riportato è evidente nell'albero Bayesiano di Fig. 2, che riassume anche le altre analisi filogenetiche condotte (MP e NJ). Le varie popolazioni e specie di *Mylabris* formano un clade monofiletico al cui interno *M. variabilis* occupa la posizione basale, mentre *M. pusilla* e *M. flexuosa* sono fra loro più affini. Gli aplotipi delle tre specie si raggruppano in tre cladi monofiletici i cui nodi sono risultati estremamente robusti in tutte le analisi filogenetiche. Nel clade di *M. pusilla* non è facile identificare un chiaro andamento geografico

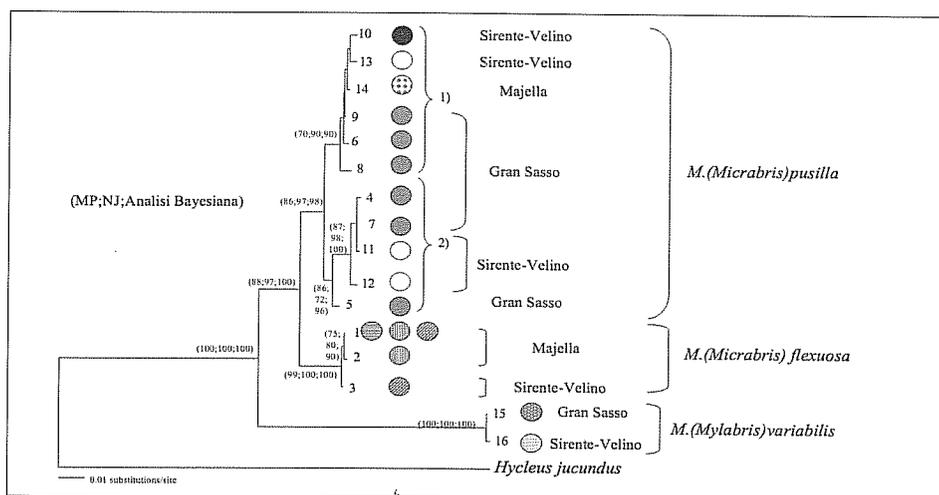


Fig. 2 - Albero filogenetico ottenuto mediante analisi Bayesiana fra tutti gli aplotipi rinvenuti nello studio. I valori ai nodi indicano il supporto statistico per le analisi di MP, NJ e Bayesiana (primo, secondo e terzo valore, rispettivamente). Sono mostrati i valori solo per i nodi con un supporto statistico $\geq 70\%$ per tutti e tre i metodi filogenetici impiegati. I numeri alla fine dei rami indicano i diversi aplotipi e corrispondono a quelli riportati in Tab. II; per *M. pusilla* sono anche indicati due sotto-cluster principali (1 e 2). Per ciascun aplotipo viene infine raffigurata la popolazione (l'ombreggiatura all'interno dei cerchi è come in Fig. 1) e il massiccio montuoso di provenienza

nelle relazioni fra gli aplotipi; vi sono infatti due raggruppamenti principali (sotto-cluster 1 e 2) statisticamente ben supportati, ma non vi è corrispondenza univoca fra questi e l'origine geografica degli aplotipi in essi contenuti.

In Fig. 3 sono rappresentate le relazioni fra gli aplotipi sotto forma di network ottenuti mediante il programma TCS. Questa analisi è stata condotta su *M. flexuosa* e *M. pusilla* separatamente. Mentre la scarsa variabilità genetica riscontrata in *M. flexuosa* non consente di formulare ipotesi sulle relazioni fra i tre aplotipi, in *M. pusilla* è evidente come gli aplotipi più frequenti (7, 11 e 4) siano maggiormente affini fra loro rispetto a quelli a bassa frequenza (5, 6, 8, 9, 10, 12, 13 e 14); sono infatti necessari vari aplotipi mancanti per collegare i primi con i secondi.

La maggiore eterogeneità genetica di *M. pusilla* si evidenzia anche nelle analisi di varianza molecolare (AMOVA) e di Fst. L'AMOVA dimostra infatti che per questa specie il 64.5% della variazione genetica riscontrata è imputabile a differenze all'interno delle singole popolazioni, mentre il rimanente 35.5% è dovuta a differenze fra le popolazioni ($P < 0,05$). I valori di Fst per coppie di popolazioni sono compresi fra 0,081 (MPSS vs MPP) e 0,522 (MPS vs MPSS);

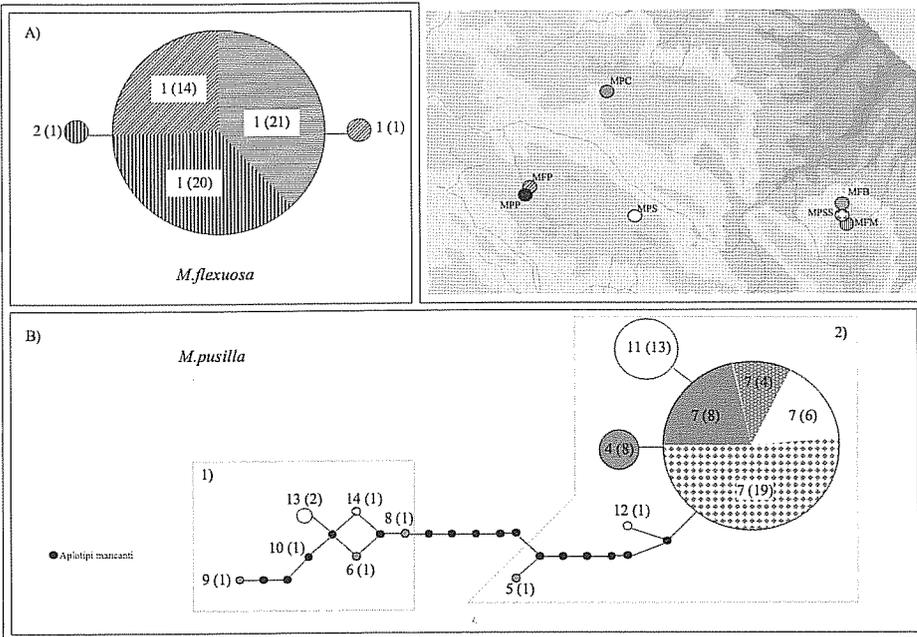


Fig. 3 - Relazioni fra gli aplotipi all'interno di A) *M. flexuosa* e B) *M. pusilla* ricavate mediante parsimonia statistica (Templeton et al., 1992). I numeri all'interno dei cerchi indicano l'aplotipo (primo valore, vedi Tab. II) e il numero di individui che lo portano. La grandezza dei cerchi è proporzionale alla frequenza di quel determinato aplotipo, mentre le diverse ombreggiature ne indicano la provenienza geografica (vedi inserto con cartina geografica). Per *M. pusilla* i due gruppi di aplotipi individuati nell'albero di Fig. 2 sono circondati da una linea tratteggiata

$P < 0,05$); MPSS vs MPP e MPC vs MPP ($F_{st} = 0,136$) sono gli unici confronti per i quali abbiamo F_{st} statisticamente non significativi. Al contrario, in *M. flexuosa* gli F_{st} sono di un ordine di grandezza inferiore rispetto a *M. pusilla* e sempre non significativi ($0,000 < F_{st} < 0,023$).

In Tab. V sono infine riportati i risultati dell'analisi di mismatch distribution. Per *M. flexuosa* i dati sono sempre in accordo con il modello di espansione demografica ($0,330 < P_{SSD} < 0,433$): in *M. pusilla* quest'ultimo è risultato valido per MPC, MPP e MPSS. Da notare però che per queste ultime due popolazioni il valore di P_{SSD} è prossimo alla soglia di non significatività ($0,053 < P_{SSD} < 0,070$).

Gli eventi di espansione sono risultati coevi e databili a circa 180.000 anni fa in *M. flexuosa*; il range di variazione è più ampio in *M. pusilla* (da 180.000 a 690.000 anni fa).

Tab. V - Risultati dell'analisi di mismatch distribution (Schneider e Excoffier, 1999) condotta a vari livelli gerarchici per *M. flexuosa* e *M. pusilla*. N è il numero di individui analizzati, H il numero di aplotipi identificati, τ è definito come "moment estimator of time to the expansion", P_{SSD} è la probabilità che la popolazione in studio abbia subito una rapida espansione demografica nel passato (il modello è accettato per valori di $P_{SSD} > 0,05$). T è il tempo intercorso (in migliaia di anni) dall'ultima espansione demografica identificata dall'analisi di mismatch distribution. T è stato calcolato solo nei casi in cui i dati avallavano un modello d'espansione demografica rapida

Specie/Pop.	N	H	τ	P_{SSD}	T*
<i>M. flexuosa</i>					
MFEM	21	2	3,000	0,330	181,2
MFP	15	2	3,125	0,433	188,7
MFB	21	1	–	–	–
Tutte le popolazioni	57	6	3,000	0,231	181,2
<i>M. pusilla</i>					
MPC	20	6	11,410	0,426	690,0
MPP	5	2	3,00	0,053	181,2
MPS	22	4	0,786	0,012	–
MPSS	20	2	3,000	0,070	181,2
Cluster 1**	7	6	3,026	0,020	–
Cluster 2**	60	11	0,795	0,030	–
Tutte le popolazioni	67	14	0,904	0,001	–
*T = $2 \times \tau$; $\alpha_{\text{tasso di mutazione}} = 1,3\%$ per milione di anni (Caccone & Sbordoni, 2001); 1 generazione/anno.					
** Vedi Figg.2 e 3.					

DISCUSSIONE

Sistematica e filogenesi molecolare

Il gene mitocondriale codificante per la COI è stato caratterizzato in dettaglio per gli insetti (Lunt et al., 1996) ed è stato utilizzato di frequente per risol-

vere problemi a livello popolazionale e/o di specie nei coleotteri (Simon et al., 2006). Essendo uno dei geni mitocondriali codificanti più lunghi, offre il vantaggio di poter analizzare un numero elevato di nucleotidi compresi all'interno di una medesima unità funzionale e quindi, presumibilmente, soggetti ai medesimi vincoli evolutivi. Il frammento da noi sequenziato copre diversi domini del gene, per lo più caratterizzati da tassi evolutivi rapidi (Lunt et al., 1996). I livelli crescenti di divergenza genetica associati ai diversi ranghi tassonomici presi in considerazione nello studio (dall'intra-popolazionale all'intra-generico) avallano quanto era ipotizzabile in base alla letteratura e consentono di proporre questo marcatore come uno strumento valido per indagare fenomeni microevolutivi nei Meloidi.

I dati presentati in questo lavoro contribuiscono quindi ad allargare le conoscenze sulla sistematica e filogenesi molecolare di un gruppo ancora relativamente poco studiato da questo punto di vista, nonostante il suo indubbio interesse biologico (Bologna e Pinto, 2001; Bologna et al., 2005). È evidente che il numero di specie considerate in questo studio è troppo limitato, soprattutto considerando quanto la famiglia sia diversificata (oltre 2500 specie in circa 125 generi), per poter trarre delle conclusioni generali. È possibile però fare almeno due osservazioni, che potranno essere utilizzate come eventuale punto di partenza per studi futuri basati su un campionamento più rappresentativo.

A livello di genere la COI separa nettamente *Hycleus* da *Mylabris* (Tab. IV e Fig. 2). Questo risultato corrobora quanto già ottenuto da Bologna et al. (2005) utilizzando un altro gene mitocondriale (16s rRNA) e uno nucleare (ITS2rDNA: Bologna et al., non pubblicato) e rigetta l'ipotesi avanzata da Kaszab (1969) che, su base morfologica, aveva considerato *Hycleus* e *Mylabris* come appartenenti a un unico genere.

Due delle tre specie di *Mylabris* considerate nello studio (*M. pusilla* e *M. flexuosa*) appartengono al sottogenere *Micrabris*, mentre la terza specie (*M. variabilis*) al sottogenere tipico (Bologna, 1991, 2008). L'attribuzione a due sottogeneri diversi, già evidenziata utilizzando un altro gene mitocondriale (16s rRNA: Bologna et al., 2005), appare evidente anche con la COI: il livello medio di divergenza genetica fra *M. variabilis* e *M. pusilla/flexuosa* è superiore di circa un fattore cinque rispetto al livello di divergenza trovato fra *M. flexuosa* e *M. pusilla*. I nostri dati sono anche altamente congruenti con quelli presentati in un precedente lavoro basato su marcatori allozimici (Bologna et al., 1988). Esiste inoltre una chiara congruenza tra i dati genetico-molecolari (allozimici e di DNA) e quelli morfologici. Infatti i due sottogeneri in oggetto sono ben caratterizzati da sinapomorfie a livello degli adulti e delle larve di I stadio (Bologna, 1991, non pubblicato).

Filogeografia e struttura di popolazione

Il dato più evidente che emerge dallo studio è la differenza in termini di variabilità genetica fra *M. flexuosa* e *M. pusilla*; questo risultato è tanto più interessante se si considera che le popolazioni campionate provengono tutte dalla medesima area geografica. Tali differenze potrebbero essere spiegate chiamando in causa drastiche differenze nelle velocità di accumulo delle sostituzioni nucleotidiche nelle due specie. Questa ipotesi appare però poco probabile; se *M. pusilla* presentasse infatti tassi evolutivi molto più rapidi di *M. flexuosa*, ciò si tradurrebbe, anche graficamente nell'albero riportato in Fig. 2, in una differente lunghezza dei rami nei cladi delle due specie. Ciò non si verifica e, al contrario, i rami che portano ai tre aplotipi identificati in *M. flexuosa* hanno lunghezze comparabili a quelli di *M. pusilla*. I network di Fig. 3 e le stime di variabilità genetica (Tab. III) suggeriscono un'ipotesi alternativa. *M. flexuosa*, alla scala geografica presa in considerazione, è caratterizzata da omogeneità genetica; la maggior parte delle popolazioni condivide infatti il medesimo aplotipo. È interessante comunque notare che i due aplotipi più rari (aplotipi 2 e 3) siano stati rinvenuti nelle due popolazioni più distanti geograficamente, a sottolineare il probabile ruolo giocato dalla distanza spaziale.

Il network ottenuto per *M. pusilla* può essere invece scomposto in due parti principali, che contengono esattamente i medesimi aplotipi che si raggruppano nei sotto-cluster 1 e 2 individuati nell'albero filogenetico di Fig. 2. Le frequenze degli aplotipi in questi due raggruppamenti sono molto differenti; l'aplotipo 7 è di gran lunga il più comune ed è anche l'unico a essere condiviso fra tutte le popolazioni. Questo aplotipo è a sua volta connesso direttamente a due aplotipi con frequenza inferiore e, soprattutto, esclusivi di singole popolazioni (aplotipi 4 e 11). Questa parte del network può essere quindi considerata analoga a quanto riscontrato per *M. flexuosa*. Sono quindi necessari 6 aplotipi mancanti per connettere questa parte del network con l'aplotipo 5, che ha una posizione basale nel sotto-cluster 1 dell'albero filogenetico. Vi sono infine ulteriori 5 aplotipi mancanti prima di arrivare al gruppo di aplotipi che formano il sotto-cluster 2.

Alle differenze nel numero e nelle relazioni fra gli aplotipi delle due specie corrispondono anche differenze per quanto riguarda la demografia delle varie popolazioni. Le analisi di mismatch distribution (Tab. V), che si basano sulla distribuzione delle differenze nucleotidiche per coppie di individui (o aplotipi) (Rogers e Harpending, 1992), dimostrano infatti che la variazione genetica all'interno di *M. flexuosa* è in accordo con un modello di espansione demografica rapida, indipendentemente da come le popolazioni siano raggruppate nell'analisi. Al contrario, in *M. pusilla*, questo modello demografico può essere accettato solo per MPC, MPP E MPSS, mentre è statisticamente respinto

in tutti gli altri casi considerati. È anche importante sottolineare che per MPP e MPSS il valore di P_{SSD} è molto prossimo alla soglia di significatività che porterebbe a rigettare il modello; di conseguenza i risultati di questa analisi per queste due popolazioni devono essere trattati con cautela. Utilizzando la relazione che lega il parametro τ al tempo assoluto intercorso dall'ultima espansione demografica di una determinata popolazione, abbiamo datato questi eventi nelle due specie (Tab. V). Per *M. flexuosa* tutti gli eventi di espansione riscontrati dall'analisi possono essere ricondotti a circa 180.000 anni fa. Per *M. pusilla*, se escludiamo i dati dubbi per le popolazioni MPP e MPSS, il medesimo fenomeno è risultato essere molto più antico e databile a circa 690.000 anni fa. Da notare che queste datazioni non indicano necessariamente l'inizio dell'evoluzione indipendente delle singole popolazioni ma individuano piuttosto il momento in cui le popolazioni si sarebbero espanse numericamente.

Questo dato assume maggiore rilievo se si considera che, sulla base dei valori di distanza genetica riportati in Tab. IV e adottando il tasso di mutazione proposto da Caccone e Sbordoni (2001) per i coleotteri, la separazione fra i sotto-cluster 1 e 2 di *M. pusilla* sarebbe databile a circa 800.000 anni fa, precedente quindi all'espansione demografica riscontrata in MPC. È interessante notare che quest'ultima datazione corrisponde alla glaciazione di Günz, mentre l'espansione della popolazione MPC (690.000 anni fa) cadrebbe nell'interglaciale Günz-Mindel. Infine, le espansioni demografiche in *M. flexuosa* sono databili alle glaciazioni Riss-Mindel (La Greca, 1997).

Sulla base di queste datazioni si può quindi tentare un'interpretazione in chiave storica del popolamento di *Micrabris* negli Appennini Centrali. L'alternanza dei fenomeni glaciali e interglaciali del Quaternario sembrano aver giocato un ruolo opposto e speculare nell'influenzare l'evoluzione delle due specie. Infatti *M. pusilla* sarebbe andata incontro a una frammentazione del suo areale (per lo meno alla scala geografica presa da noi in considerazione) in corrispondenza della glaciazione Günz per poi espandersi nell'interglaciale Günz-Mindel; *M. flexuosa* avrebbe invece sperimentato una fase di espansione demografica durante le glaciazioni Riss-Mindel. Questo scenario assume un senso alla luce della differente ecologia delle due specie. Come ricordato nell'introduzione, *M. pusilla* è una specie stenoecia steppica, di altitudini inferiori rispetto a *M. flexuosa*, specie stenoecia tipica di praterie montane d'alta quota. La prima avrebbe trovato le condizioni ideali proprio durante le fasi interglaciali, quando il generale miglioramento del clima determinò l'estendersi della steppa; i medesimi cambiamenti climatici avrebbero invece spinto le specie di praterie montane verso le quote più alte, frammentandone l'areale. Questi fenomeni si sarebbero invertiti durante le fasi glaciali, che consentirono quindi alle specie di clima freddo di espandersi anche a quote relativamente basse. *M. flexuosa* porterebbe quindi nella sua strutturazione gene-

tica le tracce dell'espansione avvenuta in corrispondenza delle ultime fasi glaciali del Quaternario.

Il dato genetico suggerisce una storia più complessa per *M. pusilla*; la specie sembrerebbe caratterizzata da una sostanziale stabilità demografica a partire dall'interglaciale Günz-Mindel. Alla luce di quanto esposto è quindi probabile che l'insieme di aplotipi da noi trovati in *M. pusilla* e le relazioni fra essi siano il risultato di una prima suddivisione a seguito della glaciazione di Günz cui avrebbe fatto seguito un contatto secondario favorito dall'estendersi della steppa durante l'interglaciale.

Sarà interessante in futuro verificare se e in che misura l'ipotesi sopra esposta risulti valida anche a una scala geografica più ampia. I dati allozimici disponibili per *M. flexuosa* sembrano andare in questa direzione (Bologna et al., 1988). Purtroppo il campionamento effettuato per il presente lavoro non ha potuto includere le popolazioni relitte pirenaiche e alpine della specie a suo tempo saggiate con i marcatori allozimici; di conseguenza risulta difficile trarre delle conclusioni a riguardo. È nostra intenzione quindi proseguire lo studio in questa direzione per ottenere un quadro filogeografico più completo, traendo anche vantaggio dall'opportunità offerta dalle tecniche di biologia molecolare di poter lavorare su materiale conservato a secco. Riteniamo infatti che questo gruppo di coleotteri rappresenti un materiale d'elezione per comprendere l'impatto dei cambiamenti climatici del Quaternario sull'evoluzione delle faune terrestri Alpino-Appenniniche.

RINGRAZIAMENTI

Desideriamo ringraziare Maurizio Biondi, Pierluigi Bombi, Manuela D'Amen, Carla Marangoni, Monica Pitzalis, Daniele Salvi, Federica Turco, per l'aiuto fornito durante i campionamenti e Katja Moll per l'assistenza tecnica durante le fasi di sequenziamento.

Questo lavoro è stato eseguito con il contributo di fondi PRIN (Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, n. 2004057217; coordinatore MAB), e fondi di finanziamento ricerca di Ateneo (Università degli Studi di Roma "La Sapienza"; responsabile MC).

BIBLIOGRAFIA

- BOLOGNA M.A. in stampa - Meloidae, pp. XY-YX. In: I. Löbl & A. Smetana (eds.): Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Vol. 5. Stenstrup: Apollo Books.
- BOLOGNA M.A. 1991 - Coleoptera Meloidae. Fauna d'Italia. XXVIII. Calderini, Bologna, XIV+541 pp.
- BOLOGNA M.A., COBOLLI SBORDONI M., DE MATTHEIS E., MATTOCCIA M. 1988 - Divergenza genetica tra popolazioni sud europee di *Mylabris flexuosa* Olivier (Coleoptera, Meloidae). Atti XV Congr. ital. Entomol., L'Aquila 1988: 673-680.
- BOLOGNA M.A., D'INZILLO B., CERVELLI M., OLIVIERO M., MARIOTTINI P. 2005 - Molecular phylogenetics of the Mylabrini blister beetles (Coleoptera, Meloidae). Mol. Phylogenet. Evol., 37: 306-311.

- BOLOGNA M.A., PINTO, J.D. 2001 - Phylogenetic studies of the Meloidae (Coleoptera), with emphasis on the evolution of phoresy. *Syst. Entomol.*, 26: 33-72.
- CACCONI A., SBORDONI V. 2001 - Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from Bathysciine beetles. *Evolution*, 55: 122-130.
- CLEMENT M., POSADA D., CRANDALL K.A. 2000 - TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9: 1657-1659.
- EXCOFFIER L., LAVAL G., SCHNEIDER S. 2006 - Arlequin, version 3.01: an Integrated software package for population genetics. Switzerland: Computational and Molecular Population Genetics Lab, University of Berne.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P.E., QUATTRO J. 1992 - Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- FARRIS J.S. 1970 - Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.*, 18: 374-385.
- FELSENSTEIN J. 1985 - Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- FOLMER O., BLACK M., HOEH W., LUTZ R., VRIJENHOEK R. 1994 - DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 294-299.
- HARPENDING H.C. 1994 - Signature of ancient population-growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.*, 66: 591-600.
- HASEGAWA M., KISHINO K., YANO T. 1985 - Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22:160-174
- HUELSENBECK J.P. 2000 - MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Distributed by the author. Department of Biology, Univ. of Rochester, Rochester, NY.
- KASZAB Z. 1969 - The system of Meloidae (Coleoptera). *Mem. Soc. Entomol. Ital.*, 48: 241-248.
- LA GRECA M. 1997 - La situazione paleoclimatica nel Quaternario. *Biogeographia, Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.)*, 19: 7-29.
- LARGET B., SIMON D. 1999 - Markov chain Monte Carlo algorithm for Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 750-759.
- LUNT D.H., ZHANG D.-X., SZYMURA J. M., HEWITT G. M. 1996 - The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Biol.*, 5: 153-165.
- MAU B., NEWTON M. 1997 - Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *J. Comp. Graph. Stat.*, 6: 122-131.
- MAU B., NEWTON M., LARGET B. 1999 - Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, 55: 1-12.
- POSADA D., CRANDALL K. 1998 - Modeltest: testing the model of DNA substitutions. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- RANNALLA B., YANG Z. 1996 - Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.*, 43: 304-311.
- ROGERS A.R., HARPENDING H. 1992 - Population growth makes wave in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 552-569.
- RONQUIST F., HUELSENBECK J.P. 2003 - MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- SAITOU N., NEI M. 1987 - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- 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.
- SIMON C., BUCKLEY T.R., FRATI F., STEWART, J.B., BECKENBACH A.T. 2006 - Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37: 545-579.
- SWOFFORD D. 2002- PAUP* β -version 4.10. Sunderland: Sinauer.
- 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.