

UC Merced

Biogeographia - The Journal of Integrative Biogeography

Title

Pattern filogeografici a confronto in specie paleartiche di Coleotteri Scarabaeoidea

Permalink

<https://escholarship.org/uc/item/9c9708tb>

Journal

Biogeographia - The Journal of Integrative Biogeography, 30(1)

ISSN

1594-7629

Authors

Pizzo, Astrid
Silvestro, Daniele
Delpero, Massimiliano
et al.

Publication Date

2011

DOI

10.21426/B630110601

Peer reviewed

Pattern filogeografici a confronto in specie paleartiche di Coleotteri Scarabaeoidea

ASTRID PIZZO, DANIELE SILVESTRO, MASSIMILIANO DELPERO,
PIERO CERVELLA, CLAUDIA PALESTRINI, ANTONIO ROLANDO
*Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università degli studi di Torino,
via Accademia Albertina 13, 10123 Torino (Italy); e-mail: astrid.pizzo@unito.it*

Key words: historical biogeography, COI, ITS2, Nested Clade Analysis, Likelihood-based methods.

SUMMARY

The present study aims to compare the population structures and the phylogeographic patterns of species belonging to two different paleartic genus of Coleoptera Scarabaeidae (*Trypocopris* and *Onthophagus* s.s.), whose distributions largely overlap, but whose ecological requirements are deeply different. We tested if mitochondrial polymorphisms (COI gene) of three species of the genus *Trypocopris*, *T. alpinus* (Hagenbach), *T. pyrenaicus* (Charpentier) and *T. vernalis* (L.) reflect morphological and geographic subspecies previously recognised; results showed high consistency between molecular and morphological/geographical data, suggesting that the subspecies can be considered as independent evolutionary units. An additional analysis performed with the help of a likelihood based method for historical biogeography allowed us to evaluate the relative influence of demographic factors like genic flow or drift in shaping the particular phylogeographic patterns observed. Both nested clade analysis and likelihood-based historical reconstruction suggested that Sicilian population of *T. pyrenaicus* separated from Peninsular populations only recently and this is likely due to vicariance mechanisms. On the contrary, *Onthophagus taurus* (Schreber) and *O. illyricus* (Scopoli) did not show any phylogeographic pattern using COI, because of very low (*O. taurus*) or completely lacking (*O. illyricus*) haplotype polymorphism. A feeble and little informative phylgeographic structure was found using sequences from ITS2.

An estimate of the time of interspecific divergence in each genus located speciation events in a time-frame pleaceble in Pliocene. Differences between the patterns observed are interpreted in the light of the different ecological requirements of the species of the two genus.

INTRODUZIONE

Il presente lavoro si propone di confrontare la struttura di popolazione ed i pattern filogeografici di specie appartenenti a due diversi generi di Coleotteri Scarabaeoidea, *Trypocopris* e *Onthophagus* (s.s.), che realizzano corologicamente areali in larga parte sovrapposti.

Il genere *Trypocopris* comprende sei specie coprofaghe tipiche di pascoli e foreste di media ed alta quota: *T. alpinus* (Hagenbach), *T. amedei* (Fairmaire), *T. pyrenaicus* (Charpentier), *T. vernalis* (Linnaeus), *T. fulgidus* (Motschulsky) e *T.*

inermis (Menètries). Il genere è ampiamente distribuito nel Paleartico occidentale, ma gli areali specifici sono molto frammentati e per tre delle sei specie sono state descritte alcune sottospecie, indicative dell'alta variabilità morfologica realizzata nel gruppo. In Italia sono presenti le tre specie *T. vernalis*, *T. pyrenaicus*, e *T. alpinus*, per ognuna delle quali sono state descritte sottospecie (Fig. 1). Recenti ricerche (Carisio et al., 2004) hanno testato la consistenza genetica di tali descrizioni su base morfologica e vagliato i meccanismi di diversificazione responsabili del differenziamento intraspecifico; attraverso l'analisi filogenetica e la NCA (*Nested Clade Analysis*, Posada et al., 2000) di sequenze del gene mitocondriale COI è stata messa in evidenza una struttura ben definita delle linee genetiche tra diversi morfotipi, organizzata su scala geografica. Interpretando i risultati della NCA alla luce delle chiavi di inferenza proposte da Templeton (1998), è stato inoltre possibile ipotizzare specifiche dinamiche evolutive responsabili di tale differenziamento intraspecifico.

Onthophagus taurus e *O. illyricus* sono riconosciute come *sister species* su base morfologica (Balthasar, 1963; Baraud, 1992; Lohse e Lucht, 1992; Moczek e Emlen, 1999; Martin-Piera e Lopez-Colon, 2000) e su base genetica (Pizzo et al., 2006). *Onthophagus taurus* mostra, originariamente, una tipica distribuzione Turanico-Europeo-Mediterranea (Balthasar, 1963), ma alla fine degli anni Sessanta del secolo scorso è stato introdotto nella parte orientale degli Stati Uniti e negli anni Settanta in alcuni stati dell'Australia. La corologia di *O. illyricus* è prettamente Turanico-Europea, e la sua distribuzione potrebbe ricalcare a grandi linee quella di *O. taurus*, ma vista l'inattendibilità verificata di alcune delle informazioni geografiche, dovuta in larga misura alla difficoltà di distinguere le due specie, la sua attuale corologia rimane ancora imprecisa (Martin-Piera e Lopez-Colon, 2000). È comunque certo che in diverse parti dei loro areali le due specie si trovano in condizio-

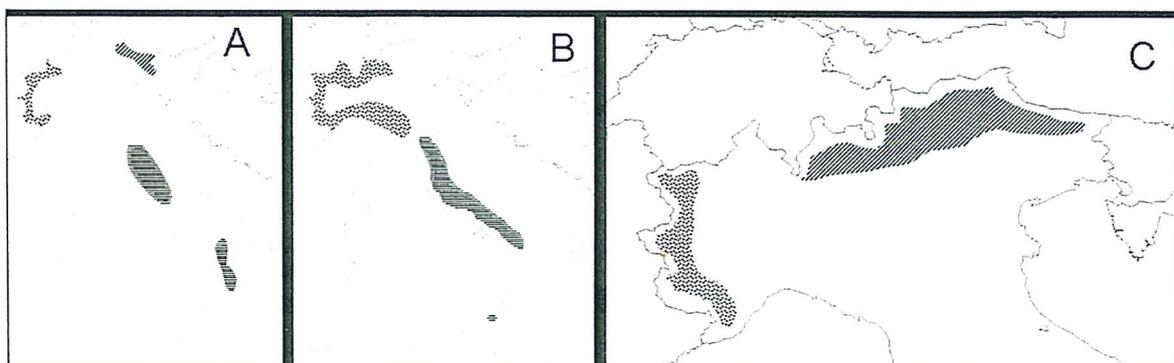


Fig. 1 - A. Cartina della distribuzione in Italia della specie *T. vernalis*. L'area a linee oblique rappresenta l'areale di *T. v. vernalis*, l'area punteggiata quello di *T. v. fauveli*, l'area a linee orizzontali quello di *T. v. apenninicus*. B. Cartina della distribuzione in Italia delle specie *T. pyrenaicus*. L'area punteggiata rappresenta l'areale di *T. p. slendens*, le aree a linee orizzontali quello di *T. p. cyanicolor*. C. Cartina della distribuzione in Italia delle specie *T. alpinus*. L'area punteggiata rappresenta l'areale di *T. a. opacus*, l'area a linee oblique quello di *T. a. alpinus*.

ni non solo simpatriche, ma anche sintopiche (Fig. 2); in queste aree erano stati messi in evidenza individui con fenotipi intermedi di difficile attribuzione all'una o all'altra specie; recenti analisi biomolecolari hanno tuttavia stabilito come tali individui appartengano univocamente alla specie *O. illyricus*, e che l'ipotesi di una eventuale ibridazione tra le specie non è supportata da alcuna evidenza genetica (Pizzo et al., 2006).

Utilizzando stime del polimorfismo genetico ottenute dall'analisi delle sequenze di alcuni marcatori molecolari, si è inteso quindi:

1) esaminare la distribuzione spaziale delle linee evolutive e verificare l'esistenza di una struttura filogeografica delle popolazioni appartenenti alle specie sorelle *O. taurus* e *O. illyricus* attraverso l'analisi di sequenze di un gene mitocondriale (COI) e di un gene nucleare (ITS2);

2) costruire un'ipotesi di biogeografia storica che spieghi le distribuzioni attuali delle specie che mostrano una significativa struttura filogeografica utilizzando un recente metodo di inferenza filogeografica (Ree et al., 2005; Ree e Smith, 2008).

3) confrontare qualitativamente i pattern filogeografici delle specie appartenenti al genere *Onthophagus* con quelli messi in evidenza per le tre specie del genere *Trypocopris* (Carisio et al., 2004) cercando di interpretare analogie e differenze sulla base di particolari peculiarità della biologia, dell'ecologia e dell'attuale pattern distributivo delle specie, oltre che dei percorsi storico-evolutivi contingenti dei due taxa.

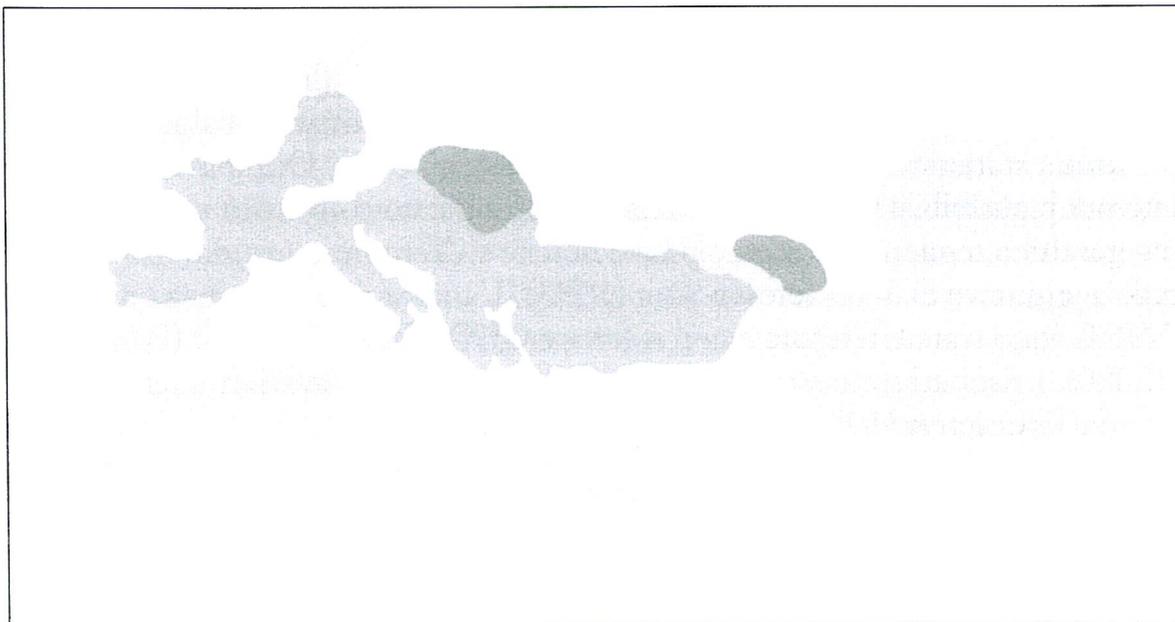


Fig. 2 - Distribuzione geografica delle specie *Onthophagus taurus* e *O. illyricus*. In grigio chiaro l'areale primario di *O. taurus*, in grigio scuro quello di *O. illyricus*, la gradazione intermedia di grigio rappresenta l'area di simpatria delle due specie.

Campionamenti e tecniche molecolari

Le analisi genetiche sono state condotte su individui raccolti in diverse località europee (principalmente in Italia) durante il 2002 e il 2003 e conservati in etanolo 100%. Dopo reidratazione in acqua distillata, il DNA totale è stato estratto dal capo degli insetti attraverso una digestione di 12 ore in proteinasi K/SDS; l'estrazione al cloroformio e la precipitazione in etanolo sono state eseguite seguendo protocolli standard (Laird et al., 1991). Un frammento del gene mitocondriale COI è stato amplificato e sequenziato come descritto in Carisio et al. (2004) e in Pizzo et al. (2006). La tabella I mostra l'elenco delle popolazioni e il numero di individui di *Trypocopris* utilizzate per l'analisi filogenetica e filogeografica, mentre la tabella II illustra le località di campionamento degli individui di sesso femminile appartenenti a *O. taurus* e *O. illyricus* utilizzati per l'analisi delle sequenze del gene COI e del gene ITS2. I primer utilizzati nell'amplificazione di ITS2 sono: ITS2F-5'-AACTGCAGGTGGATCACTCGGCTCG-3' e ITS2R-5'-CAGAATTCGCTCGCCGCTACTAAG-3.

Il frammento è stato sequenziato utilizzando il primer ITS2R ed un primer interno alla sequenza appositamente costruito (ITS2F-SEQ 5'-TGTTA-CATACGCCACTCCGA-3').

Analisi dei dati

Analisi filogeografica in O. taurus e O. illyricus

Il programma TCS 1.06 (Clement et al., 2000) è stato utilizzato per costruire i network degli aplotipi ricavati dal sequenziamento, utilizzando l'algoritmo di parsimonia statistica proposto da Templeton et al. (1992). Dopo aver stimato i network plausibili al 95%, il set di cladogrammi è stato convertito in uno schema gerarchico seguendo le regole base descritte da Templeton et al. (1987) e le regole aggiuntive di Templeton e Sing (1993). L'analisi di contingenza e l'analisi NCA sono state effettuate con il software GEODIS versione 2.0 (Posada et al., 2000). I risultati sono stati interpretati alla luce delle chiavi di inferenza proposte da Templeton (1998).

Ricostruzione likelihood-based delle distribuzioni geografiche ancestrali

Poiché la ricostruzione delle distribuzioni geografiche ancestrali può essere effettuata solo per taxa che mostrino una significativa struttura filogeografica, essa è stata eseguita solo sulle popolazioni appartenenti alle specie *T. vernalis*, *T. pyraeneus*, e *T. alpinus*. Le sequenze di 568 pb del gene COI, dopo l'allineamento, sono state impiegate in analisi filogenetiche di tipo bayesiano per ricostruirne le relazioni di parentela. Il modello di sostituzione nucleotidica più

Tab. I - Elenco delle località di campionamento con la relativa regione e stato di provenienza, ed il numero di individui utilizzati per ciascuna analisi (COI e ITS2).

Specie	Località	Regione	Stato	COI	ITS 2
<i>O. taurus</i>	Ablitas	Navarra	Spagna	-	3
	Donana	Andulacia	Spagna	2	2
	Chambcry	Rhone Alpes	Francia	-	2
	Toulon- Le Cannet de Maures	Provence-Alpes-Cote d'Azur	Francia	2	2
	Boniface	Corse	Francia	-	2
	Caserta- Lago del Matese	Campania	Italia	2	2
	Pont Canavese	Piemonte	Italia	5	1
	Aosta	Valle d' Aosta	Italia	2	-
	Grosseto	Toscana	Italia	-	1
	Lucignano	Toscana	Italia	-	2
	Val d'Ossola	Piemonte	Italia	-	2
	Bosa	Sardegna	Italia	-	1
	Brlog	Krbavsko Polje	Croazia	2	2
	Pag	Isola di Pag	Croazia	-	2
	Lamia	Thessalia	Grecia	-	1
	Levkas	Isola di Levkas	Grecia	-	1
	Taigeto	Peloponneso	Grecia	-	2
	<i>O. illyricus</i>	Pont Canavese	Piemonte	Italia	5
Valscsia		Picmonte	Italia	-	3
Bergamo		Lombardia	Italia	-	2
Caserta- Lago del Matese		Campania	Italia	2	-
Trieste		Friuli	Italia	3	2
Brlog		Krbavsko Polje	Croazia	2	1
Lamia		Thessalia	Grecia	-	4
Konitsa		Macedonia	Grecia	-	2

adatto, selezionato con il programma MrModelTest 3.2 (Nylander, 2004), è risultato essere il GTR + (6 diversi tassi di transizione, across site rate variation descritta da una distribuzione gamma). I parametri del modello (shape parameter alpha, base frequencies, rate-matrix), non sono stati inseriti fra i priors dell'analisi. Si sono preferiti, infatti, flat priors in cui i parametri vengono campionati in base alla loro probabilità a posteriori da distribuzioni sostanzialmente non informative.

Con l'impiego del programma MrBayes 3.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2001, 2003), gli alberi sono stati campionati da due analisi condotte parallelamente a partire da topologie random attraverso un milione di generazioni di Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Con un burn-in del 5% sono stati esclusi gli alberi campionati prima del raggiungimento della fase stazionaria (plateau). La topologia finale impiegata per le successive analisi rappresenta un albero di consenso dei 18.000 alberi campionati dalla MCMC e riporta i nodi osservati con maggiore frequenza.

Sull'albero bayesiano è stata costruita un'ipotesi di biogeografia storica con

Tab. II - Elenco delle popolazioni campionate. Sono indicate, oltre alla tassonomia, la sigla di identificazione utilizzata nel testo e la località di raccolta. È inoltre riportato il numero di individui utilizzati per le analisi di sequenza (COI).

Specie	Sottospecie	Sigla	Località	COI
<i>T. alpinus</i>	<i>alpinus</i>	GER	Gerola Alta, Valtellina (SO)	3
	<i>alpinus</i>	FAV	Monte Faverghera (BL)	2
	<i>opacus</i>	SAC	Monte Saccarello (IM)	2
<i>T. vernalis</i>	<i>fauveli</i>	OR	Ormea (CN)	2
	<i>apenninicus</i>	MS	Monti Sibillini (MC)	3
	<i>vernalis</i>	TS	Padriciano (TS)	2
	<i>vernalis</i>	KAR	Karlobag, Croazia	1
	<i>vernalis</i>	ALB	Boga, Albania	2
	<i>vernalis</i>	RO	Rohoznik, Slovakia	1
	<i>vernalis</i>			
<i>T. pyrenaicus</i>	<i>splendens</i>	CN	Castelnuovo Nigra (TO)	2
	<i>splendens</i>	FC	Forno di Coazze (TO)	2
	<i>splendens</i>	VL	Dubino, Valtellina (SO)	2
	<i>splendens</i>	VG	Scarno, Val Grande (VB)	3
	<i>splendens</i>	LYS	Col del Lys (TO)	3
	<i>splendens</i>	BA	Bagnolo Piemonte (TO)	2
	<i>cyanicolor</i>	SS	Santa Sofia, Casentino (FO)	2
	<i>cyanicolor</i>	CP	Castelporziano (ROMA)	2
	<i>cyanicolor</i>	SF	San Fratello, Nebrodi (ME)	2
	<i>pyrenaicus</i>	ESP	Asturias, Pico de Europa, Spagna	2

Tab. III - Connessioni fra le aree espresse come probabilità di successo di un dispersal diretto.

	W Europa	E Europa	Alpi	C Italia	Sicilia
W Europa	-	0,5	1	0,5	0
E Europa	0,5	-	1	0,5	0
Alpi	1	1	-	1	0,5
C Italia	0,5	0,5	1	-	1
Sicilia	0	0	0,5	1	-

un metodo likelihood-based di inferenza delle distribuzioni ancestrali descritto da Ree et al. (2005) e Ree e Smith (2008a) ed implementato dal programma Lagrange 2 (Ree, 2005; Ree e Smith, 2008b).

Poiché le analisi eseguite con il programma Lagrange devono essere condot-

te su un albero ultrametrico, in cui, cioè, le lunghezze dei rami rappresentano direttamente il tempo di divergenza, si è ricorso al metodo non parametrico NPRS di Sanderson (1997) e al programma r8s (Sanderson, 2004) per ottenere il cronogramma. Il Non-Parametric Rate-Smoothing (NPRS) ha come funzione oggettiva quella di minimizzare lo scarto quadratico fra i tassi evolutivi stimati per cladi successivi: il risultato è un albero ultrametrico, con la radice collocata in un tempo arbitrario 1. Il cronogramma non è dunque calibrato ad una scala di tempi assoluti. Il metodo di analisi di biogeografia storica impiegato da Lagrange si propone come un'alternativa likelihood-based alla dispersal-vicariance analysis di DIVA (Ronquist, 1996). Esso considera le distribuzioni osservate ai nodi terminali dell'albero come una conseguenza di due processi di evoluzione dell'areale: quello anagenetico e quello cladogenetico. L'evoluzione anagenetica descrive la modificazione stocastica degli areali nel tempo sulla base di eventi di dispersal e estinzioni locali. Un modello geografico può descrivere le connessioni fra le aree come probabilità di successo di un dispersal. L'evoluzione cladogenetica degli areali è invece considerata istantanea e descrive come un range ancestrale possa essere ereditato in modo differenziale dai due discendenti a seconda di dove si verifica la speciazione. Si definisce come scenario biogeografico per un nodo interno un'ipotesi di eredità differenziale a partire da una distribuzione ancestrale.

L'obiettivo del metodo di inferenza di Ree e Smith (2008) è valutare per ogni nodo interno dell'albero quale scenario di eredità sia più probabile. Sulla base di questo modello di evoluzione delle distribuzioni, viene calcolata così la global likelihood, ossia la verosimiglianza degli areali osservati, dati l'albero filogenetico, le lunghezze dei rami e il modello geografico, tenendo conto di tutti i possibili range ancestrali.

La probabilità relativa di ogni scenario biogeografico per un nodo interno dell'albero è pari al suo contributo alla global likelihood e viene quantificata come global likelihood condizionale.

RISULTATI

1) Il momomorfismo delle sequenze mitocondriali di COI in *O. illyricus* non permette di esprimere alcuna valutazione, se non in termini negativi, di tipo filogeografico, e rende inutilizzabili le sequenze per questo scopo. Le sequenze mitocondriali di *O. taurus* non evidenziano nessuna chiara suddivisione geografica delle popolazioni, ad eccezione della divergenza basale dell'aplotipo di Doñana (Pizzo et al., 2006). Al fine di rintracciare una più significativa variabilità genetica intraspecifica, un segmento di 591 bp del gene ITS2 è stato sequenziato in 28 individui appartenenti alla specie *O. taurus* ed un segmento di 563 bp dello stesso gene è stato ottenuto dall'analisi di 16

individui di *O. illyricus*. Nonostante la presenza di inserzioni e delezioni, dovuta all'assenza di sostanziali vincoli strutturali e funzionali imposti dalla traduzione della sequenza nucleotidica in sequenza aminoacidica, è stato possibile ottenere un allineamento sostanzialmente privo di ambiguità. Le popolazioni di *O. illyricus* hanno prodotto 10 diversi aplotipi, mentre l'allineamento delle sequenze di *O. taurus* ha messo in evidenza 12 differenti aplotipi. Il numero massimo di eventi mutazionali tra aplotipi che permetta una connessione parsimoniosa con una probabilità di $P > 0,95$ è risultato di 10 passi, sia per le sequenze di *O. illyricus* sia per quelle di *O. taurus*. La stima del network all'interno di questo limite ha dato dunque origine ad un solo cladogramma per specie. I network filogeografici presentano una distribuzione degli aplotipi apparentemente casuale, complessa, estremamente mescolata, con aplotipi condivisi anche fra popolazioni geograficamente distanti; l'analisi di contingenza non evidenzia infatti alcuna associazione significativa tra clade e località geografica, né in *O. taurus* né in *O. illyricus*, dimostrando la sostanziale inesistenza di struttura geografica delle popolazioni, per lo meno per quanto è possibile rilevare con COI e ITS2 come marcatori.

Le stime dei tassi molecolari di evoluzione sono spesso associate ad ampi errori e devono essere interpretate con estrema cautela. Molti studi di evoluzione molecolare hanno evidenziato che i tassi possono variare notevolmente tra organismi diversi, geni diversi e addirittura tra porzioni di geni all'interno degli stessi organismi; recenti ricerche riportano anche come l'uso di tassi di mutazione "filogenetici" applicati allo studio di popolazione possa portare ad una sistematica sovrastima della datazione degli eventi evolutivi recenti (Ho et al., 2005; Ho e Larsen, 2006) evidenziando l'esistenza di tassi di sostituzione mitocondriale "time-dependent" (Gratton et al., 2008). Data l'assenza di struttura filogeografica delle popolazioni, nel caso di *O. taurus* e *O. illyricus* si tratta di effettuare una stima del tempo di divergenza unicamente a livello interspecifico; considerando che esiste consenso generale sul fatto che se si confrontano specie filogeneticamente vicine i tassi di evoluzione delle sequenze risultano generalmente comparabili, il tempo di divergenza T è stato calcolato a partire dall'equazione $T = D / (2a)$, dove D è la distanza genetica standard di Nei calcolata tra le specie e a è il tasso di mutazione o sostituzione genica (Nei, 1972). È stato utilizzato il tasso di mutazione $a = 1,2\%$ proposto per gli artropodi da Brower (1994). Il grado di distanza genetica tra queste specie sorelle ha consentito di stimare che esse si sono originate in un frame temporale compreso tra i 3 e i 4 milioni di anni fa, durante il Pliocene.

2) In *Trypocopriss*, l'analisi filogenetica delle sequenze mitocondriali ha messo in evidenza una netta separazione delle tre specie, che formano tre cladi ben supportati dai valori di bootstrap ed una buona risoluzione delle sottospecie (Carisio et al., 2004; Fig. 3). Assumendo il tasso di mutazione di Brower si ot-

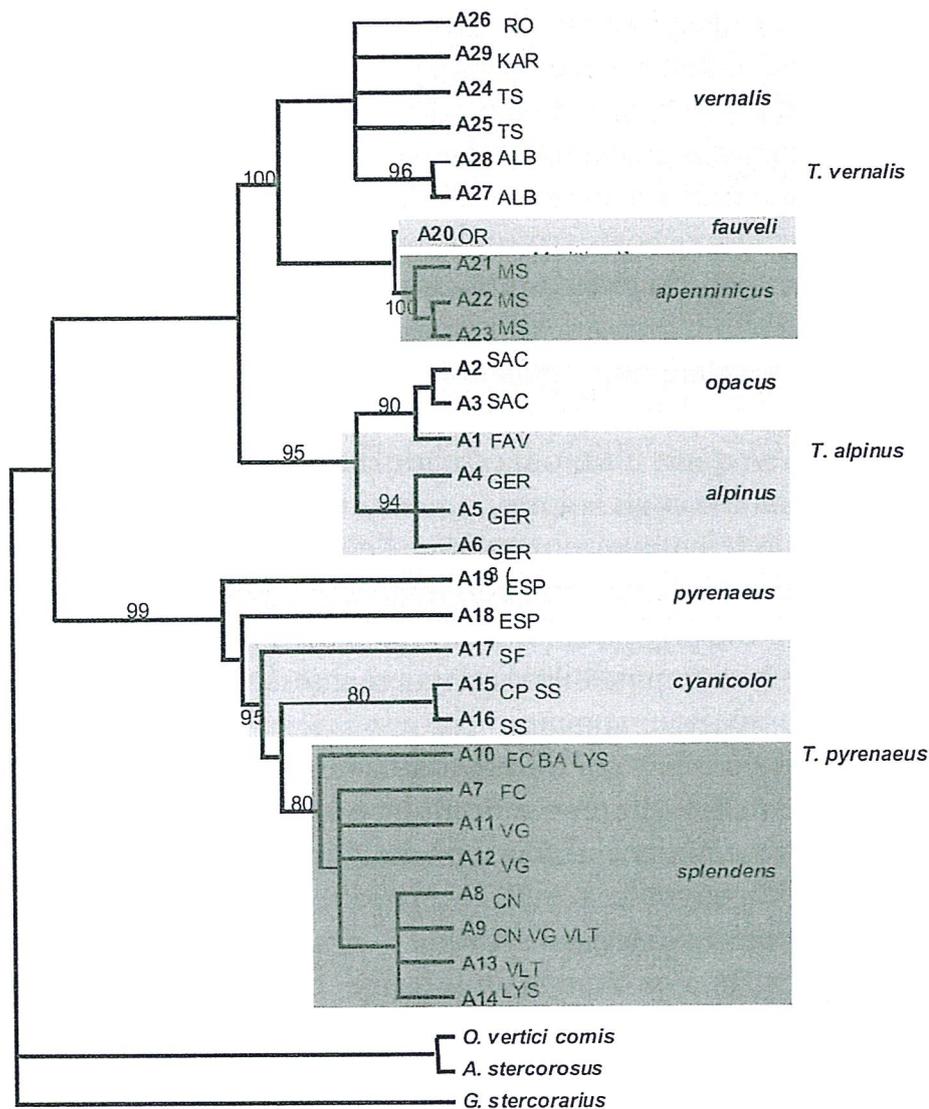


Fig. 3 - Albero di consenso stretto derivato dai dodici alberi di massima parsimonia. In corrispondenza dei rami sono indicati gli indici di bootstrap maggiori del 70% ottenuti con 1000 repliche. Accanto agli aplotipi sono riportate le sigle delle popolazioni di appartenenza. Sono evidenziati anche i raggruppamenti relativi agli aplotipi appartenenti alle tre specie e i cladi riferibili alle sottospecie analizzate. In *T. alpinus* gli aplotipi formano due cladi: uno comprendente la popolazione di Gerola (sottospecie *alpinus*) ed un secondo con i due individui del Monte Favergera (sottospecie *alpinus*) come sister group della popolazione del Monte Saccarello (sottospecie *opacus*). In *T. vernalis* la sottospecie *fauveli* è sister group della sottospecie *apenninicus*, mentre le popolazioni orientali (*vernalis*) formano un unico clade. Per quanto concerne la specie *T. pyrenaesus*, la sottospecie *pyrenaesus* occupa una posizione più basale rispetto al raggruppamento delle sottospecie *splendens* e *cyanicolor*, ma le relazioni interne non sono risolte in rapporti dicotomici univoci a causa della scarsità di caratteri diagnostici e della ridotta variabilità osservata. Mod. da Carisio et al. (2004).

tiene anche per le tre specie di *Trypocoprpris* una separazione realizzatasi verosimilmente durante il Pliocene; utilizzando, pur con tutte le limitazioni connesse, il medesimo tasso di mutazione per datare la divergenza tra le popolazioni è possibile evidenziare che essa è avvenuta in epoca Pleistocenica.

Per quanto riguarda i risultati della NCA, la stima del network all'interno del

limite di mutazioni calcolato secondo Templeton et al. (1992) ha dato origine ad otto cladogrammi distinti. Ad esempio, per la specie *T. pyrenaicus* gli aplotipi sono raggruppati in due network separati da 13 eventi mutazionali (Fig. 4): uno comprende la popolazione spagnola ed il secondo racchiude tutti gli aplotipi italiani. La connessione tra i due network non è supportata al livello del 95%, ma il minimum spanning tree costruito sugli stessi dati permette di ipotizzare una connessione tra un aplotipo della popolazione siciliana e un aplotipo della popolazione spagnola. All'interno del network II sono presenti due cladi principali: un clade comprendente tutti gli aplotipi della sottospecie *splendens*, appartenenti alle popolazioni delle Alpi occidentali, e un clade che corrisponde alla sottospecie *cyanicolor*. quest'ultimo racchiude due cladi rispettivamente con la popolazione siciliana e con gli aplotipi presenti nelle popolazioni di Toscana e Lazio. Considerando le popolazioni italiane, l'evento più antico è rappresentato dalla separazione tra il clade corrispondente alle popolazioni delle Alpi (sottospecie *splendens*) e alle popolazioni dell'Italia centro-meridionale (sottospecie *cyanicolor*), in cui è ancora possibile distinguere due diversi cladi contenenti rispettivamente le popolazioni appenniniche e siciliane. Tale separazione può essere spiegata sia con un evento di frammentazione della distribuzione per disomogeneità ambientale sia con un effetto di isolamento dovuto alla distanza o, più probabilmente, con una combinazione dei due fattori.

Per le analisi di biogeografia storica, le relazioni di parentela fra popolazioni appartenenti alle specie *Trypocopris vernalis*, *T. pyraeneus*, e *T. alpinus* sono state indagate attraverso analisi bayesiane, al fine di ottimizzare contemporaneamente topologia e branch-lengths. Il risultato è una ricostruzione filogenetica in cui la maggior parte dei nodi risulta fortemente supportata in termini di probabilità a posteriori e in cui le specie appaiono evidentemente monofiletiche.

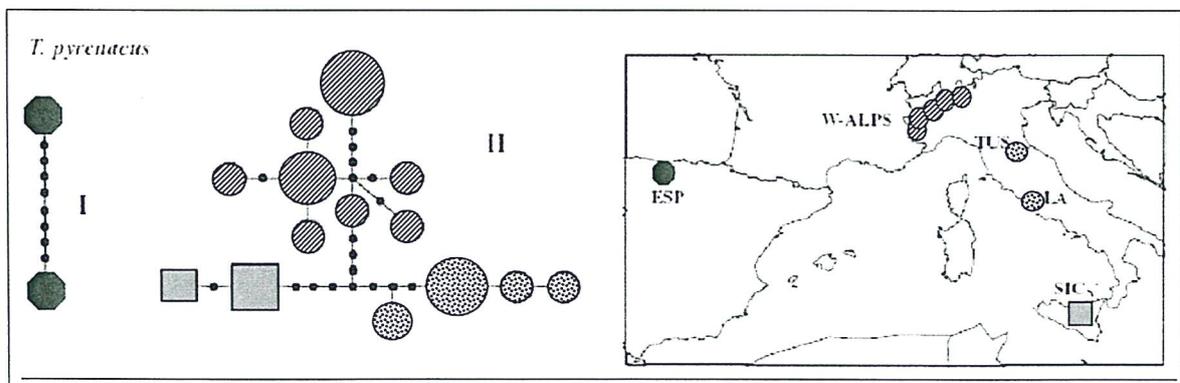


Fig. 4 - Network degli aplotipi per la specie *T. pyrenaicus*. Gli aplotipi sono rappresentati da simboli le cui dimensioni dipendono dalla frequenza dell'aplotipo nel campione. Ogni segmento che collega due simboli rappresenta una singola mutazione. Il simbolo I indica un nodo interno del network non presente nel campione, cioè un aplotipo intermedio tra due aplotipi vicini che differiscono per più di una mutazione. Sulla base di questo network è stato costruito il relativo schema gerarchico. Mod. da Carisio et al. (2004).

Gli areali sono stati descritti individuando cinque aree di distribuzione: Europa occidentale, Alpi, Italia centrale, Sicilia, Europa orientale. Le connessioni fra tali aree (espresse come probabilità di dispersal diretti) sono state definite a priori con l'introduzione del modello geografico rappresentato nella tabella III. Il modello, piuttosto semplice e simmetrico, assume un'alta probabilità di successo nella colonizzazione di un'area contigua a quella di partenza ($P = 1$), una più bassa probabilità per aree non strettamente connesse ($P = 0,5$ o $P = 0$). Dall'analisi è risultata una global likelihood pari a $-\ln L = 35,27$ con tassi di dispersal e local extinction di rispettivamente 0,16 e $3,268e^{05}$. La Fig. 5 mostra una rappresentazione grafica semplificata dei risultati calcolati per ogni nodo interno dell'albero. Il cut off convenzionalmente accettato per considerare statisticamente supportato uno scenario di eredità rispetto ad un altro, è di due unità, in termini di \ln Likelihood. Tale supporto è stato riscontrato nella maggior parte dei nodi; una maggiore incertezza nella ricostruzione è risultata soltanto nella collocazione di un evento di dispersal dalle Alpi verso il Centro Italia (nodi 2 e 5).

La ricostruzione ipotizza un antenato comune alle tre specie diffuso in Europa occidentale, Alpi, Italia centrale e Sicilia. L'evento speciativo è collocato all'interno delle Alpi, a cui si limita la distribuzione dell'antenato comune a *T. alpinus* e *T. vernalis*. Il *T. pyrenaicus* ancestrale era diffuso già nelle quattro regioni geografiche che occupa oggi. Nel tempo tuttavia si osservano successivi eventi di diversificazione area-specifici riconducibili a fenomeni di isolamento dapprima in Europa occidentale, quindi in Sicilia e Centro Italia. Tali eventi sembrano aver generato le popolazioni vicarianti individuate dalle analisi filogenetiche.

Per quanto riguarda invece i lignaggi relativi a *T. alpinus* e *T. vernalis*, occorre ipotizzare almeno tre eventi di dispersal per spiegare le distribuzioni delle popolazioni attuali. Il primo è da ipotizzarsi presumibilmente tra Alpi ed il Centro Italia, anche se le analisi biogeografiche non sono in grado di collocarlo con sufficiente supporto statistico prima o dopo la cladogenesi che genera le due specie. La regione appenninica viene in ogni caso ereditata esclusivamente da *T. vernalis*. Popolazioni di *T. alpinus* e di *T. vernalis*, risultano poi spostarsi indipendentemente verso Est percorrendo le Alpi (dove oggi ancora vivono in condizioni di parziale simpatria) e occupando, nel caso di *T. vernalis*, alcune regioni dell'Europa Orientale.

DISCUSSIONE

L'analisi delle sequenze mitocondriali delle cinque specie appartenenti ai due diversi generi di coleotteri scarabeoidei esaminati ha permesso di tracciarne la comune origine Pliocenica: è stato infatti messo in evidenza da di-

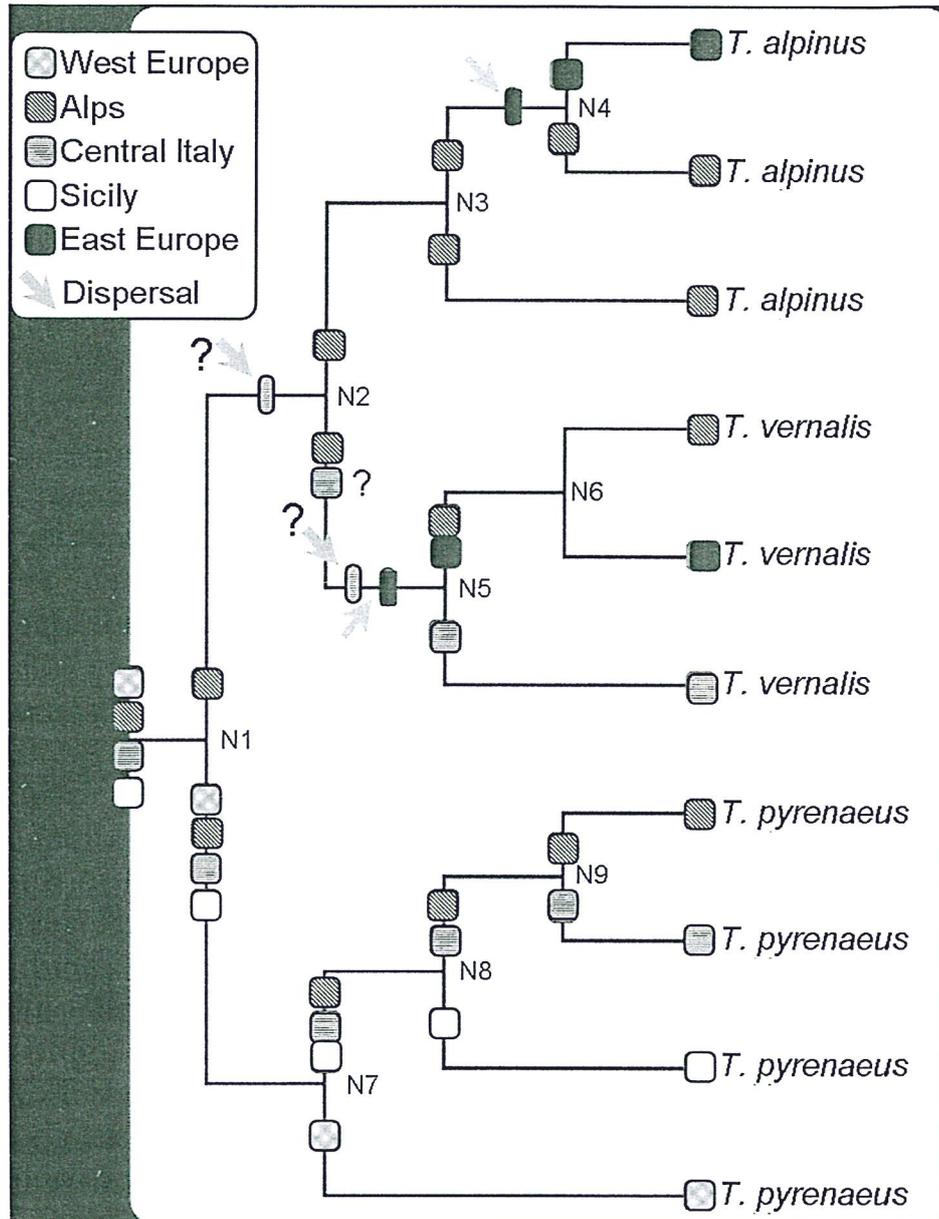


Fig. 5 - Il filogramma illustra una rappresentazione grafica semplificata dei risultati relativi allo scenario biogeografico ottenuti per ogni nodo interno dell'albero. La ricostruzione prevede un antenato comune alle tre specie diffuso in Europa occidentale, Alpi, Italia centrale e Sicilia. L'evento speciativo successivo è collocato all'interno delle Alpi a cui si limita la distribuzione dell'antenato comune a *T. alpinus* e *T. vernalis*. Il *T. pyrenaeus* ancestrale era distribuito già nelle quattro regioni geografiche che occupa oggi. Nel tempo si osservano successivi eventi di diversificazione area-specifici riconducibili a fenomeni di isolamento dapprima in Europa occidentale, quindi in Sicilia e Centro Italia. Tali eventi sembrano aver generato le popolazioni vicarianti individuate dalle analisi filogenetiche. Per quanto riguarda invece i lignaggi relativi a *T. alpinus* e *T. vernalis*, occorre ipotizzare almeno tre eventi di dispersal per spiegare le distribuzioni delle popolazioni attuali.

versi autori come questa finestra temporale costituisca un importante picco di speciazione nei coleotteri (Davis et al., 2002; Ribera e Vogler, 2004). In conseguenza della definizione di questa datazione degli eventi speciativi, si può affermare che, in entrambi i generi, le specie abbiano avuto a disposi-

zione un analogo arco temporale per realizzare l'attuale areale e per differenziarsi a livello intraspecifico.

Attraverso l'approccio filogeografico è stata tuttavia rilevata una sostanziale differenza nel livello di differenziamento intraspecifico e di struttura geografica delle popolazioni esibita dalle specie dei due generi.

Le specie del genere *Trypocopriss* mostrano una spiccata organizzazione geografica delle linee mitocondriali, che ha permesso di dimostrare la coerenza della descrizione delle sottospecie su base morfologica con i dati genetici, aprendo alla possibilità di stabilire la realtà di tale categoria sistematica (Carisio et al., 2004). La separazione delle tre specie in esame sarebbe da far risalire verosimilmente all'epoca Pliocenica, mentre la separazione tra le diverse linee all'interno delle specie sarebbe avvenuta durante il Pleistocene, un'epoca di significativi cambiamenti climatici legati alle glaciazioni; un simile pattern filogeografico può infatti essere coerentemente spiegato con i drastici effetti dei cambiamenti climatici sul biota europeo durante le glaciazioni periodiche, che si sono prodotte durante gli ultimi 2,5 milioni di anni: almeno 10 glaciazioni si susseguirono in un periodo di 1 milione di anni, con picchi glaciali approssimativamente ogni 100.000 anni, conclusi con l'ultimo periodo glaciale-interglaciale (il Würm-Olocene dell'Europa occidentale) (Roy et al., 1996).

Durante il Quaternario le popolazioni animali e vegetali subirono ripetute contrazioni ed espansioni delle distribuzioni, caratterizzate da estinzioni delle popolazioni più settentrionali al diminuire della temperatura e da successive espansioni verso nord a partire dalle aree rifugio meridionali nei periodi più caldi. Studi filogeografici comparativi hanno riconosciuto l'esistenza di tre potenziali rifugi in Spagna meridionale, Italia e Balcani (Bennet et al., 1991; Hewitt, 1996; Taberlet et al., 1998; Brewer et al., 2002; Hewitt, 2004). Per la presenza a lungo termine di una specie in Europa, la sopravvivenza in questi rifugi può essere stata importante, sia durante i periodi caldi che durante quelli freddi.

Colonizzazioni a partire da rifugi localizzati in Italia centro-meridionale, in Spagna e nei Balcani sono state descritte per molte specie della fauna e della flora europee come la lepore comune (Fickel et al., 2008), l'orso bruno (Taberlet et al., 1994, 1998; Hewitt 1999, 2000, 2001, 2004), il cervo nobile (Skog et al., 2009), la natrice viperina (Guicking et al., 2008) la cavalletta *Chorthippus parallelus* (Hewitt, 1996; Hewitt, 1999; Bella et al., 2006), il complesso di specie di coleotteri del genere *Osmoderma* (Audisio et al., 2008), l'abete bianco (Taberlet et al., 1998), le specie *Quercus robur* e *Q. petraea* (Brewer et al., 2002; Cottrell et al., 2002), il faggio (Magri, 2008), che rappresentano esempi significativi di pattern filogeografici comuni tra popolazioni di piante ed animali dell'Europa. Durante le espansioni, successive ai periodi glaciali, i movimenti migratori si sono arrestati in corrispondenza di alcune 'zone di sutura' (Jaarola e Tegelström, 1995; Taberlet et al., 1998; Hewitt, 2001; Brewer et al., 2002),

due delle quali sono rappresentate dalla catena alpina e dai Pirenei. Molti cicli di contrazione/espansione delle aree geografiche occupate, avvenuti seguendo queste oscillazioni climatiche del Pleistocene, hanno portato alla struttura genetica attuale di popolazioni, specie e comunità (Hewitt, 2000). La barriera alpina ha isolato efficacemente la penisola italiana dalle popolazioni distribuite a nord e ad ovest delle Alpi. La parte settentrionale dell'Europa sarebbe stata colonizzata a partire dai rifugi balcanico e spagnolo, mentre le popolazioni italiane solitamente non sono state in grado di superare la barriera costituita dalle Alpi (Taberlet et al., 1998; Hewitt, 2001; Brewer et al., 2002).

Sia la *Nested Clade Analysis* che la ricostruzione degli areali ancestrali mettono in evidenza come il pattern di differenziamento intraspecifico osservato in *Trypocopriss* possa essere interpretato sulla base di questo scenario. Per *T. pyrenaicus*, ad esempio, si può ipotizzare una separazione tra la linea spagnola (sottospecie *pyrenaicus*) e quelle italiane (sottospecie *splendens* e *cyanicolor*) all'inizio dell'era glaciale, a partire da popolazioni già distribuite in Europa. Le popolazioni italiane sarebbero sopravvissute durante i periodi glaciali in corrispondenza di aree rifugio localizzate presumibilmente in Italia centrale, da dove si sarebbero realizzate successive espansioni verso nord in epoca postglaciale, probabilmente in concomitanza del ritorno dei grandi erbivori nelle zone settentrionali in precedenza ricoperte da ghiacci. L'espansione verso nord sarebbe stata frenata dalla barriera alpina. A conferma di questa ipotesi, la sottospecie *splendens* non è presente in Francia, dove invece si ritrova la sottospecie *pyrenaicus* di origine ispanica. La posizione più basale della sottospecie *cyanicolor* rispetto a quella di *splendens* negli alberi filogenetici supporterebbe invece l'ipotesi della presenza di un rifugio in Italia centrale. Inoltre la relativa omogeneità nelle sequenze del mtDNA all'interno della sottospecie *splendens* confermerebbe la separazione piuttosto recente di queste popolazioni. Anche l'isolamento della popolazione siciliana è da considerarsi un fenomeno relativamente recente, dato il ridotto numero di sostituzioni nucleotidiche osservabili tra le popolazioni dell'Italia centrale e quella insulare. Sebbene l'argomento sia ancora oggetto di dibattito, probabilmente la Sicilia è stata ripetutamente collegata ed isolata dalla Calabria durante gli ultimi 2,5 milioni di anni a causa dell'abbassamento del livello del Mediterraneo durante i periodi glaciali (Masini et al., 2008). È quindi plausibile ipotizzare che nei periodi di unione dell'isola alla penisola fosse presente flusso genico tra le diverse popolazioni. Anche la ricostruzione storica degli areali conferma che il differenziamento tra le popolazioni dell'Italia Centrale e della Sicilia sia recente e dovuto principalmente a meccanismi vicarianza.

La specie *T. alpinus* è invece più stenoecia in quanto presenta esigenze ecologiche diverse rispetto alle altre due specie. Occupa infatti tipicamente aree cuminali isolate e risulta meno legata alla presenza di grandi erbivori per l'ali-

mentazione e la riproduzione, utilizzando di preferenza piccoli escrementi particellati e disidratati come quelli di marmotta. Si può quindi ipotizzare che questa specie abbia trovato rifugio durante le glaciazioni in nunatakke alpini, disposti al limite della calotta glaciale che ricopriva le Alpi (Rull, 2009). Anche durante i periodi interglaciali, le popolazioni si sarebbero spostate poco a causa dell'adattamento alla quota, percorrendo soltanto le Alpi da ovest verso est.

Nelle due specie sorelle *O. taurus* e *O. illyricus* l'analisi filogeografica non ha messo in evidenza un pattern analogo, mostrando, diversamente, una marcata assenza di struttura geografica tra le popolazioni. Questo pattern è rintracciabile in entrambe le specie.

Alcuni autori (Fry e Zink, 1998; Kvist et al., 2001; Avise, 2009) hanno suggerito che la mancanza di struttura geografica in marcatori molecolari che evolvono rapidamente come i geni mitocondriali o gli ITS implichi alti livelli di flusso genico, sia storici che attuali. Ci si attende anche che tale flusso genico abbia effetti omogenizzanti su altri caratteri, ad esempio quelli morfologici, che non permetterebbero così l'individuazione di sottospecie o varianti geografiche; la completa similarità fenotipica degli individui di *O. taurus* e *O. illyricus* provenienti da diverse aree geografiche conferma tali previsioni. Anche colli di bottiglia seguiti da successive ricolonizzazioni e rapide espansioni delle popolazioni, o frequenti dispersal su lunga distanza possono risultare in una ridotta struttura geografica e in una scarsa variabilità genetica anche di sequenze ipervariabili. *O. taurus* e *O. illyricus*, le uniche specie appartenenti al sottogenere *Onthophagus* s.s. ad avere una distribuzione turanico-europea, potrebbero infatti aver raggiunto l'Europa in tempi piuttosto recenti e in modo decisamente rapido a seguito della diffusione della pastorizia in epoca neolitica a partire dall'Anatolia verso tutta l'Europa nord-occidentale e a partire dalla Mezzaluna fertile lungo tutte le coste del nord-Africa fino alla penisola iberica (Zilhão, 2001), senza dunque sperimentare nessuno di quei cicli di contrazione ed espansioni caratteristici del biota europeo di epoca pleistocenica. La stessa distribuzione di *O. taurus* sembra rimarcare esattamente le due grandi rotte di diffusione della pratica dell'allevamento.

Intuitivamente, appare possibile ipotizzare che uno dei fattori che possono aver contribuito a determinare questa omogenizzazione delle linee genetiche sia anche il carattere marcatamente euriecio delle specie, soprattutto per quel che concerne *O. taurus*. Nel panorama delle specie coprofaghe appartenenti alla famiglia degli Scarabeidi, *O. taurus* e *O. illyricus* sono due taxa generalisti e caratterizzati da una notevole adattabilità ecologica: le specie sono in grado di utilizzare quasi ogni tipologia di sterco per l'alimentazione e la nidificazione e l'unico fattore seriamente limitante è rappresentato dall'altitudine (le specie si possono trovare in un range altitudinale compreso tra 0 m s.l.m. e 1.200 m s.l.m.); non sono inoltre particolarmente sensibili a fattori di degrado della qualità ambientale (colonizzano tanto aree quasi incontaminate quanto ambienti subur-

bani, ovunque la risorsa alimentare sia disponibile) (Martin-Piera e Lopez-Colon, 2000) e questo permette in molte aree una significativa vicinanza delle popolazioni, in grado di garantire flusso genico.

Questo fattore di carattere ecologico ha probabilmente giocato un qualche ruolo nelle ere geologiche passate ed in tempi più recenti, impedendo un duraturo isolamento delle specie in piccole sottopopolazioni in grado di evolvere e differenziarsi autonomamente a livello genetico o permettendo una rapidissima ricolonizzazione delle aree occupabili a partire da eventuali microaree di rifugio diffuse (Rull, 2009), distribuendosi quindi in modo continuo sull'areale e mantenendo un flusso genico significativo tra le popolazioni.

BIBLIOGRAFIA

- ARNOLD M.L. 1997- Natural hybridization and Evolution. New York: Oxford University Press.
- AUDISIO P., BRUSTEL H., CARPANETO G.M., COLETTI G., MANCINI E., TRIZZINO M., ANTONINI G., DE BIASE A. 2008 - Data on molecular taxonomy and genetic diversification of the European Hermit beetles, a species complex of endangered insects (Coleoptera: Scarabaeidae, Cetoniinae, *Osmoderma*). J. Zool. Syst. Evol. Res., 47: 88-95.
- AVISE J.C., BALL R.M. JR 1990 - Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. Oxford Surveys in Evolutionary Biology, 7: 45-67.
- AVISE J.C. 2000 - Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press.
- AVISE J.C. 2009 - Phylogeography: retrospect and prospect. J. Biogeogr., 36: 3-15.
- BALTHASAR V. 1963 - Monographie der Scarabaeidae und Aphodiidae der palaearktischen und orientalischen Region (Coleoptera: Lamellicornia). Band 2, Coprinae. Verlag der tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag.
- BARAUD J. 1992 - Coléoptères scarabaeoidea d'Europe. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris.
- BARRACLOUGH T.G., VOGLER A.P. 2000 - Detecting the geographical pattern of speciation from the species-level phylogenies. Am. Nat., 155: 19-434.
- BENNET K.D., TZEDAKIS P.C., WILLIS K.J. 1991 - Quaternary refugia of north European trees. J. Biogeogr., 18: 103-115.
- BREWER S., CHEDDADI R., DE BEAULIEU J.L., REILLE M., DATA C. 2002 - The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. For. Ecol. Manage., 156: 27-48.
- BROWER A.V.Z. 1994 - Rapid morphological radiation and convergence among race of the butterfly *Heliconius erato*, inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 91: 6491-6495.
- CARISIO L., CERVELLA P., PALESTRINI C., DEL PERO M., ROLANDO A. 2004 - Biogeographical patterns of genetic differentiation in dung beetles of the genus *Trypocopris* (Coleoptera, Geotrupidae) inferred from mtDNA and AFLP analyses. J. Biogeogr., 31: 1149-1162.
- CLEMENT M., POSADA D., CRANDALL K.A. 2000 - TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol., 9: 1657-1659.
- COTTRELL J., MUNRO R.C., TABBENER H.E., GILLIES A.C.M., FORREST G.I., DEANS J.D., LOWE A.J. 2002 - Distribution of chloroplast DNA variation in British oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*): the influence of postglacial colonization and human management. For. Ecol. Manage., 156: 181-195.
- CRANDALL K.A., BININDA-EMONDS O.R., MACE G.M., WAYNE R.K. 2000 - Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends Ecol. Evol., 15: 290-295
- DARWIN C. 1859 - On the Origin of the Species by Means of Natural Selection. Murray, London.
- DAVIS A.L.V., SCHOLTZ C.H., PHILLIPS T.K. 2002 - Historical biogeography of scarabaeinae dung beetles. J. Biogeogr., 29: 1217-1256.
- FRY A.J., ZINK R.M. 1998 - Geographic Analysis of Nucleotide Diversity and Song Sparrow Population History. Mol. Ecol., 7: 1303-1313.
- GRATTON P., KONOPINSKI M.K., SBORDONI V. 2008 - Pleistocene evolutionary history of the Clouded Apollo (*Parnassius mnemosyne*): genetic signatures of climate cycles and a 'time-dependent' mitochondrial substitution rate. Mol. Ecol., 17: 4248-4262.
- GUICKING D., JOGER U., WINK M. 2008 - Molecular phylogeography of the viperine snake *Natrix maura* (Serpentes: Colubridae): Evidence for strong intraspecific differentiation. Organisms, Divers. Evol., 8: 130-145.
- HARDIG T.M., BRUNSFELD S.J., FRITZ R.S., MORGAN M., ORIANI C.M. 2000 - Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. Mol. Ecol., 9: 9-24.

- 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. 1999 - Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.*, 68: 87-112.
- HEWITT G.M. 2000 - The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-913.
- HEWITT G.M. 2001 - Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Mol. Ecol.*, 10: 537-549.
- HEWITT G.M. 2004 - Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Trans. R. Soc. Lond. B*, 359: 183-195.
- 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., LARSON G. 2006 - Molecular clocks: When times are a-changin'. *Trends in Genetics*, 22: 79-83.
- HUELSENBECK J.P., RONQUIST F. 2001 - MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- JANSSENS A. 1949 - Contribution à l'étude des Coléoptères Lamellicornes. Table synoptique et essai de classification pratique des Coléoptères scarabaeidae. *Bull. Roy. Sci. Nat. Belg.*, 25: 1-30.
- JAAROLA M., TEGELSTRÖM H. 1995 - Colonization history of north European field voles (*Microtus agrestis*) revealed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.*, 4: 299-310.
- JIN L., NEI M. 1991 - Relative efficiencies of the maximum-parsimony and distance-matrix methods of phylogeny construction for restriction data. *Mol. Biol. Evol.*, 8: 356-365.
- JUKES T.H., CANTOR C.R. 1969 - Evolution of protein molecules. In: Munro H.N. (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York: 21-132.
- KUMAR S., TAMURA K., JAKOBSEN I.B., NEI M. 2001 - MEGA 2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- KVIST L., MARTENS J., AHOA A., ORELL M. 2001 - Phylogeography of a Palaearctic sedentary passerine willow tit (*Parus montanus*). *J. Evol. Biol.*, 14: 930-941.
- LAIRD P.W., ZIJDERVELD A., LINDERS K., RUDNICKI M.A., JAENISCH R., BERNS A. 1991 - Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acid Research*, 19 (15): 4293.
- LOHSE G.A., LUCHT W.H. 1992 - Die Käfer Mitteleuropas. Vol. 13. Krefeld, Germany: Goecke and Evers.
- MAGRI D. 2008 - Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *J. Biogeogr.*, 35, 3: 450-463.
- MARTIN-PIERA F., LOPEZ-COLON J.I. 2000 - Coleoptera, Scarabaeoidea I. In: Ramos M.A. et al. (eds.), *Fauna Iberica* vol. 14. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid.
- MASINI F., PETRUSO D., BONFIGLIO L., MANGANO G. 2008 - Origination and extinction patterns of mammals in three central Western Mediterranean islands from the Late Miocene to Quaternary. *Quaternary International*, 182: 63-79.
- MOCZEK A.P., EMLÉN D.J. 1999 - Proximate determination of male horn dimorphism in the beetle *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Evol. Biol.*, 12: 27-37.
- NEI M. 1972 - Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
- NYLANDER J.A.A. 2004 - MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- PAULIAN R., BARAUD J. 1982 - Faune des Coléoptères de France. Lucanoidea et Scarabaeoidea, Vol. II. Ed. Lechevalier S.A.R.L., Paris, 477 pp.
- PIZZO A., ROGGERO A., PALESTRINI C., CERVELLA P., DEL PERO M., ROLANDO A. 2006 - Genetic and morphological differentiation patterns between sister species: the case of *Onthophagus taurus* and *Onthophagus illyricus* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 89: 197-211.
- RIBERA I., VOGLER A.P. 2004 - Speciation of Iberian diving beetles in Pleistocene refugia (Coleoptera, Dytiscidae). *Mol. Ecol.*, 13: 179-193.
- REE R.H., MOORE B.R., WEBB C.O., DONOGHUE M.J. 2005 - A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution*, 59 (11): 2299-2311.
- REE R.H. 2005 - LAGRANGE: Likelihood analysis of geographic range evolution Version 1.0.1.
- REE R.H., SMITH S.A. 2008a - Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Syst. Biol.*, 57 (1): 4-14.
- REE R.H., SMITH S.A. 2008b - LAGRANGE: Likelihood analysis of geographic range evolution Version 1.0.1.
- ROY K., VALENTINE J.W., JABLONSKI D., KIDWELL S.M. 1996 - Scales of climatic variability and time averaging in Pleistocene biotas: implications for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 458-463.
- RONQUIST F. 1996 - DIVA, version 1.0. Computer program for MacOS and Win32. Available from www.syst-bot.uu.se/personel/f-ronquist.html
- RONQUIST F., HUELSENBECK J.P. 2003 - MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- RULL V. 2009 - Microrefugia. *J. Biogeogr.*, 36: 481-484.
- SANDERSON M.J. 1997 - A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 1218-1231.

- SANDERSON M.J. 2004 - R8S version 1.70. University of California, Section of Evolution and Ecology, Davis, CA, USA.
- SAITOU N., NEI M. 1987 - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- SKOG A., ZACHOS F.E., RUENESS E.K., FEULNER P.G.D., MYSTERUD A., LANGVATN R., LORENZINI R., HMWE S.S., LEHOCZKY I., HARTL G.B., STENSETH N.C., JAKOBSEN K.S. 2009 - Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *J. Biogeogr.*, 36: 66-77.
- SWOFFORD D.L. 2002 - PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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.
- TEMPLETON A.R. 1998 - Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.*, 7: 381-397.
- TEMPLETON A.R., BOERWINKLE E., SING C.F. 1987 - A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonucleases mapping. I. Basic theory and an analysis of Alcohol Dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117: 343-351.
- TEMPLETON A.R., CRANDALL K.A., SING C.F. 1992 - A cladistic analysis of phenotype association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.
- TEMPLETON A.R., SING C.F. 1993 - A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659-669.
- ZILHÃO J. 2001 - Radiocarbon evidence for maritime pioneer colonization at the origins of farming in west Mediterranean Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 14180-14185.