

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

DNA barcoding per l'identificazione di farfalle *Erebia euryale* nelle prealpi bellunesi

Relatore: Prof. Alessandro Grapputo

Laureanda: Valentina Angiari Nr. Matricola: 2009331

Anno Accademico 2022/2023

Indice

Abstract2
Introduzione
Il DNA barcoding
Le Nymphalidae: <i>Erebia euryale</i> ed <i>Erebia ligea</i> 4
Scopo della tesi
Materiali e metodi
I campioni
Estrazione del DNA6
Amplificazione del DNA7
Purificazione e sequenziamento del DNA8
Analisi e allineamento delle sequenze
Risultati10
Analisi filogenetica11
Distanze genetiche
Discussione24
Bibliografia

Abstract

Molto spesso non è semplice identificare le specie quando queste sono morfologicamente molto simili e vivono in simpatria. Tra i lepidotteri, il genere *Erebia* mostra delle specie morfologicamente simili che si sovrappongono nella loro distribuzione geografica e quindi difficili da distinguere in maniera assoluta sia sul campo che in laboratorio. Quindi, un metodo al quale si ricorre spesso è quello dell'identificazione molecolare attraverso il DNA barcoding. Negli animali il DNA barcoding utilizza il sequenziamento di una porzione in 5' del gene mitocondriale per la citocromo ossidasi I (COI). Il protocollo prevede diversi passaggi, tra cui l'estrazione del DNA da una parte del corpo dell'individuo, l'amplificazione della porzione del gene COI ed il suo sequenziamento. Infine, le sequenze ottenute vengono confrontate con le sequenze presenti all'interno di una banca dati di riferimento per il DNA barcoding per trovare una corrispondenza e permettere l'identificazione di specie.

I risultati non indicano una chiara distinzione delle due specie prese in esame, *E. ligea* ed *E. euryale*. Inoltre, analizzando le distanze genetiche si è osservato che tra i gruppi considerati (*E. ligea*, *E. euryale* e i campioni bellunesi) questa era molto elevata entro i campioni di *E. ligea* e tra *E. ligea* e gli altri due gruppi. Il gruppo dei campioni bellunesi mostrava bassa diversità genetica, simile ai campioni di *E. euryale* suggerendo che i campioni bellunesi rappresentano un'unica specie appartenente a *E. euryale*.

Introduzione

II DNA barcoding

Il DNA barcoding è una tecnica usata in biologia molecolare per l'identificazione delle specie basata sulla loro sequenza di DNA. In questa metodologia viene utilizzata una specifica regione del DNA, la quale viene definita come un "codice a barre" universale per l'identificazione delle specie animali (Hebert et al., 2003a). Quello che viene impiegato è il frammento in 5' di un gene standard che corrisponde al gene mitocondriale della citocromo ossidasi subunità I (COI) (Herbert et al., 2003a). Questa porzione in 5' della COI ha una lunghezza di circa 650-658 paia di basi (bp) ed ha due vantaggi (Herbert et al., 2003a): 1) la robustezza dei primers, 2) un tasso di sostituzione maggiore rispetto ad altri geni mitocondriali.

La tecnica del DNA barcoding si avvale di diversi passaggi:

- estrazione del DNA dall'individuo sconosciuto che viene ottenuto da un piccolo campione di tessuto;
- amplificazione della specifica regione del gene COI tramite l'utilizzo di primers appropriati e della reazione a catena della polimerasi (PCR), la quale permette di replicare milioni di volte questa regione del DNA;
- sequenziamento del campione di DNA amplificato nella fase precedente. La sequenza ottenuta rappresenta il suo "codice a barre";
- utilizzo della libreria Barcode of Life Data System (BOLD) (Ratnasingham e Hebert, 2007) per confrontare la sequenza di DNA ottenuta dal campione iniziale con quelle presenti nel database per trovarne una corrispondenza e identificarne la specie.

Il DNA barcoding aiuta nell'identificazione delle specie in quanto le divergenze di sequenza sono tali da permettere la discriminazione di specie strettamente affini (Hebert et al. 2003a; Hebert et al. 2004). Viene utilizzato spesso in diversi taxa animali, tra cui i lepidotteri, un gruppo con un'elevata diversità di specie (Herbert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b). Nonostante i lepidotteri siano molto speciosi, hanno una diversità molecolare tra specie molto più bassa rispetto ad altre specie animali. Infatti, mentre in altre specie animali si trova una distanza genetica media di circa il 2%, nei lepidotteri è solamente di circa l'1% (Hebert, 2004), il che può rendere l'utilizzo del DNA barcoding più problematico.

Le Nymphalidae: Erebia euryale ed Erebia ligea

La famiglia delle Nymphalidae presenta diverse sottofamiglie, tra cui quella delle Satyrinae, la quale comprende circa 2500 specie distribuite in tutto il mondo (Peña e Wahlberg, 2008). A questa sottofamiglia appartiene il genere *Erebia* che conta circa 100 specie descritte (Peña et al., 2015), due tra queste, *Erebia euryale* (Esper, 1805) ed *Erebia ligea* (Linnaeus, 1758), sono morfologicamente molto simili e difficili da distinguere.

La caratteristica che accomuna questi lepidotteri del genere *Erebia* è quella di avere la pagina superiore delle ali con una colorazione di fondo marrone in cui sono presenti degli ocelli, delle macchie arancio/gialle più o meno definite. La pagina inferiore delle ali, invece, presenta una colorazione più variabile, ma sono sempre presenti ocelli più o meno definiti. Molto spesso la variabilità di colorazione tra gli individui di una stessa specie può essere molto grande, talvolta superiore a quella tra specie, come succede nel caso delle due specie *E. euryale* ed *E. ligea*. Per tale motivo, l'identificazione dei singoli individui solamente su base morfologia potrebbe risultare molto difficile. Si ricorre, quindi, ad un'identificazione attraverso altri metodi, ed uno di questi è il DNA barcoding.

Anche la distribuzione geografica di queste due specie è molto simile con molte zone in cui le specie sono simpatriche. *E. euryale* è presente in tutta Europa ed in Italia su tutto l'arco alpino.

Anche *E. ligea* è distribuita in tutta Europa ed in Italia principalmente nelle alpi, ma è possibile trovarla anche nell'estremo oriente, fino in Giappone.



Figura 1. A sinistra è rappresentato un individuo di *Erebia euryale*, mentre a destra un individuo di *Erebia ligea*.

Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è identificare la specie di lepidotteri *E. euryale* nelle prealpi bellunesi e distinguerle dalla specie *E. ligea* attraverso il DNA barcoding. Le varie sequenze ottenute da questo lavoro sono state confrontate con le sequenze di individui identificati come *E. euryale* e con quelle della specie affine e simpatrica di *E. ligea* entrambe presenti nel database del BOLD system. Il confronto delle sequenze di barcoding delle due specie affini mi ha permesso di analizzare la diversità esistente entro e tra le due specie e capire il potenziale del DNA barcoding come marcatore per distinguere e identificare queste due specie.

Materiali e metodi

I campioni

Lo studio è stato svolto su 20 individui di lepidotteri della specie *E. euryale*, appartenente alla famiglia delle Nymphalidae. Questi campioni sono stati raccolti in Italia nell'estate del 2022 sulle dolomiti bellunesi tramite dei metodi di raccolta che prevedevano l'utilizzo di acetato di etile, successivamente tenuti a secco e poi conservati in freezer.



Figura 2. A sinistra è rappresentata la mappa del Veneto, in cui vengono indicate in verde le dolomiti bellunesi, mentre a destra, sempre in verde, è rappresentata una mappa al dettaglio in cui sono stati raccolti i campioni.

Estrazione del DNA

Da ciascuno dei 20 individui è stato separato il torace dal resto del corpo, il quale ne è stato utilizzato solamente metà per l'estrazione del DNA. Il mezzo torace di ogni individuo è stato sminuzzato ed inserito all'interno di provette eppendorf e successivamente è stato seguito il protocollo del Qiagen DNA-Tissue Kit. Alla fine, per ogni campione, sono state eseguite tre eluizioni con 50 μ L di soluzione AE fornita nel kit di estrazione e per ognuna di queste è stata controllata la quantità di DNA estratto attraverso lo spettrofotometro Nanodrop misurando l'assorbanza a 260 nm e il grado di purezza valutato in base al rapporto di assorbanza a 260/280 nm e a 260/230 nm, ed infine è stata misurata la concentrazione di DNA estratto in $ng/\mu L$ al fluorimetro Qubit.

Amplificazione del DNA

Per ogni campione è stata scelta una sola eluizione, dalla quale è stato amplificata la porzione in 5' del gene mitocondriale COI, attraverso la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR).

Per ogni campione è stata preparata una master-mix in un volume totale di 20 μ L. Questa miscela di reazione conteneva:

- 13,4 µL di H₂O
- 2 µL di Buffer 10x
- 0,4 µL di primer COI-F 10 µM
- 0,4 µL di primer COI-R 10 µM
- 1,6 µL di dNTPs 2,5 mM ognuno
- 0,2 μ L di EasyTaq DNA Polymerase (1U/ μ L)
- 2 µL di DNA (20 ng)

Le condizioni di reazione prevedevano un primo ciclo di denaturazione a 94°C per 2 minuti seguito da 25 cicli che comprendevano una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di annealing a 52°C per 30 secondi, una fase di estensione a 72°C per 1 minuto ed infine un ciclo finale di estensione a 72°C per 5 minuti.

I prodotti di PCR sono stati verificati attraverso la corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1%, nel quale è stato aggiunto il Loading dye necessario a visualizzare alla luce ultravioletta i frammenti di DNA amplificati.

Purificazione e sequenziamento del DNA

Il DNA di ogni campione ottenuto dalla PCR è stato trattato tramite ExoSAP-IT, il quale viene utilizzato per la purificazione enzimatica dei prodotti amplificati. Il protocollo prevede l'aggiunta di 1 μ L di Exo e di 1 μ L di SAP a 5 μ L di prodotto di PCR e successivamente l'incubazione dei campioni a 37°C per 5 minuti per l'attivazione degli enzimi e poi a 80°C per 10 minuti per la loro inibizione.

I prodotti ottenuti dalla purificazione sono stati poi preparati per il sequenziamento all'Eurofins Genomics seguendo il protocollo Mix2Seq Kit, il quale prevede per ogni campione un volume totale di 10 μ L formato da 2 μ L di DNA purificato miscelato a 2,5 μ L Primer COI-F 10 μ M e 5,5 μ L di H₂O.

Analisi e allineamento delle sequenze

L'Eurofins Genomics ci ha fornito i risultati delle sequenze di ogni campione sotto forma di file ab1. Questi sono stati aperti nel software Geneious (Biomatters Ltd) e per ogni sequenza ne è stato controllato il cromatogramma per verificarne la qualità. In seguito, le sequenze sono state pulite alle due estremità da eventuali errori di sequenziamento e da eventuali basi spurie.

Successivamente sono state scaricate in formato FASTA tutte le sequenze presenti in BOLD system (Barcode of Life Data System) appartenenti a *E. euryale* e a *E. ligea* ed incluso un outgroup, *Hipparchia semele*, un lepidottero anch'esso appartenente alla famiglia delle Nymphalidae. Tutte queste sequenze sono state importate in Geneious.

Le sequenze scaricate, l'outgroup e 9 delle sequenze ottenute dai 20 campioni sono state allineate con Clustal Omega (Sievers et al., 2011) sempre in Geneious ed infine dall'allineamento è stato ottenuto un albero filogenetico con il metodo del Maximum Likelihood con il programma FastTree (Price et al., 2009). Successivamente è stato utilizzato un metodo basato sulla teoria della coalescenza, il Poisson-Tree Processes (PTP; Zhang et al, 2013), il quale permette una delimitazione automatica delle specie. Questo metodo è stato applicato al dataset COI inserendo come file di input l'albero ottenuto dal programma FastTree, ma escludendo l'outgroup.

Risultati

Dai 20 individui estratti sono state ottenute delle buone sequenze del frammento 5' del gene COI da 9 di essi. A queste sequenze sono state aggiunte quelle scaricate dal BOLD system ottenendo un totale di 384 sequenze ed un allineamento di 639 paia di basi.

Dall'analisi delle sequenze, in totale sono stati trovati 148 aplotipi diversi con il software DAMBE (Xia, 2018). Tra le 9 sequenze ottenute dai campioni prelevati nelle prealpi bellunesi sono stati trovati 2 aplotipi diversi, mentre tra i campioni depositati come *E. ligea* ed *E. euryale* nel database BOLD, sono stati trovati rispettivamente 74 e 79 aplotipi diversi. La somma degli aplotipi di *E. ligea*, *E. euryale* e dei campioni bellunesi è superiore al numero di aplotipi totali in quanto alcuni erano identici tra le due specie. Successivamente sono stati ottenuti il numero di aplotipi per ogni popolazione (Tabella 1).

Popolazione	N° di sequenze	N° di aplotipi
Italia	140	46
Austria	29	11
Francia	47	19
Germania	11	9
Spagna	13	7
Svizzera	19	17
Grecia	1	1
Andorra	1	1
Regno Unito	1	1

Tabella 1. Numero di individui presenti in ogni popolazione con il corrispondente numero di aplotipi.

Svezia	3	3
Finlandia	8	5
Norvegia	3	3
Macedonia	6	4
Polonia	3	3
Repubblica Ceca	5	3
Romania	19	8
Russia	11	10
Serbia	3	3
Slovacchia	20	13
Cina	1	1
Giappone	21	14
Mongolia	2	2

Analisi filogenetica

L'albero filogenetico ottenuto con il programma FastTree (Figura 3) indica che non è presente una chiara distinzione tra cluster specie-specifici, ad eccezione di alcuni gruppi più basali all'albero (ad esempio i cluster A e C), ai quali appartengono esclusivamente individui di *E. ligea*. Tutti gli altri cluster contengono campioni di entrambe le specie, quindi, sia di *E. ligea* che di *E. euryale*.



 P. F. FAMAL (See Jacob SPACED) External. Sett Sate Sett Set Set Set Set Set Set Set Set
 Personal States (acc) SPARIABLE Section Cauchy Constant, States (acc) Section (acc) Sec
 Anstell, Effecti (perc) SPARTERS — The target beam from the program of the program
 Marcella State Japotol (SPMINISH)
 Pressent J. Sector, March J., Press J., Santa M., Jang J., Southens, J., Santa J.,
 ALUST2 (Zeibel (pact) SP. Level (Schward), Schwards (Schwards), Schwards), Schwards (Schwards), Schwards (Schwards), Schwards (Schwards), Schwards), Schwards (Schwards), Schwards), Schwards (Schwards), Schwards), Schwards (Schwards), Schwards), Schwards (Schwards), Sch
 C.L.Z.241, Openal (Med.) Symm. Nucl. Scattering Conducting C.L.Z.241, Openal (Med.) Symm. Nucl. Scattering, Conducting Scattering C.L.Z.241, Openal (Med.) Symm. Nucl. Scattering, Conducting Scattering C.L.Z.241, Openal (Med.) Symm. Nucl. Scattering, Conducting Scattering, Conducting, C
 LEDERGD Jelend Jpaco JP. CommBold , Hudimers LEDERGD Jelend Jpaco JP. Montesta _ FrancDevice LEDERGD JELEND JPACO JP. Montesta _ Device _ JPACO JP. Montesta _ JPACO JPAC JPACO JP. Montesta _ JPACO JPACO
 C. Loszino, Zabela (Jesu) (PriOLEXAL_Bit)_restore C. Loszino, J. Schell (
 Wellikk, 1998. (Special park). Symithetic Faron, Proven Ales Cate Alex, Youkies Wellikk, 1998. (Special park). Symithetic Faron, Sovie C. (2002). Stepial park). Symithetic Faron, Sovie E. (2003). Stepial park). Symithetic Faron, Sovie Faron, Sovie E. (2004). Stepial park). Symithetic Faron, Sovie Faron, Sovie E. (2004). Stepial park). Symithetic Faron, Sovie Faron, Bard E. (2004). Stepial park). Symithetic Faron, Sovie E. (2004). St
 MESSI, Methal (Jacob) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString_Bizzon CHEEDEZ, Strake (Unprice) SPINTESC _ Int _ Testing / MudpoString _
CUECCC2 Status synactic SMITHSSID_International Advancements FLERED Status Status Synaptic SMITHSSID_International Synaptic Status FLERED Status Status Status Status Status Status FLERED Status Status Status Status Status Status FLERED Status Statu
ElicP23, 15584, parcio, SPMIN303,
 Constant, Special, Symphol Sympholics, Barling Alexand, Barlandi Barlandi, Barlandi Barlandi, Status, Special, Barlandi, Special, Symphol Symphol Symphol Barlandi, Status, Special, Barlandi, Special, Symphol S
 Percence (Sector (Sector (Sector)) Percence (Sector) P
 EUL2701, 15/ERR applied, 99/M0256 EUL2703, 15/ERR applied, 99/M0256 EXROLS, Dietaka Lyaco, 99/M02562 EXROLS, Bietaka Lyacob, 99/M02562
 PLEPSN: Sector JpenCi SPMONENT, Turcetonic Screen, Michael Excellent JpenCi SPMONENT, Turcetonic Screen, Michael Excellent JpenCi SPMONENT, Turcetonic Screen, Michael Excellent JpenCi SPMONENT, Turcetonic Screen, Michael Cautorden Juscetonic JpenCi SPMONENT, Turcetonic Screen, Michael Cautorden Juscetonic JpenCi SPMONENT, Turcetonic Screen, Janet JpenCi SPMONENT, Turcetonic Screen, Janet JpenCi SPMONENT, Turcetonic JpenCi SPMONENT, T
 E.R.OWAZ, BJERSER, USACO, SPHOMAND, Lonzing, Carab. Weinther, Linkshow, L
 P. 42: UDISSE 225551 (bject) 2.9. Svala _ Zinch, Mark P. 2012 P183, 15554a Upa(C) 5.9. MORES_ Bana _ Antexports P. 2012 P183, 15554a Upa(C) 5.9. MORES_ Bana _ Cara, Sverin_Bani P. 20032, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Cara, Sverin_Bani P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Cara, Sverin_Bani P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Cara, Sverin_Bani P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Cara, Sverin_Bani P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Cara, Sverin_Bani P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Cara, Sverin_Bani P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Lancolas _ Trasylvana P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Lancolas _ Trasylvana P. 200423, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Lancolas _ Trasylvana P. 200427, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Lancolas _ Trasylvana P. 200427, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Lancolas _ Trasylvana P. 2004174, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Lancolas _ Trasylvana P. 2004174, UDIStata Upa(C) 5.9. MORES, Bana _ Lancolas _ Dela Mores, UDIST, Bana _ Mores, UDIST, Bana _ Mores, UDIST, Bana _ Dela Mores, UDI
Comparing a series of the
<pre>Community Community C</pre>
EXCHANCE VERSION SPHCODE VERSION SPHCAL VERSION SPHCA
 LEMURE2 (Belete, genetic). SPH00449montalcrass_sevenbatel L2000481 (Belete). genetic). SPH078245bbimethodsTransylvania L2000481 (Belete). genetic). SPH078245bbimethodsTransylvania L2000481 (Belete). genetic). SPH078245bbimethodsN. AppSouthdiTrads URES23, HEreba. genetic). SPH078247bbimethodsN. AppSouthdiTrads URES23, HEreba. genetic). SPH078247bbimethods.genetic. Delaborat. genetic URES23, HEreba. genetic). SPH078247bbimethods.genetic. URES23, HEreba. genetic). SPH078247bbimethods.genetic. URES23, HEreba. genetic). SPH078247bbimethods.genetic. URES23, HEReba. genetic). SPH078247bbimethods.genetic. URES23, HEReba. genetic). SPH078235bbipetic ED000482, HEREba. genetic). SPH078235bbipetic ED000482, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED000482, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001482, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001482, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001482, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001483, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001483, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001484, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001484, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001484, HEREba. genetic). SPH078335bbipetic ED001484, HEREba. genetic). SPH078332bbipetic ED001484, HEREba. genetic). SPH078332bbipetic ED001484, HEREba. genetic). SPH078330bbipetic ED001484, HEREba. genetic). SPH078330bbipetic ED0001485, HEREba. genetic). SPH078330bbipetic ED10001485, HEREba. genetic). SPH078330bbipetic ED1001444, HE
 PERCINAST, UBERBAL UPBECOL SPINOVANU, Tennam, Hundowa, Transylama E270,MKS, 05Erbal, UPBECOL SPINOVANU, Tennam, Hundowa, Transylama E270,MKS, 05Erbal, UPBECOL SPINOVANU, Tennam, Hundowa, Transylama E270,MKS, 05Erbal, UPBECOL SPINOVASU, Tennam, Markadas, Transylama UMESO2, 14Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tentino, Ma, AdepSolution, Tendo CUEPESDB, 16Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tentino, Ma, AdepSolution, Tendo CUEPESDB, 16Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tentino, Ma, AdepSolution, Tendo CUEPESDB, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tentino, Ma, AdepSolution, Tendo ELLESSD, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tentino, Ma, AdepSolution, Tendo ELLESSD, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tentino, Ma, AdepSolution, Tendo ELLESSD, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tenton, Ma, AdepSolution, Tendo ELLESSD, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tendon, Ma, AdepSolution, Tendo ELLESSD, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tendon, Ma, AdepSolution, Tendo ELLESSD, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Tah, Tendon, Ma, AdepSolution, Tendo ELLESSD, 15Erbal, upseloCU SPINITSS3D, Jakan ELLESSD, 1
1 EZCONSTS, BEDERLE, Jasej CO, SPINOTSKAT, Jannan, Januaca, Tanayakai Kato, Jasep Jan, Januar, Januaca, Tanayakai Kato, Jasep Januar, Januara, Januara, Tanayakai Kato, Jasep Januar, Januara, Tanayakai Kato, Jasep Januar, Januara, Janu
<pre>ubcode control co</pre>
 AULEED22, 15Ebble, surgielCO, SPMIT72645, Tail, Testino, Alto, AdgeSuttori, Testio CUED239, 15Ebble, surgielCO, SPMIT72640, Tail, Testino, Alto, AdgeSuttori, Testio CUED239, 15Ebble, surgielCO, SPMIT72647, Tail, J. Pottonom, Veetol EULEP30, 15Ebble, anguielCO, SPMIT72647, Tail, J. Pottonom, Veetol EULEP30, 15Ebble, anguielCO, SPMIT5207, Sansa, Doku, Taila, Sansa, Sansa, Taila, Sansa, Doku, Taila, Sansa, Sans
UPC2001 [Indexa, supervol. gr/m170240largindexidindex_ UPC2023 [Indexa, supervol. gr/m170240largindex_ UPC2023 [Indexa, supervol. Gr/m170240larg_index_ UPC2023 [Indexa, supervol. Sr/m170240larg_index_ UPC2023 [Indexa, supervol. Sr/m170222larg_index_ UPC2023 [Indexa, supervol. Sr/m170224larg_index_ UPC2023 [Indexa, supervol. Sr/m170234larg_index_ UPC2023 [Indexa, supervol. Sr/m170234_
CUEPD27: 16E1bits_euryleCO_SPMIN50022_Russ_Pole_Uni CUEPD27: 16E1bits_euryleCO_SPMIN50022_Russ_Pole_Uni CUEPD27: 16E1bits_euryleCO_SPMIN50022_Russ_Pole_Uni CUEPD27: 16E1bits_euryleCO_SPMIN50022_Russ_Collest_Cheldhist_otelst CUEPD27: 16E1bits_euryleCO_SPMIN50032_Genes_Dana EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EUL2P305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50035_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50030_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50030_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50030_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50030_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Entrans_ EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Bugins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN50232_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5032_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5032_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5033_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5033_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5033_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5033_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5033_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5033_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN5033_Busins EULEP305: 15E1bits_euryleCO_SPMIN503
101 PRUEPSU, Tiebela, euryaleucu, SymWoold, Z., Fussa, C., Politanisa, Ottat, Cheldonsi, oblat, PLUEPSU, Tiebela, euryaleucu, SymWoold, S., Burgan, PULEPSU, Tiebela, euryaleucu, SymWoold, S., Burgan, PULEPSU, Tiebela, euryaleucu, SymWoold, Burgan, Berkintha PULEPSU, Tiebela, euryaleucu, SymWoold, Status, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Status, Extention, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Status, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Status, Karela, Loreals, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Status, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Status, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Status, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Towal, Karela, Karela, Loreals, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Towal, Hondan, Tow PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Towal, Hondan, Towald, PULEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Towal, Hondan, Taraykana PULEPSU, PUEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Stecha PULEPSU, PUEPSU, Stecha, Burgalou, SymWoold, Stechan, Towala, PULEPSU, Tiebela, Burgalou, SymWoold, Taruton, Ahu AdgeSudton, Thei PULEPSU, Tiebela,
LEFUES, 10Exbet, anyselCO, SPUKSONG, Setus, Constanting, Otast, Chelabinst, oblast FULEPSA, 15Exbet, anyselCO, SPUKSONG, Setus, FULEPSA, 15Exbet, anyselCO, SPUKSONG, Setus, FULEPSA, 15Exbet, anyselCO, SPUKSONG, Setus, FULEPSA, 15Exbet, anyselCO, SPUKSONG, Setus, FULEPSA, 15Exbet, anyselCO, SPUKSONG, Macchini EULEPSA, 15Exbet, anyselCO, SPUKSONG, Mac
 PULEPS0, 15/Eda aurole(D), SPIMV50057_Genec, Dana PULEPS4, 15/Eda aurole(D), SPIMV50058_General, PULEPS4, 15/Eda aurole(D), SPIMV50058_Macchon PULEPS4, 15/Eda aurole(D), SPIMV50058_Macchon PULEPS4, 15/Eda aurole(D), SPIMV50058_Macchon PULEPS4, 11/Eda aurole(D), SPIMV50059_Seta PULEPS2, 15/Eda aurole(D), SPIMV50059_Benal, Seta PULEPS2, 15/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5022_Fead, North Karela, Karela, boreals PULEPS2, 15/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5023_Fead, Seta PULEPS2, 15/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5023_Fead, Seta PULEPS2, 15/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5023_Seta PULEPS2, 15/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5023_Seta PULEPS2, 15/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5023_Seta PULEPS2, 11/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5037_Seta PULEPS2, 11/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5035_Feta, 14, 14000, 34004016 PULEPS2, 11/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5035_Feta, 14000, 34004016 PULEPS2, 11/Eda aurol, 1940(D), SPIMV5035_Feta, 14000, 3
PELEPSS 15/Ebit gender (C) SPIMINSONS7_Grees_Dama EULEPSS 15/Ebit gender(C) SPIMINSONS7_Grees_Dama EULEPSS 15/Ebit gende(C) SPIMINSONS7_Grees_Dama EULEPSS 15/Ebit gende(C) SPIMINSONS7_Grees_Dama EULEPSS 15/Ebit gende(C) SPIMINSONS7_Macdonia EULEPSS 15/Ebit gende(C) SPIMINSONS7_Macdonia EULEPSS 15/Ebit gende(C) SPIMINSONS7_Batteria EULEPSS 15/Ebit gend(C) SPIMINSONS7_Batteria EULEPSS 15/Ebit gend(C
 EULER98, Silebia, engleCOL, SPIMWS0286, Buggins EULEP936, Silebia, engleCOL, SPIMWS0286, Buggins PRULEP385, Silebia, engleCOL, SPIMWS0286, Macadonis EULEP385, Silebia, engleCOL, SPIMWS0286, Macadonis PULEP385, Silebia, engleCOL, SPIMWS0286, Macadonis PULEP385, Silebia, engleCOL, SPIMWS0288, Macadonis PULEP385, Silebia, engleCOL, SPIMWS0288, Macadonis PULEP385, Silebia, engleCOL, SPIMWS0288, Macadonis EULEP385, Silebia, engleCOL, SPIMWS0288, Macadonis EULEP385, Silebia, Bapaci, SPIL-X222, Entant, Jonth, Karela, Karela, borealis EULEP385, Silebia, Bapaci, SPIL-X223, Finitant, Jonth, Karela, Karela, borealis EVENDE930, Zilebia, Bapaci, SPIL-X2342, Monglia EVENDE930, Zilebia, Bapaci, SPIL-X2343, Savaka EVENDE930, Zilebia, Bapaci, SPIL-X3434, Savaka, Tarsyky Kay EVENDE931, SPIE-Bia, Bapaci, SPIL-X3434, Savaka, Tarsyky Kay EVENDE931, SPIE-Bia, Bapaci, SPIL-X3444, Monther, Savaka, Jarsyky Kay EVENDE931, SPIE-Bia, Bapaci, SPIL-X3444, Monther, Savaka, Jarsyky Kay EVENDE31, SPIE-Bia, Bapaci, SPIL-X3444, Monther, Savaka, Jarsyky Kay EVEND32, SOERbia, Bapaci, SPIL-X3444, Monther, Savaka, Jarsyky Kay EVEND33, SOERbia, Bapaci, SPIL-X34444, Monther, Statubatia, Expendia, Linebota, Jarseky, Baraka, Savaka, Jarseky, Kay EVEND33, SOERbia, Bapaci, SPIL-X3444444, Monther, Statubatia, Expendsia, Linebota, Jarseky, Baraka, Savaka, Jarseky, Baraka, S
 Industry and approximation of the second seco
EUEP336 ; 6febba euryale(C) ; 5P(MM90259 _Macadonia EUEP336 ; 6febba euryale(C) ; 5P(MM90259 _Macadonia PHL#34) ; 11;Enbia euryale(C) ; 5P(MM90259 _Macadonia PHL#34) ; 11;Enbia euryale(C) ; 5P(MM90259 _Macadonia UEP336 ; 16;Enbia euryale(C) ; 5P(MM90250 _Macadonia UEP336 ; 16;Enbia euryale(C) ; 5P(MM90250 _Macadonia UEP336 ; 16;Enbia euryale(C) ; 5P(MM90250 _Macadonia UEP336 ; 16;Enbia euryale(C) ; 5P(MM90220 _Finland _Month _Karelia _Karelia _borealis
E204/UR021 [Ende upgelc0]. SPM000280_Mackons PALAP34 [11Ende upgelc0]. SPM000280_Mackons PALAP34 [11Ende upgelc0]. SPM000280_Mackons EUEP3050_BitPaths upgelc0. SPM000280_Mackons EUEP3050_BitPaths upgelc0. SPM000280_Mackons EUEP3050_BitPaths upgelc0. SPM000220_FileAnd EUEP3050_BitPaths upgelc0. SPM000220_FileAnd E2060020_BitPaths upgelc0. SPM000220_FileAnd E2060020_BitPaths upgelc0. SPM00020_FileAnd EUEP301_BitPaths upgelc0. SPM00020_FileAnd EUEP301_BitPaths upgelc0. SPM00020_FileAnd EUEP301_BitPaths upgelc0. SPM00020_FileAnd EUEP301_BitPaths upgelc0. SPM00020_FileAnd EUEP301_BitPaths upgelc0. SPM00020_FileAnd EUEP301_BitPaths upgelc0. SPM00020_FileAnd E106000_BitPaths upgelc0. SPM00000_FileAnd E2060002_BitPaths upgelc0. SPM000000_FileAnd E2060002_BitPaths upgelc0. SPM000000_FileAnd E206000000_FileAnd upgelc0. SPM000000_FileAnd
99 99 99 99 90<
 D1 EUEPSA: District, Biol (U.S., PMW3005 9)
EULEPROVE Dijestici liges(CD) SP. Sveden _ Workbern EFFORT: [UEPROVE liges(CD) SP. Sveden _ Workbern EFFORT: [UEPROVE liges(CD) SP. Challed Month Karela_Karela_Loveals EULEPROVE liges(CD) SP. Challed Month Karela_Karela_Loveals EULEPROVE liges(CD) SP. Challed Month Karela_Karela_Loveals EULEPROVE liges(CD) SP. Challed Month Karela_Karela_Loveals EVLEPROVE liges(CD) SP. Challed Month Karela_Kare
LEHUTT, 101etela, lipe2(C), SPI-Mil/2522_Hanam_Norm_Azela, KamaL, Joneass Geology 704, 191etela, lipe2(C), SPI-Mil/2522_Lapland LEUCR01574, 191etela, lipe2(C), SPI-Mil/2523_Lapland LEUCR01574, 191etela, lipe2(C), SPI-Mil/2523_Lapland LEUCR0157, 191etela, lipe2(C), SPI-Mil/2523_Lapland, Linetedora, Transylwana LEUCR0157, 191etela, lipe2(C), SPI-Mil/2523_Land LEUCR0157, 191etela, lipe2(C), SPI-Mil/252_Land LEUCR0157, 191etela, lipe2(C), SPI-Mil/252_Land L
EPUERSiz 2015ereia (paciO) SP _Friand _Land EPUERSiz 2015ereia (paciO) SP _Friand _Karela _Ka
ECHONIS (Interlia (pacc) SPINOR323_Bails EVERSITIE (Interlia (pacc) SPINOR338_Bails EVERSITIE (Interlia (pacc) SPINOR338_Bails EVERSITIE (Interlia (p
 ¹² (FEP112, II)Ereba (peac) (SPIM07282) _ Finind _ North Xeala _ Xeala _ Dorasis (WOTT 30, STecha (peac) (SPIX-2841, _ Storata ¹² (SPIX)(XEA), STecha (peac) (SPIX-2841, _ Storata (XEA), STECHA (Peac), SPIX-040000, _ Torvay, _ Hetman, _ Engend (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-040000, _ Torvay, _ Hetman, _ Engend (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-040000, _ Torvay, _ Hetman, _ Engend (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-040040), _ Romare, _ Storata (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-040400, _ Romare, _ Storata (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-04040), _ Romare, _ Storata (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-04040), _ Romare, _ Storata (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Storata (EUEP271, STECHa (peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Transylvania (ETXXXX, STECHA, peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Transylvania (EFXXXX, STECHA (peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Transylvania (EFXXXX, STECHA (peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Transylvania (EFXXXX, STECHA, peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Transylvania (EFXXXX, STECHA, peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Transylvania (EFXXXX, STECHA, peac) (SPIX-07020), _ Finind, _ Ostorobrina, laipaness, LEFXXXX, STECHA, peac) (SPIX-070404), _ Romare, _ Transylvania (EFXXXX, STECHA, peac) (SPIX-07030), _ Romare, _ Leser, Piland (EXXXXX, STECHA, peac) (SPIX-07030), _ Romare, _ Leser, Piland (EXXXXX, STECHA, peac) (SPIX-07030), _ Romare, _ Leser, Piland (EXXXXX, STECHA, peac) (SPIX-07030), _ Romare, _ Leser, Piland (EXXXXX, STECHA, peac) (SPIX-07030), _ Romare, _ Leser, Piland (EUEPXXX, STECHA, peac) (SPIX-07030), _ Romare, _ Leser, Piland E
Control Ltd. 1964bb. geac.05 PH687479MongingSandau Fights 1964bb. (SPR87479MongingTwo, Bayanchandman_Tov Fights 2016; Ph687479MongingTwo, Bayanchandman_Tov Fights 2016; Ph687479MongingTwo, Bayanchandman_Tov Fights 2016; Ph687479MongingTwo, Bayanchandman_Tov Fights 2016; Ph687479MongingSandau Fights 2016; Ph687479MongingSandau Fights 2016; Ph687479MongingSandau Fights 2016; Ph687499MongingSandau Fights 2016; Ph687499MongingSandau Fights 2016; Ph687499Sandau Fights 2016; Ph68749911; FinlandNorthem, Osthoothmia, _Osthoothma,Schooladhia,S
 Constantial Constantial Constending Constantia Constantian Constantian Constantial Consta
 4 Christe, Michael, Jean Co. SPIN (2014) (2014) 4 Christe, Michael, Jean Co. SPIN (2014) (2014) 4 Christe, Jean Co. SPIN (2014) 4 Christe,
EUEP2114 (Sterbie IgeaICO, SPIMWA9503, Sweden EXTONSIO, 06Erbie IgeaICO, SPIMWA9503, Sweden EZROM0175, 00Erbie IgeaICO, SPIMUA9503, Sweden EZROM0175, 00Erbie IgeaICO, SPIMUA9517, Smedina, Linkeboag, Transylvatia EZROM0175, 00Erbie IgeaICO, SPIMUA95171, Smithan, Linkeboag, Transylvatia EXROM0175, 00Erbie IgeaICO, SPIMUA7121, Finland, Narthem, Ostrobothina, Ostrobot
EULEPATT, 106/Eeta, IgeoCO, SPINN1997T,Norm,Finmark EULEPATT, 106/Eeta, IgeoCO, SPINN1997T,Norm,Finmark EULEPATT, 106/Eeta, IgeoCO, SPINN1997T,Norm,Hondbar,Transylvania EZROND32, 06/Eeta, IgeoCO, SPINN1997T,Norm,Hondbar,Transylvania ERROND32, 06/Eeta, IgeoCO, SPINN19711,Trainad,Nurthen, Ostrobothmia, Ostrobothmia, Ostrobothmia, Ostrobothmia, Distrobothmia, Distrobothmia, Distrobothmia, Distrobothmia, Ostrobothmia, Distrobothmia, Distrobothm
EVENDS: 2016rbits (peotC) SPL Sevelat. Jamitted EVENDS: 2016rbits (peotC) SPL000439. Emmails. Sincara, Mindavia EZROMOSO, 0061rbits (peotC) SPL000439. EmmailsHinoboaraTransylvania EZROMOSO, 0061rbits (peotC) SPL000439. EmmailsHinoboaraTransylvania EXROMOSO, 0061rbits (peotC) SPL000439. EmmailsHinoboaraTransylvania EXROMOSO, 0061rbits (peotC) SPL000439. EmmailsHinoboaraTransylvania EEROLAT, 1076rbits (peotC) SPL00047012. FinitedHonthem, ChrohothinaOchotohina, Chrohothina, Chrohothina, Chrohothina, Lienoboara
Comparing a second
EPROVINTS_09Ereba_lgea(C)_SPUGU7535_commail_Hundbaca_Trans/vania GWOTLTP_13Ereba_lgea(C)_SPUGU7535_commail_Hundbaca_Trans/vania EPROVINTS_09Ereba_lgea(C)_SPUGU7535_commail_Monthem_Ostabothmia_Ostabothmia_ EEFORT_IDEreba_lgea(C)_SPUM07191_Filed_Monthem_Ostabothmia_Ostabothmia_ EEFORT_IDEreba_lgea(C)_SPUM0720_Filed_Monthem_Ostabothmia_Ostabothmia_ EEFORT_IDEreba_lgea(C)_SPUM0720_Filed_Monthem_Interest_ EEFORT_IDEReba_lgea(C)_SPUM07203_Filed_Monthem_Interest_ EEFORT_IDEReba_lgea(C)_SPUM07203_Filed_Monthem_Interest_ EEFORT_IDEReba_lgea(C)_SPUM07232_Filed_Monthem_Interest_ EEFORT_IDEReba_lgea(C)_SPUM07232_Filed_Monthem_Interest_ SPUM077_IDEreba_lgea(C)_SPUM07232_Filed_Monthem_Interest_ EEEFORT_IDEReba_lgea(C)_SPUM07232_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM07323_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM07323_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM07323_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733_Filed_Monthem_Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0733Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0433Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0433Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0433Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0433Interest_ EUEP3840_filed=bage(C)_SPUM0433Interest_
 Vervice z. Juckeds Jayacol SPM Virtis Zalatility LEFROIT, IDENE Jayacol SPM Virtis 21, Fainad _ Northem _Ostbothmia _ Ostbothmia _ Ostbothmia _ Ostbothmia _ Distrobothmia _ Distrob
LEFNO2, VIETeke (pactOL SPHMIR1912, Finlard, Lindhen, Controchnia, Controchnia, Controchnia, Lipericol, SPHMIR1204, Finlard, Controchnia, Lajmensia, LEFNO32, II/Cerke (pactOL SPHMIR1204, Finlard, Kongon, Expland, Controchnia, Lajmensia, LefNo32, JI/Cerke (pactOL SPHMIR1204, Finlard, Kongon, Expland, Contrologenin, ABOLD033, 16(Erekia, IgeaCOL SPHMIR1204, Finlard, Lesser, Poland, SPMIR187, JI/Cerkeia, LgeaCOL SPHMIR1204, Finlard, Lesser, Detablem, PBUMIR197, Lesser, Detablem, Seavaia, Detablem, PBUMIR197, Lesser, Borand, SPMIR197, Lesser, JI/OL Montol, PBUMIR197, Lesser, JI/OL Montol, PBUMIR197, Lesser, JI/OL Montol, PBUMIR197, Lesser, JI/OL Montol, PBUMIR197, JI/Cerkeia, LgeaCOL SPMIN172208, Lastra, Tyrol, Montol, PBUMIR197, JI/Cerkeia, LgeaCOL SPMIN172208, Lastra, Synakhen, Ung Lutesch, SPMIR197, JI/Cerkeia, LgeaCOL SPMIN172, Autor, JI/OL Montol, PBUMIR197, JI/Cerkeia, LgeaCOL SPMIN172208, Lastra, Schwahen, TEUEP3347, 16(Erekeia, LgeaCOL SPMIN17204, Lasi, Tenton, Mo, AdgeSouthor, Treito, Lesser, JI/OL Montol, SPMIR197, JI/Cerkeia, LgeaCOL SPMIN172, Autor, Lastra, Schwahen, TEUEP337, 16(Erekeia, LgeaCOL SPMIN1720, Lastra, JI/Cerkeia, LgeaCOL SPMIN172, Autor, JI/OL Montol, SPMIR1204, Lastra, Schwahen, TEUEP337, 16(Erekeia, LgeaCOL SPMIN1720, Lastra, Schwahen, TEUEP337, 16(Erekeia, LgeaCOL SPMIN173208, Lastra, Schwahen, TEUEP337, 16(Erekeia, LgeaCOL SPMIN17324, Lastra, Schwahen, Seawaia, Oter BBISA2047, JOErekeia, LgeaCOL SPMIN1732, Lastra, Tenton, Mo, AdgeSouthor, Treitor, Starbard, Joeraba, JI/OC JI/OCE, JI/MIR193, JI/Erekeia, LgeaCOL SPMIN1732, Lastra, Schwahen, TEVEP37, 15(Erekeia, LgeaCOL SPMIN17323, Lastra, Schwahen, Seawaia, Oter BBISA2047, JI/Erekeia, Lg
LEFKIGS2, UCENAL JyseLOC SPINTR2525, Finland, Carola Standards, St
<pre>III EFRAGE UBCetta (pageCOL SPUESSISS)mindKatela breaks ZMBMS5771[Ereita (pageCOL SPUESSISS)mindLesser_Piland SPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindLesser_Piland SPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindLesser_Piland SPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindLesser_Piland SPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSPUESSISS_TIFEREI SPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSPUESSISS_TIFEREI SPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSISS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSIS_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSPUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESS)mindSSUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSSUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSSUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSSUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSSUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSSUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)mindSSUESSIST_TIFEREI (pageCOL SPUESSISS)</pre>
LEFKATS 16Ereba lgeaCO_SPMIN4559Holds_Lessr_Nata Exercise Lessr_Nata Exercise Lessr_Nat
Image: Constraint of the second se
POLICIDAD - INCLUDE -
Image: Constraint of the second sec
USENDER USENDER USENDER USENDER USENDER USENDER USENDER PHLAFASS (Tillenia lugaciOC) SPIMIN3388
IPELAPIS, 10Erbia, JapatiCO, SPIMIY3888,ustriaTyrelNorthind, PRLAPIS, 12Erbia, JapatiCO, SPIMIY387236,ustriaTyrelNorthind; UPELAPIS, 12Erbia, JapatiCO, SPIMIY37236,ustriaSun, TyrelNorthind; UPELAPIS, 14Erbia, JapatiCO, SPIMIY37236,ustria UPELAPIS, 14Erbia, JapatiCO, SPIMIY37256,ustria UPELAPIS, 15Erbia, JapatiCO, SPIMIY3256,ustria UPELAPIS, 15Erbia, JapatiCO, SPIMIY3256,ustria UPELAPIS, 20Erbia, JapatiCO, SPIMIY3256,ustria UPELAPIS, 20Erbia, JapatiCO, SPlibly BISSA251, 20Erbia, JapatiCO, SPlibly BISSA251, 20Erbia, JapatiCO, SPlibly BISSA251, 20Erbia, JapatiCO, SPlibly BISSA251, 20Erbia, JapatiCO, SPIMIY4533,libly_Macerbia E UELEPIS7, 15Erbia, JapatiCO, SPIMIY4534,libly_Macerbia E UELEPIS7, 15Erbia, JapatiCO, SPIMIY4534,libly_Macerbia
<pre>IT Province_representation_protocom_moticsse_master_violatereg_umplueBSd_ dBUASS3_12terester_lipeaCO_SPIM_INT2unitstronghordsouther CODEPEX_INTERester_lipeaCO_SPIM_INT2_Souther_IntSouth_trongsouther CODEPEX_INTERester_lipeaCO_SPIM_INT2SA4taitsSouther CODEPEX_INTERester_lipeaCO_SPIM_INT2SA4taitsTentino_Abs_AdgeSouthon_Tent CODEPEX_INTERester_lipeaCO_SPIM_INT2SA4taitsTentino_Abs_AdgeSouthon_Tent CODEPEX_INTERester_lipeaCO_SPIM_INT2SA4taitsTentino_Abs_AdgeSouthon_Tent CODEPEX_INTERester_lipeaCO_SPI_Int2SA4taitsTentino_Abs_AdgeSouthon_Tent CODEPEX_INT2SA4taits_CODESetlipeaCO_SP</pre>
LEPHAT51 Stelete (peetCol.SPMM150394title_South_prod_Southol LEPHAT51 Steleteka (peetCol.SPMM150256Austite UPED256_165etaka (peetCol.SPMM150256Austite) UPED256_165etaka (peetCol.SPM175384title_Tentino_Alto_AdgeSouthol_Tent UPED256_165etaka (peetCol.SPM175384title_Tentino_Alto_AdgeSouthol_Tent UPED256_105etaka (peetCol.SPM175384title_Tentino_Alto_AdgeSouthol_Tent UPED256_105etaka (peetCol.SPM175384title_Tentino_Alto_AdgeSouthol_Tent UPED256_2015etaka (peetCol.SPM175384title_Tentino_Alto_AdgeSouthol_Tentino UPED256_2015etaka (peetCol.SPtitla) UPED256_2015etaka (peetCol.SPtitla) UPED256_2015etaka (peetCol.SPtitla) UPED256_2015etaka (peetCol.SPtitla) UPED256_2015etaka (peetCol.SPM17533_title_UPED256_ UPED256_2015etaka (peetCol.SPM17533_title_UPED256_2015etaka UPED256_2015etaka (peetCol.SPM17533_title_UPED256_2015etaka UPED2565_2015etaka (peetCol.SPM17533_title_UPED25656_2015etakaa) UPED25656_2015etakaa (peetCol.SPM17533_title_UPED256566565656565656565656565656565656566565
LEPHA757 16[Ereba_geny26(C)_5PMK15359labyEnterla ElePhA757 16[Ereba_geny26(C)_5PMK1539labyEnterla ElePhA757 16[Ereba_geny26(C)_5PMK1539labyMacereta ElePhA757 16[Ereba_geny26(C)_5PMK1530labyMacereta
Constant Section 2015 (Section Section 2015) Constant Section 2015 (Section 2015) Constant Section 2015 (S
Cover Cuscaoperand_upperout_primitscadsinityintermot_xnd_xndgeStution(inity_inityinityinityinityinityinityinityinityinityin
BBSX476_20[5telia [bpacO0_5Ptlay BBSX476_20[5telia [bpacO0_5Ptlay BBSX476_20[5telia [bpacO0_5P_tlay BBSX472_20[5telia [bpacO0_5P_tlay BBSX472_20[5telia [bpacO0_5P_tlay BBSX472_20[5telia [bpacO0_5P_tlay BBSX472_20[5telia [bpacO0_5P_tlay EULEP1877_15[5telia [bpacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata EULEP1877_15[5telia [bpacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata WM6580_114[5tbla_5pacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata WM6580_114[5tbla_5pacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata WM6580_114[5tbla_5pacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata WM6580_114[5tbla_5pacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata WM6580_114[5tbla_5pacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata WM6580_114[5tbla_5pacO0_5P_MM1142534_tlay_Macerata WM6580_tlay=Math_c_dtatina
401854251 201Erebia_lipea/COL_SPtay BioSA702.4 201Erebia_lipea/COL_SPtay BioSA702.4 201Erebia_lipea/COL_SPtay BioSA702.4 201Erebia_lipea/COL_SPMIN14533tabPebia_ EULEP1479_15[Erebia_lipea/COL_SPMIN14533tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN14533tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN14533tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN14533tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN14533tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN14533tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN1453tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN14533tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN1453tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN1453tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN1453tabErbia_bay WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN1453tabHaby WIS530_14B_Y WIS530_14Erbia_lipea/COL_SPMIN1453tabHaby WIS530_14B_Y WIS530_14B_
BUSX/22.4_20(=rbits_lpage(C).5Flaty) EULEF1877_15(Erbits_lpage(C)_5F/M142534_ltaty_Macerata EULEF1879_15(Erbits_lpage(C)_5F/M1416458ltaty_Erbits_Romagna_ WM82989_14Erbits_lpage(C)_5F/M141533ltaty_Erbits_Romagna_ WM62980_14E/rbits_lpage(C)_5F/M141533ltaty_Erbits_Romagna_ WM62980_14E/rbits_lpage(C)_5F/M1415433ltaty_Erbits_Romagna_ WM62980_14E/rbits_lpage(C)_5F/M1415434ltaty_Erbits_Romagna_ WM62980_14E/rbits_lpage(C)_5F/M1415444ltaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_RomagnaHtaty_Erbits_Erbi
EULEP1879_15[Efeba: lipeaCOL_SP(MN140599talPebba, WM84999_14Eraba jopaCOL_SP(MN14333taly_Emila:Romagna
Vinukeseo, 14Erota, Josef CU, SHWIN 11333, Italy, Emila, Romagna, WiNdS280, 14Erota, Josef CJ, SFIM 13390, Italy, Macenta LEPAA757_19Erota, euryale(C)_SP_Austra_Carinthia Q 940A47918_20Erota, euryale(CO_SP_Austra_Carinthia
LEPAA757_16[Erebia_euryale]COL_5PIMK186311SwitzerlandValais
II "MDAAT918_20 Erebia_euryale (COI_5PAustria_Carinthia
FR004 COIF FF71717017 ab1
CUPED064_16 Erebia_euryale COI_5P MT762455taly_Alto_Adige
U ^V [®] WMB5108_14 Erebia_euryale COL_5P MN143266ttalyTrentino_Alto_Adige SudtirolTrentino RIRSA1144_15 Erebia_euryale COL_5P MN136528ttaly
* bibSA1144_15[Erebia_euryale]COL_5P]MN138628flaty

 WMB914,13[Erbia,euryale[COL5PIMN13925_Italy_Tuscary_Potola
 GEMIN26667_3[Erbia,euryale[COL5PIMN14133_Ltaly_Pedmont
 BIBSA153_15[Erbia,euryale[COL5PIMN14133_Italy_Pedmont
 BIBSA153_26[Erbia,euryale[COL5PIMN14555_Italy_Pedmont
 BIBSA153_26[Erbia,euryale[COL5PIMN14555_Italy_Pedmont
 BIBSA153_26[Erbia,euryale[COL5PIMN14555_Italy_Pedmont
 BIBSA153_26[Erbia,euryale[COL5PIM1142557_Italy_Veneb_Vcenza
 Erbi056_16[Erbia,euryale[COL5PIM172557_Italy_Veneb_Vcenza
 Erbi056_16[Erbia,euryale[COL5PIM172577_Italy_Veneb_Vcenza
 Erbi0565_16[Erbia,euryale[COL5PIM172577_Italy_Veneb_Vcenza
 Erbi0565_16[Erbia,euryale[COL5PIM172577_Italy_Veneb_Vcenza
 Erbi0565_16[Erbia,euryale[COL5PIM172577_Italy_Veneb_Vcenza
 Erbi0565_16[Erbia,euryale[COL5PIM172577_Italy_Veneb_Vcenza
 Erbi0565_16[Erbia]
 Erbi0565_16[Erbia]
 BBS/X350_2015cH8i_bgen2OLSP_Ibity

 CUPEDDS5_16(Entels_evalue(COLSP.MT/R2597_Ibity_Vende_Vende_Vende

 ENK06F_1_EF71171028.ah

 ENK06F_1_EF71371028.ah

 ENK06F_1_EF71371028.ah

 ENK06F_1_EF71371028.ah

 ENK06F_1_EF71371028.ah

 ENK06F_1_EF71371028.ah

 ENK06F_1_EF71371028.ah

 ENK06F_1_EF71371028.ah

 EULEPS111(Exbeal_euryale(COLSP/MV500174_Italy_South_Tyrd_South)

 PHL8AX465_2015eh8_euryale(COLSP/MV500174_Italy_South_Tyrd_South)

 PHL8AX465_2015eh8_euryale(COLSP/MV500174_Italy_South_Tyrd_South)

 PHL8A305_10(Exbeal_euryale(COLSP/MV500174_Italy_South_Tyrd_South)

 PMME528_10(Exbeal_euryale(COLSP/MV1500174_Italy_South_Tyrd_South)

 PMS15315_15(Exbeal_euryale(COLSP/MV150455_Sonala_Bukroste_Mts_Kremencc

 IL2 GEUX5316_10(Exbeal_euryale(COLSP/MV150455_Sonala_Bukroste_Mts_Kremencc

 RDE231719648_euryale(COLSP/MV150455_Sonala_Bukroste_Mts_Kremencc

 RDE231719648_euryale(COLSP/MV14550_Spain_Catalona_Ibits

 RDE13171_225648_euryale(COLSP/MV14550_Spain_Catalona_Ibits

 RDE231719648_euryale(COLSP/MV14550_Spain_Catalona_Ibits

 RDE231719648_euryale(COLSP/MV14550_Spain_Catalona_Ibits

 RDE231719641_E19840_E198015715_Spain_Catalona_Ibits

 RDE231719648_E19801671575_Spain_Catalona_Ibits

 RDE3171964184 CUPED284_16[Febia_euryale(COL SPIMT762546_France_Ain CUPED284_16[Febia_euryale(COL SPIMT762546_France_Ain CUPED280_16[Febia_euryale(COL SPIMT762546_France_Ain CUPED280_16[Febia_euryale(COL SPIMT762444_France_Ain CUPED281_16[Febia_euryale(COL SPIMT762444_France_Ain CUFED22, 16(Erebia_suryale)CO, 5P(MT762513_France_Ain ATLAST7_2DErebia_suryale)CO, 5P(MT762513_France_Ain ATLAST7_2DErebia_suryale)CO, 5P_France ATLAST7_2DErebia_suryale)CO, 5P_France BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT40109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5Erebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5P(Brebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont BIBSA701_5P(Brebia_suryale)CO_SP(MT410109_Italy_Predmont_Leida E2SPC300_09(Erebia_suryale)CO_SP(M1450944_Span_Catalonia_Leida E2SPC301_09(Erebia_suryale)CO_SP(M1450944_Span_Catalonia_Leida E2SPC150_101Erebia_suryale)CO_SP(M1450944_Span_Catalonia_Utala E2SPC150_101Erebia_suryale)CO_SP(M1450944_Span_Catalonia_Utala E2SPC150_101Erebia_suryale)CO_SP(IC340445_Span_Catalonia_Utala E2SPC301_0111_9(Brebia_suryale)CO_SP(C340476_Spitz)_bitas CUPED282_16|Erebia_euryale|COI_5P|MT762513__France_Ain
 COCUTOL:
 Sector()
 ER010F 2 EF71717035 ab1 EVUID: __CPT/11/05.a8U CUFE0345 (Steffak, gunjalo)CO_SPIMT762538 __tay_Veneto_Vcenza 490x1810_15)Erebia_gunjalo)CO_SPIMT762538 __tay_Veneto_Vcenza 4 __QFE0252_16)Erebia_gunjalo)CO_SPIMT762538 __tay_South_Tyrol_Suedtrol 4 __QFE0252_16)Erebia_gunjalo(CO_SPIMT762538 __tay_Fance_Ain Turbi C, Licke, experied C, Ji (Mirt 2005).
 Turbi C, Ji (Steble, experied C).
 Turbi C, Ji (Steble, exper CUPED316,19Eebia_euryale(COLSPIMT76254)_Austria_Carinhia CUPED316,19Eebia_euryale(COLSPIMT762554)_Austria_Carinhia CUPED317_16[Erebia_euryale(COLSPIMT762563_Austria_Carinhia CUPED318_16[Erebia_euryale(COLSPIMT762442_Austria_Carinhia CUPED23; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6244__Austin_Carinhia CUPED35; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6255__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Trento CUPED37; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6255__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Trento CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT62545__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Trento CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6255__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Trento CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT62445__Laty_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Trento CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT62445__Laty_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Trento CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT62445__Laty_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT62445__Laty_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT62445__Laty_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED38; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6245__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED39; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6245__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED39; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6245__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED39; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6245__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED39; 1616-bia, euryaletOC_SPMTT6256__Litay_Trentino_Ata_AdgeSudtini_Batzano CUPED303 16lErebia eurvaleICOI 5PIMT762570 Austria Tvrol CUPED305_16|Erebia_euryale|COI_5P|MT762462__Austria_Tyrol

IDED306 (CIErabia auto	NALOOL EDIMETROSOO	Austria Tural	
UPED300_10[Elebia_euty	BIELOUT_SPINIT702000_	_Austria_Tyrol	
JPED307_16 Eredia_eury	BIE[CUI_SP[N1762530]	_Austria_Tyroi	
JPED339_16 Erebia_eury	ale COI_5P M1762501_	italyVenetoVicen	28
JPED342_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762507_	ltalyVenetoVicen:	28
JPED344_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762488_	ltalyVenetoVicen	28
JPED347_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762464_	ltalyVenetoVicen;	28
JPED349_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762474_	_ltaly_Veneto_Vicen	28
JPED379_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762447_	_ltaly_Trentino_Alto_A	dige/Sudtirol_Trento_
JPED183_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762574_	FranceHautes_Alpe	S
JPED186_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762560_	FranceHautes_Alpe	S
JPED290_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762571_	_ltaly_Piedmont_Ver	bano
JPED293_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762459_	_ltaly_Piedmont_Ver	bano
JPED181_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762588_	_France_Hautes_Alpe	S
JPED185_16 Erebia_eury	ale COI_5P MT762456	France_Hautes_Alpe	S
JPED190 16 Erebia eury	ale COI 5P MT762528	France Hautes Alpe	s
JPED286 16 Erebia eury	aleiCOI 5PIMT762508	Italy Piedmont Ver	bano
JPED289 16 Erebia eury	aleiCOI 5PIMT762522	Italy Piedmont Ver	bano
JPED291 16lErebia eury	aleiCOI 5PIMT762579	Italy Piedmont Ver	bano
JPED292 16lErebia eury	aleiCOI 5PIMT762602	Italy Piedmont Ver	bano
JPED294 16lErebia eury	aleiCOL 5PIMT762592	Italy Piedmont Ver	bano
WORR683 10/Erebia eur	aleiCOL 5PIJF415696	Germany Bavaria	Oberbavern
R002 Assembly consens	315		
R003F 2 EF71717019.ab	1		
R007F 2 EF71717033.ab			
R014 COIF FF32381697	ab1		
RSA159 15 Frehia eurva	PICOL SPINN138527	Italy Piedmont	
RSA208 15 Erehia eurva	ECOL 5PIMN140943	Italy Piedmont	
BSA1462 16 Frebia eury	aleiCOL 5PIMN145376	Italy Piedmont Rie	la
II EP2010 15/Erebia euro	aleiCOL 5PIMW50180	Poland	
ILEP3808 16/Erebia euro	aleiCOL 5PIMW50138	Russia Polar Ural	
ILEP3800_16/Erabia_out	alejCOL SPIMW50130		ion
ILEP3003_10[Erebia_eur	alejCOL_3PIMW501311	Δuctria Snittal an	der Drau
ILEP3015_10[Liebia_eur		<pre>/</pre>	uci_bidu
JLEF 3043_10[Elevid_lige 7DOM452_00[Erabia_output		_IIdly_TUIIIU Domania Valoan (Vitania
CROMID3_08 Elebia_eury	alejcol_sPiHQ004379	RomaniaValceaU	Aleria Mustania
CROW154_08[Eredia_eury	alejcul_5PjHQ004380	RomaniaPranova	Muntenia
2ROM920_08 Erebia_eury	ale[COI_5P]HQ004390	RomaniaSuceava	Moldavia
2ROM926_08 Eredia_eury	ale[CUI_5P]HQ004384	RomaniaHuneobara	airansywania
2ROM933_08 Erebia_eury	ale COI_5P HQ004388	RomaniaArgesM	untenia
3LMU380_09 Erebia_eury	ale COI_5P HM902070_	_Germany_Bavaria_	Oberbayern
ASS563_17 Erebia_eurya	le COI_5P MN141612_	_Austria_Osttirol	
EASS768_17 Erebia_eurya	ile COI_5P MN144154_	_Austria_Niederosterre	ich
EATJ1313_16 Erebia_eury	ale COI_5P MN139213	AustriaSteiermark	
FIL052_10 Erebia_euryal	e COI_5P JF854420	Russia_Chelyabinskaya	_Oblast_Cheliabinsk_oblas
JLAE652 11/Erobia outro	INFORT FRIMAN ADDA	Austria Tural Mardi	irol
TLAF000_TTERUIA_EUTya	1000_361MIN 143319	_MUSTING_TYTUT_INDIAL	IIVI

Figura 3. Albero filogenetico ottenuto con il metodo del Maximum Likelihood con il programma FastTree. I valori ai nodi rappresentano il supporto ottenuto con lo Shimodaira-Hasegawa test. In blu vengono indicati i campioni di *E. ligea*, in viola quelli di *E. euryale*, in rosso quelli bellunesi e in nero è rappresentato l'outgroup, *Hipparchia semele*. Le lettere rappresentano i cluster mostrati nell'albero ottenuto con l'analisi di PTP.

0.03

Per determinare il numero di cluster effettivi è stato utilizzato un metodo automatico, il PTP (a Poisson Tree Processes model to infer putative species boundaries on a given phylogenetic input tree), il quale permette di individuare il confine tra le specie o gruppi in un dato albero filogenetico (Figura 4) valutando come è suddiviso, quanto lunghi sono i rami che dividono i cluster ed il supporto che possiedono i gruppi trovati.

Questo software esegue due analisi, una di Maximum Likelihood ed una Bayesiana, la quale tende a trovare un numero di gruppi maggiore rispetto alla prima. Utilizzando il metodo del PTP e prendendo in considerazione soltanto l'analisi del Maximum Likelihood, il numero di cluster forniti dal software è di 30, i quali equivalgono essenzialmente a 30 specie diverse.

Ad eccezione di un gruppo comprendente un elevato numero di individui (Gruppo E nella figura sottostante) e rappresentante una possibile specie, sette gruppi erano formati da pochi (rami rossi), mentre la maggior parte da un singolo individuo (rami blu). Il gruppo con molti individui era comunque formato da un mix di individui identificati come *E. ligea* o come *E. euryale*.



PCUPED299-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762504_France_Haute Savoie CUPED069-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762478_Italy_Alto_Adige CUPED288-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762586_Italy_Piedmont_Verbano CUPED287-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762498_Italy_Piedmont_Verbano 0.00 CUPED240-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762443_Italy_Pordenone_Veneto CUPED074-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762439_Italy_Alto_Adige
 I0.0/CUPED071-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762550_Italy_Alto_Adige 0.00 D.00CUPED070-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762599_Italy_Alto_Adige 0,0%CUPED063-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762472_Italy_Alto_Adige 0,03CUPED062-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762514_Italy_Alto_Adige CUPED054-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762440_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trentino PCUPED264-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762463_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol Trento PBIBSA1464-16_Erebia_euryale_COI-5P_MN140732_Italy_Piedmont_Biella PCUPED326-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762428_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento p^PCUPED340-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762434_Italy_Veneto_Vicenza CUPED341-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762441_Italy_Veneto_Vicenza PEULEP1863-15_Erebia_euryale_COI-5P_MN144712_Italy_Belluno_Veneto PEULEP1863-15_Erebia_euryale_COI-5P_MN144712_Italy_Belluno_Veneto PHBOK097-08_Erebia_euryale_COI-5P_MW502573_Austria_Carinthia PCUPED308-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762535_Austria_Tyrol CUPED184-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762427_France_Hautes-Alpes PCUPED182-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762483_France_Hautes-Alpes WMB1640-13_Erebia_euryale_COI-5P_MN143265_France_Provence-Alpes-Cote_dAzur_Alpes-Maritimes CUPED189-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762559_France_Hautes-Alpes CUPED180-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762552_France_Hautes-Alpes CUPED187-16 Erebia euryale COI-5P MT762533 France Hautes-Alpes CUPED265-16 Erebia_euryale_COI-5P_MT762494_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento' WMB2400-13_Erebia_euryale_COI-5P_MN142882_Italia_Emilia_Romagna_Modena CUPED271-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762437_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trent LEASS759-17_Erebia_euryale_COI-5P_MN139687_Austria_Niederosterreich CUPED354-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762572_Italy_Veneto_Vicenza CUPED355-16 Erebia euryale COI-5P MT762580 Italy Veneto Vicenza CUPED353-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762493_Italy_Veneto_Vicenza CUPED352-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762453_Italy_Veneto_Vicenza g⁰CUPED368-16 Erebia euryale COI-5P M1762587 Italy Trentino-Alto AdigelSudtirol Trento^{*} ¹⁰CUPED370-16 Erebia euryale COI-5P M1762467 Italy Trentino-Alto AdigelSudtirol Trento* CUPED366-16 Erebia euryale COI-5P MT762539 Italy Trentino-Alto Adige/Sudtirol Trento CUPED365-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762568_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' ^DCUPED367-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762503_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento p^DCUPED367-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762543_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento¹ PCUPED362-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762435_ttaly_Trentino-Alto_Adige/Suttirol_Trento WMB5023-14_Erebia_euryale_COI-5P_MN140916_Italy_Veneto PEULEP966-15 Erebia euryale COI-5P MW501986 Bulgaria ⁰PHLAF343-11_Erebia_euryale_COI-5P_MW502898_Macedonia PPHLAF344-11_Erebia_euryale_COI-5P_MW501241_Macedonia PEZROM1036-09_Erebia_euryale_COI-5P_GU669666_Romania_Harghita_Transylvania PEULEP3816-16_Erebia_euryale_COI-5P_MW502590_Macedonia PEULEP3815-16_Erebia_euryale_COI-5P_MW500838_Macedonia PEULEP949-15_Erebia_euryale_COI-5P_MW501085_Bulgaria PEULEP898-15_Erebia_euryale_COI-5P_MW502916_Bulgaria PEULEP854-15_Erebia_euryale_COI-5P_MW500457_Greece_Drama PEULEP532-15_Erebia_ligea_COL-5P_MW500519_Serbia PEULEP532-15_Erebia_ligea_COL-5P_MW500519_Serbia PEULEP3806-16_Erebia_euryale_COL-5P_MW500380_Bulgaria_Berkovitsa PEULEP6069-20_Erebia_ligea_COI-5P_Sweden_Norrbotte PLEFID111-10_Erebia_ligea_COI-5P_HM872922_Finland_North_Karelia_Karelia_borealis OGBGL37074-19 Erebia ligea COI-5P LC340492 Mongolia PEULEP4976-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW499759_Poland_Lesser_Poland SPMIS170-22 Erebia ligea COI-5P_OU785248.1 United Kingdom England Cambridgeshire' PABOLD033-16 Erebia ligea COI-5P MN142626 Austria PHLAH745-12 Erebia ligea COI-5P KM572388 Austria Vorarlberg Umg.Ludesch ' PHLAI543-13_Erebia_ligea_COI-5P_MN141772_Austria_Tyrol_Nordtirol PHLAF655-11 Erebia_ligea_COI-5P_MN138689_Austria_Tyrol_Nordtirol_ ρ pGWOTF670-12_Erebia_ligea_COI-5P_KX044360_Germany_Bavaria PFBLMU438-09 Erebia ligea COI-5P GU707099 Germany Bavaria Oberbayem PEULEP3848-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW501097_Austria_Tamsweg PBIBSA966-15_Erebia_ligea_COI-5P_MN144377_Italy_Udine_Friuli-Venezia_Giulia_ PLEATH758-14_Erebia_ligea_COI-5P_MW502948_Italy_South_Tyrol_Sudtirol PODOPE244-11_Erebia_ligea_COI-5P_KW0448012_Germaby_Bararia_Schwaben OGWORR688-10_Erebia_ligea_carthusianorum_COI-5P_JF415699_Germany_Bavaria_Oberbayern ⁰BIBSA2476-20_Erebia_ligea_COI-5P_Italy WMB4996-14_Erebia_ligea_COI-5P_MN141533_ltaly_Emilia_Romagna_ WMB5260-14_Erebia_ligea_COI-5P_MN139980_ltaly_Macerata PEULEP1879-15_Erebia_ligea_COI-5P_MN140659_Italy_Pistoia_ PULEP1877-15_Erebia_ligea_COI-5P_MN142534_ltaly_Macerata DBIBSA2624-20_Erebia_ligea_COI-5P_Italy PBIBSA2521-20_Erebia_ligea_COI-5P_Italy 0 PBIBSA2518-20 Erebia_ligea_COI-5P_ltaly PBIBSA2467-20_Erebia_ligea_COI-5P_ltaly PEULEP3847-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW502596_Austria ^DCUPED236-16_Erebia_ligea_COI-5P_MT762486_ltaly_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' CUPED237-16_Erebia_ligea_COI-5P_MT762584_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' EULEP948-15_Erebia_ligea_COI-5P_MW502329_Bulgaria LEFID112-10_Erebia_ligea_COI-5P_HM872923_Finland_North_Karelia_Karelia_borealis

Ε

LEFIK299-10_Erebia_ligea_COI-5P_JF853953_Finland_Karelia_borealis_ ZMBN657-17_Erebia_ligea_COI-5P__Norway_Hedmark_Tynset LEFIG532-10_Erebia_ligea_COI-5P_HM876205_Finland_Ostrobottnia_kajanensis_ 9 PLEFIG531-10_Erebia_ligea_COI-5P_HM876204_Finland_Ostrobottnia_kajanensis_ PLEFIC042-10_Erebia_ligea_COI-5P_HM871912_Finland_Northern_Ostrobothnia_Ostrobottnia_ouluensis PLEFIC041-10_Erebia_ligea_COI-5P_HM871911_Finland_Northern_Ostrobothinia_Ostrobottnia_ouluensis ^pGWOTL179-13_Erebia_ligea_COI-5P_Germany_Saarland ^bEZROM1075-09_Erebia_ligea_COI-5P_GU675635_Romania_Hunedoara_Transylvania ^bEZROM932-08_Erebia_ligea_COI-5P_HQ004402_Romania_Hunedoara_Transylvania PEZROM580-08_Erebia_ligea_COI-5P_HQ004396_Romania_Suceava_Moldavia PEULEP6085-20_Erebia_ligea_COI-5P_Sweden_Jamtland ^A PEULEP4771-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW499577_Norway_Fini
 ^bEULEP1074-15_Erebia_ligea_COI-5P_MW499580_Serbia PEULEP2174-15_Erebia_ligea_COI-5P_MW503083_Swede PLON125-08_Erebia_ligea_COI-5P_KX048003_Norway_Hedmark_Engerdal GWOTL180-13_Erebia_ligea_COI-5P_Germany_Saarland ^P_PGBMIN26643-13_Erebia_ligea_COI-5P_AB674379_Mongolia_Tov_Bayanchandman_Tov PGBLN2179-09_Erebia_ligea_COI-5P_F1628431_Slovakia PGBLN2179-09_Erebia_ligea_COI-5P_F1628431_Slovakia PE2HBA582-07_Erebia_ligea_COI-5P_Russia_Altayskiy_Kray _____EULEP6328-20_Erebia_ligea_COI-5P_Finland_Lapland EZROM579-08_Erebia_ligea_COI-5P_HQ004395_Romania_Suceava_Moldavia PEULEP540-15_Erebia_euryale_COI-5P_MW499044_Serbia PCUPED273-16_Erebia_euryale_COL-SP_MT762460_ttaly_Trentino-Alto_Adge/Suditrol_Trento 9_COUPED239-16_Erebia_euryale_COL-SP_MT762497_ttaly_Pordenone_Veneto 9_LEFLIU51-10_Erebia_euryale_COL-SP_JF854119_Russia_Chelyabinskaya_Coblast_Cheliabinsk_oblast PEULEP3807-16 Erebia euryale COI-5P MW500322 Russia Polar_Ural g⁰GBMIN26644-13_Erebia_ligea_COI-5P_AB674377_Switzerland_Valais_Goppenstein_Wallis WMB1645-13_Erebia_ligea_COI-5P_MN141867_France_Auvergne-Rhones-Alpes_Rhone-Alpes WMB2686-13_Erebia_ligea_COI-5P_MN141054__France_Provence-Alpes-Cote_dAzur_Hautes-Alpes WMB3651-14_Erebia_ligea_COI-5P_MN141694_France_Vaucluse WMB3668-14_Erebia_ligea_COI-5P_MN145029_France_Saroie PWMB1824-13_Erebia_ligea_COI-5P_MN144112_France_Provence-Alpes-Cote_dAzur_Vaucluse OXB1566-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW499088_France_Drome PLEASZ1067-22_Erebia_ligea_COI-5P_OQ182833_Italy_Piedmont PEULEP6203-20_Erebia_ligea_COI-5P_Germany_Baden-Wurttemberg PEULEP3844-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW499126_Switzerland_Interlaken DEULEP2441-15_Erebia_ligea_COI-5P_MN140249_Switzerland_Graubuenden ATLAS182-22 Erebia ligea COI-5P France LEPAA497-16_Erebia_ligea_COI-5P_MK186321_Switzerland_Graubury WMB821-13_Erebia_ligea_COI-5P_MN139243_ltaly_Valle_dAost PLEPAA824-16 Erebia ligea COI-5P MK186322 Switzerland Berr LEPAA834-16_Erebia_ligea_COI-5P_MK186317_Switzerland_Sankt_Gallen EULEP3849-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW499307_France_Jura CUPED262-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762509_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Bolzano' 9 PEULEP626-15_Erebia ligea_COI-5P_MN138839_Switzerland_Valais PEULEP3846-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW502603_Italy_Udine PEZROM923-08_Erebia_ligea_COI-5P_HQ004397_Romania_Suceara_Moldaria EZROM931-08_Erebia_ligea_COI-5P_HQ004401_Romania_Caras-Severin_Banat PEULEP3850-16_Erebia_ligea_COI-5P_MW501187_Macedonia DEULEP2817-15_Erebia_euryale_COI-5P_MW502455_Bosnia_and_Herzegorina_Jablanca PEULEP2011-15_Erebia_ligea_COI-5P_MW503450_Slovakia CUPED254-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762548_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Bolzano CUPED251-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762542_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Bolzano' PUZINS025-22_Erebia_ligea_COI-5P_Slovakia_Zilinsky_Martin PEZROM92948 Erebia ligea COLSP HO004399 Romania Caras-Severin Banat PEZROM93048 Erebia ligea COLSP HO004400 Romania Caras-Severin Banat EEZROM92848 Erebia ligea COLSP HO004398 Romania Caras-Severin Banat EZROM934-08_Erebia_ligea_COI-5P_HQ004403_Romania_Hunedoara_Transylvania PGBMIVG602-13 Erebia ligea COLSP AB674378 Switzerland Graubunden Maienteid Graubunden PEULEP3951-16 Erebia ligea COLSP MIVS102248 Macedonia PEULEP1938-15 Erebia ligea COLSP MIVS10852 Bosnia and Herzegorina LEATD288-13_Erebia_euryale_COI-5P_MW500710_Italy_South_Tyrol_Sudtirol GWOSK902-11_Erebia_euryale_COI-5P_JN278904_Germany_Bavaria_Oberbayern PLEATG505-14_Erebia_ligea_COI-5P_MW502241_ltaly_South_Tyrol_Sudtirol PLEATG504-14_Erebia_ligea_COI-5P_MWV499030_ltaly_South_Tyrol_Sudtirol PGBGL37013-19_Erebia_euryale_COI-5P_LC340450_Switzerland PGBGL37014-19_Erebia_euryale_COI-5P_LC340478_Russia PODOLOTOTATIO LITONA GUIDANCON OL CONTROL PEZROM152-08 Erebia euryale COI-5P HQ004378 PBIBSA2309-20 Erebia euryale COI-5P France

0.01

PHLAF653-11 Erebia, euryale_COLSP_INN13518 Austria, Tyrol_Northrol
 PWMB038-13 Erebia, euryale_COLSP_INN139691_Italy_Piedmont_Torino
 LEFL032-10 Erebia, euryale_COLSP_INN139691_Austria_Stelemank
 LEAT/131515_Erebia_euryale_COLSP_INN139691_Austria_Stelemank
 LEAT/131515_Erebia_euryale_COLSP_INN141154_Austria_Noteinetch
 LEASS583-17_Erebia_euryale_COLSP_INN1411512_Austria_Ostrinol
 LEBL032-00149_Erebia_euryale_COLSP_INN141151_Austria_Ostrinol
 LEBL032-00149_Erebia_euryale_COLSP_INN1411512_Austria_Ostrinol
 LEBL032-00149_Erebia_euryale_COLSP_INN141151_Austria_Ostrinol
 LEBL032-00149_Erebia_euryale_COLSP_IN000200_Germany_Branta_Oberbayem
 LEZR0M92-008_Erebia_euryale_COLSP_IN000308_Romania_Arges_Muntenia
 LEZR0M92-008_Erebia_euryale_COLSP_IN000308_Romania_Yandosa_Transylvania
 LEZR0M92-008_Erebia_euryale_COLSP_IN000309_Romania_Valeea_Oltenia
 LEZR0M153-16_Erebia_euryale_COLSP_IN000309_Romania_Valeea_Oltenia
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN000309_Romania_Valeea_Oltenia
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN000309_Romania_Valeea_Oltenia
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN000309_Austria_Spital_an_der_Drau
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN000307_Rossia_Ital_an_der_Drau
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN001301_Sustize1and_Interlaten
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN001307_Rossia_Ploar_Linal
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN001307_Rossia_Ploar_Linal
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN001307_Rossia_Ploar_Linal
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN050317_Rossia_Ploar_Linal
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN050318_Rossia_Ploar_Linal
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN050317_Rossia_Ploar_Linal
 LEUEP3015-16_Erebia_euryale_COLSP_IN050318_Rossia_Ploar_Linal

^DBIBSA1462-16_Erebia_euryale_COI-5P_MN145376_Italy_Piedmont_Biella DBIBSA208-15_Erebia_euryale_COI-5P_MN140943_Italy_Piedmont BIBSA159-15_Erebia_euryale_COI-5P_MN138527_Italy_Piedmont PER014 COIE EE32381697 ab1' PER007F_2_EF71717033.ab1 PER003F_2_EF71717019.ab1 PER002 Assembly consensus PGWORR683-10_Erebia_euryale_COI-5P_JF415696_Germany_Bavaria_Oberbayern CUPED294-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762592_Italy_Piedmont_Verband CUPED292-16 Erebia_euryale_COI-5P_MT762602_Italy_Piedmont_Verbano CUPED291-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762579_Italy_Piedmont_Verbano CUPED289-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762522_Italy_Piedmont_Verbano CUPED286-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762508_Italy_Piedmont_Verbano CUPED190-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762528_France_Hautes-Alpes ρ BCUPED185-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762456_France_Hautes-Alpes BCUPED181-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762588_France_Hautes-Alpes PCUPED293-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762459_Italy_Piedmont_Verbanc PCUPED290-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762571_Italy_Piedmont_Verbano CUPED186-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762560_France_Hautes-Alpes ^bCUPED183-16 Erebia_euryale_COI-5P_MT762574_France_Hautes-Alpes ^bCUPED379-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762447_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento_' CUPED349-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762474_Italy_Veneto_Vicenza CUPED347-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762464_Italy_Veneto_Vicenza COUPED344-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762488_Italy_Veneto_Vicenza ^DCUPED342-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762507_Italy_Veneto_Vicenza PCUPED339-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762501_Italy_Veneto_Vicenza CUPED307-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762530_Austria_Tyrol ^DCUPED306-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762600_Austria_Tyrol ^DCUPED305-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762462_Austria_Tyrol CUPED303-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762570_Austria_Tyrol DCUPED302-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762438_Austria_Tyrol
DCUPED261-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762540_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Bolzano' P CUPED258-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762566_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtino[_Bolzano' PCUPED258-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762589_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtino[_Bolzano' CUPED253-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762476_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Bolzano' ^bCUPED374-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762445_Italy_Trentinc-Alto_AdigelSudtirol_Trentoⁱ
 ^bCUPED304-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762448_Austria_Tyrol CUPED257-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762500_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Bolzano ^bCUPED380-16 Erebia_euryale_COI-5P_MT762465_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento'
 ^bCUPED378-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762557_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento' CUPED377-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762487__Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento ^DCUPED376-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762598_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' ^DCUPED375-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762576_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' ^D CUPED323-16 Erebia euryale COI-5P MT762442 Austria Carinthia PCUPED318-16 Erebia euryale COI-5P MT762563 Austria Carinthia CUPED317-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762593_Austria_Carinthia CUPED316-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762561_Austria_Carinthia CUPED315-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762589_Austria_Carinthia CUPED314-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762529_Austria_Carinthia CUPED272-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762452_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' CUPED269-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762594_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' CUPED268-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762591_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' CUPED267-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762477_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' ^bCUPED263-16 Erebia euryale COI-5P_MT762429 [taly_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento" ^bCUPED363-16 Erebia_euryale_COI-5P_MT762495_ltaly_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento' PCUPED361-16 Erebia euryale COI-5P MT762518 Italy Trentino-Alto Adige/Sudtirol Trento CUPED274-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762512_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento CUPED270-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762505_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento" CUPED245-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762537_Italy_Pordenone_Veneto CUPED244-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762526_Italy_Pordenone_Veneto CUPED243-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762475_Italy_Pordenone_Veneto CUPED242-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762532_Italy_Pordenone_Veneto CUPED241-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762596_Italy_Pordenone_Veneto CUPED348-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762502_Italy_Veneto_Vicenza CUPED345-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762524_Italy_Veneto_Vicenza CUPED338-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762527_Italy_Veneto_Vicenza ¹ CUPED329-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762481_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento¹
 ¹ CUPED328-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762484_Italy_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento¹ CUPED327-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762577_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento' CUPED057-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762490_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trentino CUPED056-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762525_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trentino' CUPED330-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762523_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trento" CUPED055-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762482_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trentino CUPED346-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762536_Italy_Veneto_Vicenza_ 9⁰CUPED248-16 Erebia_euryale_COI-5P_MT762562_ltaly_Pordenone_Veneto ¹⁰CUPED266-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762469_ltaly_Trentino-Alto_AdigelSudtirol_Trento* OXB1180-15_Erebia_euryale_COI-5P_MN139611_Italy PCUPED252-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762583_Italy_South_Tyrol_Suedtirol PCUPED276-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762553_France_Ain CUPED343-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762538_Italy_Veneto_Vicenza LEPAA495-16_Erebia_euryale_COI-5P_MK186309_Switzerland_Graubunden eR010F_2_EF71717035.ab1 LEPAA329-16_Erebia_euryale_COI-5P_MK186310_Switzerland_Ticino PWMB5108-14_Erebia_euryale_COI-5P_MN143266_Italy_Trentino-Alto_Adige/Sudtirol_Trentino' BIBSA1144-15_Erebia_euryale_COI-5P_MIN138628_Italy CUPED064-16_Erebia_euryale_COI-5P_MT762455_Italy_Alto_Adige ⁰PHLAB369-10_Erebia_euryale_COI-5P_HQ968526_Switzerland_Graubunden WMB5269-14_Erebia_ligea_COI-5P_MN139470_ltaly_Lucca

Ε



0.10

Figura 4. Albero filogenetico rappresentante la suddivisione in gruppi ottenuta con PTP dalla ricostruzione filogenetica basata sul gene COI dedotto attraverso il metodo del Maximum Likelihood ottenuto con FastTree. L'outgroup è stato escluso dall'analisi. In rosso sono indicate le sequenze che appartengono ad uno stesso cluster, mentre in blu sono rappresentate le sequenze che indicano cluster distinti. I numeri indicano la probabilità a posteriori dei nodi ottenuta con l'analisi bayesiana. Le lettere indicativamente rappresentano i cluster dell'albero di FastTree.

Distanze genetiche

Dall'analisi delle distanze genetiche a coppie dei campioni, si osservava che alcuni individui identificati come *E. ligea*, avevano distanze genetiche con altri individui della stessa specie molto elevate, ben superiori alla distanza evolutiva di circa l'1%, valore che spesso indica specie diverse nei lepidotteri, mentre avevano distanze molto inferiori con campioni riconosciuti come *E. euryale*. Viceversa, alcuni campioni identificati come *E. euryale* avevano distanze genetiche elevate con individui corrispondenti alla stessa specie, mentre distanze minori con individui di *E. ligea*. Per gli individui bellunesi sequenziati in questo studio, le distanze erano molto basse (<1%) quando confrontati con individui di *E. euryale*, mentre molto più elevate con i campioni di *E. ligea*, nonostante ci fossero alcune eccezioni. Infine, distanze molto elevate (>3%) si osservavano confrontando gli individui provenienti da popolazioni molto distanti geograficamente, come la popolazione giapponese.

Dall'analisi entro specie (Tabella 2), suddivise a priori sulla base dell'attribuzione morfologica degli individui, la distanza media entro *E. ligea* era molto più elevata (~2,0%) rispetto alla distanza entro *E. euryale* (~0,3%). Infine, entro il gruppo che comprendeva i soli campioni bellunesi, le distanze genetiche erano molto basse (~0,08%) ad indicare che molto probabilmente gli individui bellunesi appartengono tutti alla stessa specie.

Tabella 2. Distanze intraspecifiche di Erebia euryale, Erebia ligea e campioni bellunesi.

	Distanza	Errore Standard
Erebia ligea	0,0196	0,0037
Erebia euryale	0,0029	0,0007
Campioni bellunesi	0,0008	0,0008

Infine, l'analisi tra i gruppi (Tabella 3) indica che i campioni del bellunese avevano una distanza genetica media molto bassa con il gruppo di *E. euryale* (~0,2%), mentre più elevata con *E. ligea* (~1,3%). Invece, tra gli individui di *E. euryale* e di *E. ligea* la distanza media è circa quella calcolata tra i campioni bellunesi e *E. ligea* (~1,4%).

Tabella 3. Distanze interspecifiche tra *Erebia euryale*, *Erebia ligea* ed i campioni bellunesi. Sopra la diagonale sono indicati i valori di errore standard, mentre sotto la diagonale sono indicate le distanze tra gruppi.

	Erebia ligea	Erebia euryale	Campioni bellunesi
Erebia ligea	-	0,0024	0,0024
Erebia euryale	0,0140	-	0,0005
Campioni bellunesi	0,0132	0,0020	-

Discussione

Questo studio ha analizzato la diversità entro e tra due specie di lepidotteri *E. ligea* ed *E. euryale*, le quali mostrano un alto grado di somiglianza in accordo con studi passati (Martin et al, 2000; Semelakova et al, 2013), attraverso l'utilizzo il DNA barcoding. Questa somiglianza tra specie difficili da distinguere morfologicamente si riscontra anche in altri casi nella famiglia delle Pieridae, in cui il DNA barcoding potrebbe risultare una soluzione per la loro discriminazione (Hausmann et al., 2011).

I risultati ottenuti dall'analisi filogenetica con il Maximum Likelihood e con PTP indicano chiaramente che non c'è una chiara distinzione tra le due specie. Tuttavia, il metodo di PTP trova un cluster ben definito che potremmo identificare come E. euryale. Infatti, questo cluster contiene principalmente individui identificati come E. euryale, ma anche molti individui identificati come E. ligea generalmente con aplotipi identici ad individui di E. euryale. Questo fa pensare che in realtà si trattava di individui di E. euryale erroneamente identificati. Questa conclusione sarebbe avvalorata dalle basse distanze genetiche tra tutti gli individui identificati come E. euryale, inclusi quelli del cluster C. L'inclusione degli individui presumibilmente identificati erroneamente come E. ligea (presenti nel cluster E), non modificherebbe questi valori di distanza genetica. I campioni di E. ligea formano due cluster ben distinti (A e B in figura 2 e 3). Questi campioni provenivano da due popolazioni geograficamente distanti in Russia e Giappone e mostrano distanze genetiche tra loro e con i campioni di E. euryale ben superiori (>6%) a quelle riscontrate tra specie filogeneticamente vicine. Questi cluster potrebbero rappresentare specie diverse indicando quindi che E. ligea potrebbe contenere più specie distinte. Questi risultati sono in contrasto con quanto affermato da Hausmann et al., 2011, i quali indicano E. ligea e E. euryale come specie distinte, ma con una bassa divergenza di sequenza (circa 0,8%).

Bisogna notare che l'analisi di PTP ritrova moltissimi cluster. Questa suddivisione in un numero così elevato di specie è molto inverosimile. Infatti, moltissimi cluster sono rappresentati da un singolo campione e questo in genere è dovuto alla presenza di errori di sequenziamento. Benché i campioni provenivano dal database di BOLD, in realtà BOLD raccoglie anche le sequenze provenienti da altri database (NCBI per esempio), nei quali non vengono depositati i cromatogrammi delle sequenze e quindi mancano della misura di qualità delle sequenze stesse. Infine, per quanto riguarda i campioni bellunesi la distanza genetica era molto bassa ad indicare che apparterrebbero tutti alla stessa specie. Quindi, nell'area bellunese potrebbero non essere presenti due specie distinte come ipotizzato sulla base della diversità fenotipica mostrata da queste farfalle.

In conclusione, l'analisi svolta attraverso il DNA barcoding con il gene mitocondriale COI ha mostrato la presenza di cluster ben distinti che potrebbero rappresentare specie distinte, ma non una chiara suddivisione in due specie distinte *E. ligea* ed *E. euryale* lungo tutta la loro distribuzione geografica. In Europa ed in Italia in particolare, le distanze genetiche e le relazioni filogenetiche non concordano con la precedente identificazione come l'una o l'altra specie, a differenza di altre specie di lepidotteri, come ad esempio della famiglia Pieridae, in cui le sequenze del gene COI ottenute si sono rivelate molto utili per discriminare le specie del genere *Eurema* (Rajpoot et al., 2018). Pertanto, lo studio di queste due specie dovrà essere ulteriormente analizzato attraverso altri marcatori genetici diversi dal DNA mitocondriale in quanto spesso incontra dei problemi nella risoluzione delle specie (Will e Rubinoff, 2004), rispetto all'entusiasmo riportato nei primi lavori di Herbert (Herbert, 2003).

Bibliografia

- Hausmann A., Haszprunar G., Segerer A. H., Speidel W., Behounek G., Hebert P. D. N. 2011.
 «Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany.» Spixiana, 34(1), 47-58.
- Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. 2004. «Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator.» Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101,* 14812-7.
- Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R. 2003b. «Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.» *Proceedings of the Royal Society of London B, 270,* S96-9.
- Herbert P. D. N., Alina Cywinska, Shelley L. Bell and Jeremy R. deWaard. 2003a. «Biological identification through DNA barcodes.» *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270, 313-321.
- Martin J., Gilles A., Descimon H. 2000. «Molecular Phylogeny and Evolutionary Patterns of the European Satyrids (Lepidoptera: Satyridae) as Revealed by Mitochondrial Gene Sequences.» *Molecular phylogenetics and evolution*, 15, 70-82.
- Peña C. e Wahlberg N. 2008. «Prehistorical climate change increased diversification of a group of butterflies.» *Biology letters, 4,* 274-8.
- Peña C., Witthauer H., Kleckova I., Fric Z., Wahlberg N. 2015. «Adaptive radiations in butterflies: Evolutionary history of the genus *Erebia* (Nymphalidae: Satyrinae).» *Biological Journal of the Linnean Society*, 116, 449-467.

- Price M. N., Dehal P. S., Arkin, A. P. 2009. «FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix.» *Molecular biology and evolution*, 26 (7), 1641–1650.
- Rajpoot A., Kumar V., Bahuguna A. 2018. «DNA barcodes and insights into the phylogenetic relationships of butterflies of the genus *Eurema* (Pieridae) from Uttarakhand, India.»
- Ratnasingham S. e Hebert P. D. N. 2007. «BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org).» Molecular Ecology Notes, 7(3), 355-364. https://www.boldsystems.org.
- Semelakova M., Pristas P., Panigaj L. 2013. «Phylogenetic relatedness of *Erebia medusa* and *E. epipsodea* (Lepidoptera: Nymphalidae) confirmed.» *European Journal of Entomology*, 110, 379-382.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson TJ., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson JD., Higgins DG. 2011. «Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.» *Molecular Systems Biology*, 7, 539.
- Will K. W., Rubinoff D. 2004. «Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification.» *Cladistics*, 20(1), 47-55.
- Xia X. 2018. «DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution.» *Molecular Biology and Evolution, 35,* 1550-1552. https://doi.org/10.1093/molbev/msy073.
- Zhang J., Kapli P., Pavlidis P., Stamatakis A. 2013. «A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements.» *Bioinformatics*, *29(22)*, 2869-2876.