



**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

<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>Introduzione .....</b>	<b>3</b>
Il DNA barcoding.....	3
Le Nymphalidae: <i>Erebia euryale</i> ed <i>Erebia ligea</i> .....	4
Scopo della tesi.....	5
<b>Materiali e metodi.....</b>	<b>6</b>
I campioni.....	6
Estrazione del DNA.....	6
Amplificazione del DNA.....	7
Purificazione e sequenziamento del DNA.....	8
Analisi e allineamento delle sequenze.....	8
<b>Risultati.....</b>	<b>10</b>
Analisi filogenetica.....	11
Distanze genetiche.....	22
<b>Discussione.....</b>	<b>24</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>26</b>

# 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

## Il 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 simpatiche. *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 simpatica 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  $\mu$ 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  $\mu$ L. Questa miscela di reazione conteneva:

- 13,4  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O
- 2  $\mu$ L di Buffer 10x
- 0,4  $\mu$ L di primer COI-F 10  $\mu$ M
- 0,4  $\mu$ L di primer COI-R 10  $\mu$ M
- 1,6  $\mu$ L di dNTPs 2,5 mM ognuno
- 0,2  $\mu$ L di EasyTaq DNA Polymerase (1U/ $\mu$ L)
- 2  $\mu$ L 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 µL di Exo e di 1 µL di SAP a 5 µL 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 µL formato da 2 µL di DNA purificato miscelato a 2,5 µL Primer COI-F 10 µM e 5,5 µL di H<sub>2</sub>O.

## **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).

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

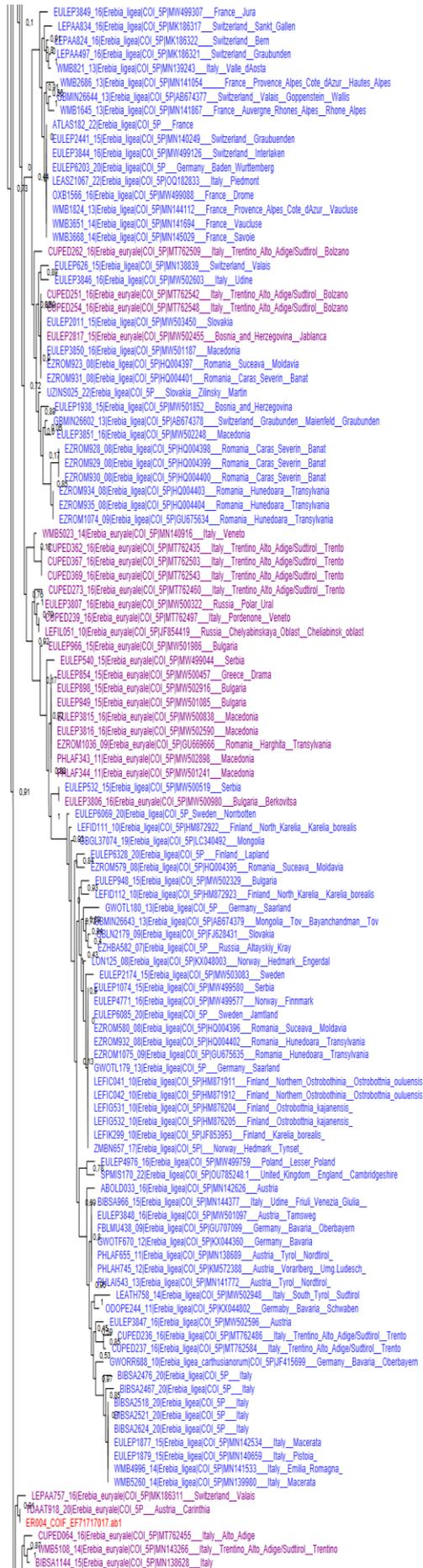
Popolazione	N° di sequenze	N° di aplotipi
Italia	140	46
Austria	29	11
Francia	47	19
Germania	11	9
Spagna	13	7
Svizzera	19	17
Grecia	1	1
Andorra	1	1
Regno Unito	1	1

<b>Svezia</b>	3	3
<b>Finlandia</b>	8	5
<b>Norvegia</b>	3	3
<b>Macedonia</b>	6	4
<b>Polonia</b>	3	3
<b>Repubblica Ceca</b>	5	3
<b>Romania</b>	19	8
<b>Russia</b>	11	10
<b>Serbia</b>	3	3
<b>Slovacchia</b>	20	13
<b>Cina</b>	1	1
<b>Giappone</b>	21	14
<b>Mongolia</b>	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*.





WMB914\_13|Erebia\_euryale|COI\_SPMN139425\_\_Italy\_Tuscany\_Pistoia  
 GBMN26647\_13|Erebia\_euryale|COI\_SPIA8674371\_\_Switzerland\_Bern\_Gross\_Scheidegg\_Bern  
 BIBSA158\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMN141333\_\_Italy\_Piedmont  
 BBSA210\_15|Erebia\_igea|COI\_SPMN142341\_\_Italy\_Piedmont  
 BIBSA937\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMN144655\_\_Italy\_Piedmont  
 BIBSA2629\_20|Erebia\_igea|COI\_SP\_\_Italy  
 CUPE0356\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762597\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 ER005F\_3\_EF71717020.ab1  
 ER006\_COIF\_EF3281688.ab1  
 ER008\_COIF\_EF3281690.ab1  
 BIBSA2486\_20|Erebia\_igea|COI\_SP\_\_Italy  
 EULEP3810\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPMW500110\_\_Switzerland\_Malaja  
 LEATO141\_13|Erebia\_euryale|COI\_SPMW500074\_\_Italy\_South\_Tyrol\_Sudtirol  
 PHLAB369\_10|Erebia\_euryale|COI\_SPH0868526\_\_Switzerland\_Graubunden  
 WMB5269\_14|Erebia\_igea|COI\_SPMN139470\_\_Italy\_Lucca  
 CUPE0255\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762558\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Bozcano  
 ATLAS176\_22|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_France  
 GBLN5315\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMK196495\_\_Slovakia\_Bukovitsa\_Mis\_Kremenc  
 GBLN5316\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMK196494\_\_Slovakia\_Bukovitsa\_Mis\_Kremenc  
 BDE231\_19|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_Spain\_Castilla\_y\_Leon\_Picos\_de\_Europa  
 EZSPC389\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPGU689846\_\_Andorra  
 ATLAS171\_22|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_Spain  
 ATLAS173\_22|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_Spain  
 WMB1603\_13|Erebia\_igea|COI\_SPMN142508\_\_France\_Provence\_Alpes\_Cote\_dAzur\_Alpes\_Maritimes  
 EZSPC1255\_10|Erebia\_euryale|COI\_SPHM901449\_\_Spain\_Catalonia\_Lleida  
 EZSPC1256\_10|Erebia\_euryale|COI\_SPHM901450\_\_Spain\_Catalonia\_Lleida  
 EZSPM295\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPGU679307\_\_Spain\_Castilla\_y\_Leon\_Leon  
 EZSPM585\_12|Erebia\_euryale|COI\_SPKP876652\_\_Spain\_Castilla\_y\_Leon\_Leon  
 EZSPM997\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPGU675715\_\_Spain\_Cantabria  
 BIBSA214\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMN141345\_\_Italy\_Piedmont  
 CUPE0285\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762511\_\_France\_Ain  
 CUPE0238\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762470\_\_France\_Ain  
 CUPE0278\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762496\_\_France\_Ain  
 CUPE0279\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762521\_\_France\_Ain  
 CUPE0283\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762467\_\_France\_Ain  
 CUPE0284\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762546\_\_France\_Ain  
 CUPE0277\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762516\_\_France\_Ain  
 CUPE0280\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762582\_\_France\_Ain  
 CUPE0281\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762444\_\_France\_Ain  
 CUPE0282\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762513\_\_France\_Ain  
 ATLAS172\_22|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_France  
 ATLAS175\_22|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_France  
 ATLAS177\_22|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_France  
 BIBSA207\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMN140891\_\_Italy\_Piedmont  
 BIBSA209\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMN144309\_\_Italy\_Piedmont  
 BIBSA211\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMN145102\_\_Italy\_Piedmont  
 EULEP5888\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPMW500157\_\_France\_Pyrenees\_Atlantiques  
 EULEP5889\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPMW500159\_\_France\_Pyrenees\_Atlantiques  
 EZSPC385\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPGU689809\_\_Spain\_Catalonia\_Lleida  
 EZSPC386\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPGU689851\_\_Spain\_Catalonia\_Lleida  
 EZSPC387\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPGU689844\_\_Spain\_Catalonia\_Lleida  
 EZSPC388\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPGU689845\_\_Spain\_Catalonia\_Lleida  
 EZSPC1250\_10|Erebia\_euryale|COI\_SPHM901445\_\_Spain\_Catalonia\_Girona  
 EATG505\_14|Erebia\_igea|COI\_SPMW502241\_\_Italy\_South\_Tyrol\_Sudtirol  
 EATG504\_14|Erebia\_igea|COI\_SPMW499030\_\_Italy\_South\_Tyrol\_Sudtirol  
 GBGL37013\_19|Erebia\_euryale|COI\_SPLC340450\_\_Switzerland  
 GBGL37014\_19|Erebia\_euryale|COI\_SPLC340478\_\_Russia  
 EZPROM152\_08|Erebia\_euryale|COI\_SPH0004378  
 BIBSA2309\_20|Erebia\_euryale|COI\_SP\_\_France  
 LEPA4328\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPMK186310\_\_Switzerland\_Ticino  
 LEPA4485\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPMK186309\_\_Switzerland\_Graubunden  
 ER010F\_2\_EF71717035.ab1  
 CUPE0343\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762538\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 XB1180\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPMN139611\_\_Italy  
 CUPE0252\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762583\_\_Italy\_South\_Tyrol\_Suedtirol  
 CUPE0276\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762553\_\_France\_Ain  
 CUPE0248\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762562\_\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
 CUPE0266\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762469\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0346\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762536\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPE0055\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762482\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trentino  
 CUPE0330\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762523\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0056\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762525\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trentino  
 CUPE0057\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762490\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0327\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762577\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0328\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762484\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0329\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762481\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0338\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762527\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPE0345\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762524\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPE0348\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762502\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPE0241\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762596\_\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
 CUPE0242\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762532\_\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
 CUPE0243\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762475\_\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
 CUPE0244\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762526\_\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
 CUPE0245\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762537\_\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
 CUPE0270\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762505\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0274\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762512\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0361\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762518\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0363\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762495\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0263\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762429\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0267\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762477\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0268\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762591\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0269\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762594\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0272\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762452\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0314\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762529\_\_Austria\_Carinthia  
 CUPE0315\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762589\_\_Austria\_Carinthia  
 CUPE0316\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762561\_\_Austria\_Carinthia  
 CUPE0317\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762593\_\_Austria\_Carinthia  
 CUPE0318\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762563\_\_Austria\_Carinthia  
 CUPE0322\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762442\_\_Austria\_Carinthia  
 CUPE0375\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762576\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0376\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762598\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0377\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762487\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0378\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762557\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0380\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762465\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0257\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762500\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Bozcano  
 CUPE0304\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762448\_\_Austria\_Tyrol  
 CUPE0374\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762445\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Trento  
 CUPE0253\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762476\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Bozcano  
 CUPE0258\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762489\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Bozcano  
 CUPE0259\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762556\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Bozcano  
 CUPE0261\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762540\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_AdigeSudtirol\_Bozcano  
 CUPE0302\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762438\_\_Austria\_Tyrol  
 CUPE0303\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762570\_\_Austria\_Tyrol  
 CUPE0305\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762462\_\_Austria\_Tyrol

CUPED306\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762600\_\_Austria\_Tyrol  
 CUPED307\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762530\_\_Austria\_Tyrol  
 CUPED339\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762501\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPED342\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762507\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPED344\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762488\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPED347\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762464\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPED349\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762474\_\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
 CUPED379\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762447\_\_Italy\_Trentino\_Alto\_Adige|Sudtirolo\_Trento  
 CUPED183\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762574\_\_France\_Hautes\_Alpes  
 CUPED186\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762568\_\_France\_Hautes\_Alpes  
 CUPED290\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762571\_\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
 CUPED293\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762459\_\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
 CUPED181\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762588\_\_France\_Hautes\_Alpes  
 CUPED185\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762456\_\_France\_Hautes\_Alpes  
 CUPED190\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762528\_\_France\_Hautes\_Alpes  
 CUPED226\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762508\_\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
 CUPED289\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762522\_\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
 CUPED291\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762579\_\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
 CUPED292\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762602\_\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
 CUPED294\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1762592\_\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
 GWORR883\_10|Erebia\_euryale|COI\_SPIJF415696\_\_Germany\_Bavaria\_Oberbayem  
 ER002\_Assembly\_consensus  
 ER003F\_2\_EF71717018.ab1  
 ER007F\_2\_EF71717033.ab1  
 ER014\_COIF\_EF32381697.ab1  
 BIBSA159\_19|Erebia\_euryale|COI\_SPM1138527\_\_Italy\_Piedmont  
 BIBSA208\_19|Erebia\_euryale|COI\_SPM1140943\_\_Italy\_Piedmont  
 BIBSA1482\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1145376\_\_Italy\_Piedmont\_Biella  
 EULEP2010\_15|Erebia\_euryale|COI\_SPM11501804\_\_Poland  
 EULEP3808\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM11501387\_\_Russia\_Polar\_Ural  
 EULEP3809\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM11501310\_\_Switzerland\_Interlaken  
 EULEP3813\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM11503060\_\_Austria\_Spittal\_an\_der\_Drau  
 EULEP3845\_16|Erebia\_ligea|COI\_SPM11503354\_\_Italy\_Torino  
 EZROM153\_08|Erebia\_euryale|COI\_SPH0004379\_\_Romania\_Valcea\_Oltenia  
 EZROM154\_08|Erebia\_euryale|COI\_SPH0004380\_\_Romania\_Prahova\_Muntlenia  
 EZROM820\_08|Erebia\_euryale|COI\_SPH0004390\_\_Romania\_Suceava\_Moldavia  
 EZROM826\_08|Erebia\_euryale|COI\_SPH0004384\_\_Romania\_Hunedoara\_Transylvania  
 EZROM833\_08|Erebia\_euryale|COI\_SPH0004388\_\_Romania\_Arges\_Muntlenia  
 FBLMU380\_09|Erebia\_euryale|COI\_SPM1141612\_\_Austria\_Osttirol  
 LEASS563\_17|Erebia\_euryale|COI\_SPM1141612\_\_Austria\_Osttirol  
 LEASS788\_17|Erebia\_euryale|COI\_SPM1141612\_\_Austria\_Niederosterreich  
 LEAT11313\_16|Erebia\_euryale|COI\_SPM1139213\_\_Austria\_Steiermark  
 LEFLU92\_10|Erebia\_euryale|COI\_SPIJF854420\_\_Russia\_Cheljabinskaya\_Oblast\_Chelabinsk\_oblast  
 PHLA683\_11|Erebia\_euryale|COI\_SPM1143518\_\_Austria\_Tyrol\_Nordtirol  
 WMB838\_13|Erebia\_euryale|COI\_SPM1139991\_\_Italy\_Piedmont\_Torino

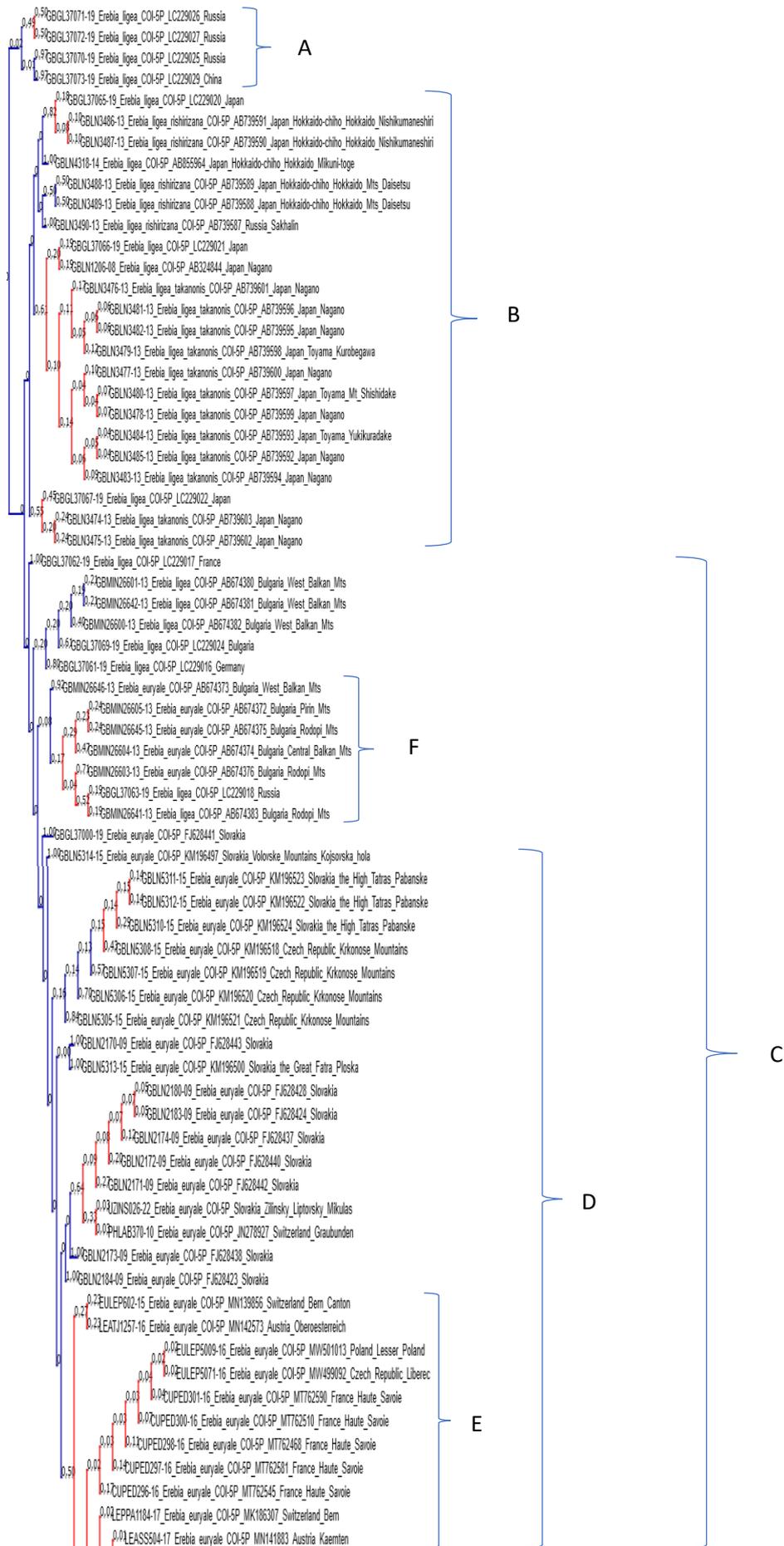
0.03

**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.

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*.





E

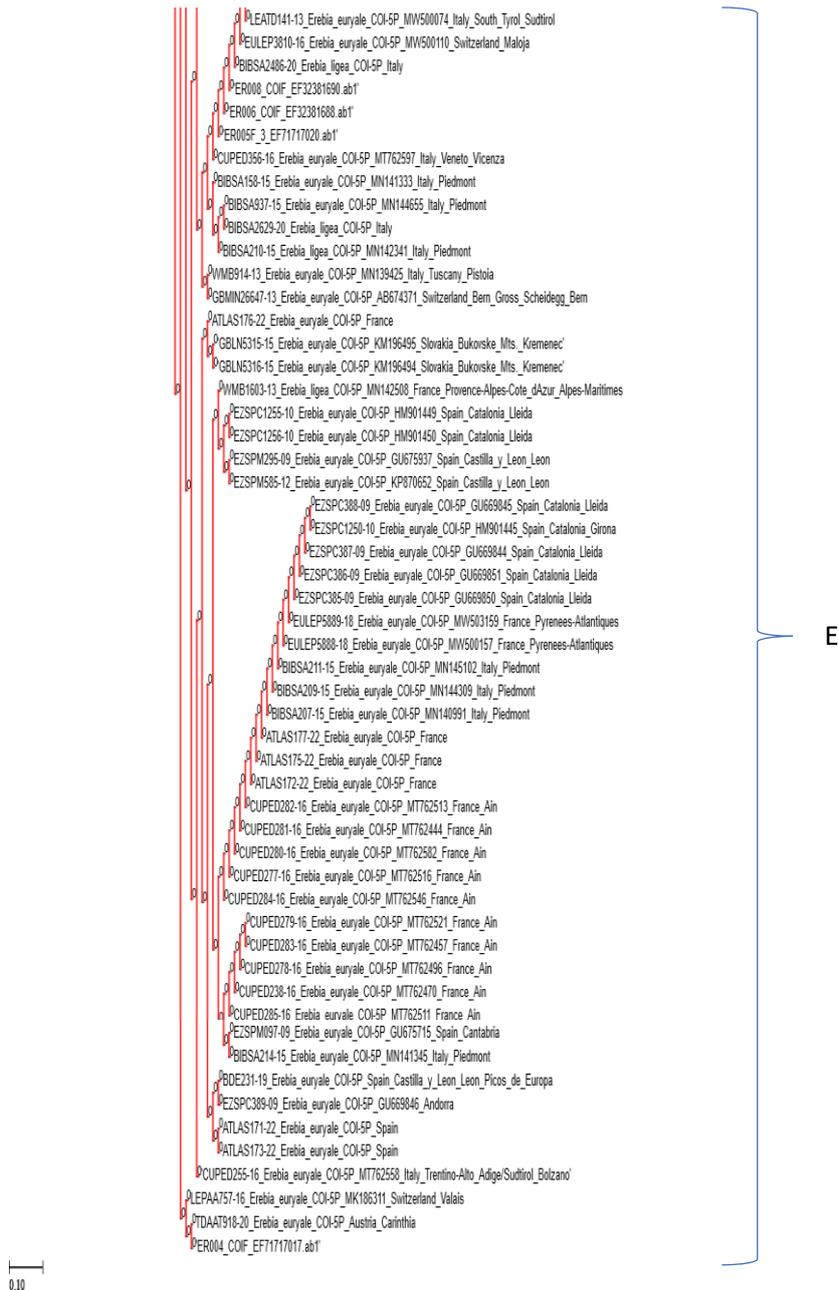
b.01

PEFIK299-10\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_JF83393\_Finland\_Karelia\_borealis\_  
 PZMBN657-17\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Norway\_Hedmark\_Tynset\_  
 PEFIG532-10\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HM876205\_Finland\_Ostrobotnia\_kajanensis\_  
 PEFIG531-10\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HM876204\_Finland\_Ostrobotnia\_kajanensis\_  
 PEFIG042-10\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HM871912\_Finland\_Northern\_Ostrobotnia\_Ostrobotnia\_ouluensis  
 PEFIG041-10\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HM871911\_Finland\_Northern\_Ostrobotnia\_Ostrobotnia\_ouluensis  
 PGWOTL179-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Germany\_Saarland  
 PEZROM1075-09\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_GU675635\_Romania\_Hunedoara\_Transylvania  
 PEZROM932-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004402\_Romania\_Hunedoara\_Transylvania  
 PEZROM580-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004396\_Romania\_Suceara\_Moldavia  
 PEULEP6005-20\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Sweden\_Jamtland  
 PEULEP4771-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW499577\_Norway\_Finmark  
 PEULEP1074-15\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW499580\_Serbia  
 PEULEP2174-15\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW503083\_Sweden  
 PLON25-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_K048003\_Norway\_Hedmark\_Engerdal  
 PGWOTL180-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Germany\_Saarland  
 PGBMIN26643-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_AB674379\_Mongolia\_Tov\_Bayanchandman\_Tov  
 PGBLN2179-09\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_FJ628431\_Slovakia  
 PEZHA582-07\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Russia\_Altayskiy\_Kray  
 PEULEP6328-20\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Finland\_Lapland  
 PEZROM579-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004395\_Romania\_Suceara\_Moldavia  
 PEULEP540-15\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW499044\_Serbia  
 PCUPED273-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MT762460\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtiroi\_Trento'  
 PCUPED238-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MT762497\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
 PELEF051-10\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_JF854419\_Russia\_Chelyabinskaya\_Oblast\_Chelibinsk\_oblast  
 PEULEP3807-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW500322\_Russia\_Polar\_Ural  
 PGBMIN26644-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_AB674377\_Switzerland\_Valais\_Coppenstein\_Wallis  
 PWB1645-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN141867\_France\_Auvergne-Rhone-Alpes\_Rhone-Alpes  
 WMB2686-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN141054\_France\_Provence-Alpes-Cote\_dAzur\_Hautes-Alpes  
 PWB3651-14\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN141694\_France\_Vaucluse  
 PWB3668-14\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN145029\_France\_Savoie  
 PWB1824-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN141112\_France\_Provence-Alpes-Cote\_dAzur\_Vaucluse  
 POXB1566-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW499088\_France\_Drome  
 PLEAS21067-22\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_OQ182833\_Italy\_Piedmont  
 PEULEP6203-20\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Germany\_Baden-Wuerttemberg  
 PEULEP3844-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW499126\_Switzerland\_Interlaken  
 PEULEP2441-15\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN140249\_Switzerland\_Graubunden  
 ATLAS182-22\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_France  
 PLEPAA497-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MK186321\_Switzerland\_Graubunden  
 PWB821-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN139243\_Italy\_Valle\_dAosta  
 PLEPA824-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MK186322\_Switzerland\_Bern  
 PLEPA834-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MK186317\_Switzerland\_Sankt\_Gallen  
 PEULEP3849-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW499307\_France\_Jura  
 PCUPED262-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MT762509\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtiroi\_Bolzano'  
 PEULEP626-15\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN138839\_Switzerland\_Valais  
 PEULEP3846-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW502603\_Italy\_Udine  
 PEZROM923-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004397\_Romania\_Suceara\_Moldavia  
 PEZROM931-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004401\_Romania\_Caras-Severin\_Banat  
 PEULEP3850-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW501187\_Macedonia  
 PEULEP2817-15\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW502455\_Bosnia\_and\_Herzegovina\_Jablanca  
 PEULEP2011-15\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW503450\_Slovakia  
 PCUPED254-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MT762548\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtiroi\_Bolzano'  
 PCUPED251-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MT762542\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtiroi\_Bolzano'  
 PZINS025-22\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_Slovakia\_Zilinsky\_Martin  
 PEZROM929-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004399\_Romania\_Caras-Severin\_Banat  
 PEZROM930-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004400\_Romania\_Caras-Severin\_Banat  
 PEZROM928-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004398\_Romania\_Caras-Severin\_Banat  
 PEZROM935-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004404\_Romania\_Hunedoara\_Transylvania  
 PEZROM1074-09\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_GU675634\_Romania\_Hunedoara\_Transylvania  
 PEZROM934-08\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_HQ004403\_Romania\_Hunedoara\_Transylvania  
 PGBMIN26602-13\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_AB674378\_Switzerland\_Graubunden\_Maienfeld\_Graubunden  
 PEULEP3851-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW502248\_Macedonia  
 PEULEP1938-15\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW501852\_Bosnia\_and\_Herzegovina  
 PLEATD288-13\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW500710\_Italy\_South\_Tyrol\_Sudtiroi  
 GWOSK902-11\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_IN278904\_Germany\_Bavaria\_Oberbayern  
 PLEATG505-14\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW502241\_Italy\_South\_Tyrol\_Sudtiroi  
 PLEATG504-14\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW499030\_Italy\_South\_Tyrol\_Sudtiroi  
 PGBGL37013-19\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_LC340450\_Switzerland  
 PGBGL37014-19\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_LC340470\_Russia  
 PEZROM152-08\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HQ004378  
 PBBSA2305-20\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_France  
 PPHLAF653-11\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN143518\_Austria\_Tyrol\_Nordtirol  
 WMB838-13\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN139691\_Italy\_Piedmont\_Torino  
 PLEF052-10\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_JF854420\_Russia\_Chelyabinskaya\_Oblast\_Chelibinsk\_oblast  
 PLEATJ1313-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN139213\_Austria\_Stelemark  
 PLEASS768-17\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN144154\_Austria\_Niederosterreich  
 PLEASS563-17\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN141612\_Austria\_Osttirol  
 PFBLMU380-09\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HM902070\_Germany\_Bavaria\_Oberbayern  
 PEZROM933-08\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HQ004388\_Romania\_Arges\_Muntenia  
 PEZROM926-08\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HQ004384\_Romania\_Hunedoara\_Transylvania  
 PEZROM920-08\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HQ004390\_Romania\_Suceara\_Moldavia  
 PEZROM154-08\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HQ004380\_Romania\_Prahova\_Muntenia  
 PEZROM153-08\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HQ004379\_Romania\_Valcea\_Olttenia  
 PEULEP3845-16\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MW503354\_Italy\_Torino  
 PEULEP3813-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW503050\_Austria\_Spittal\_an\_der\_Drau  
 PEULEP3809-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW501310\_Switzerland\_Interlaken  
 PEULEP3808-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW501387\_Russia\_Polar\_Ural  
 PEULEP2010-15\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MW501804\_Poland

E

PBBSA1462-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN145376\_Italy\_Piedmont\_Biella  
PBBSA208-15\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN140943\_Italy\_Piedmont  
PBBSA159-15\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN138527\_Italy\_Piedmont  
PER014\_COIF\_EF32381697.ab1  
PER007F\_2\_EF7117033.ab1  
PER003F\_2\_EF7117019.ab1  
PER002\_Assembly\_consensus  
PGW0RR683-10\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_JF415696\_Germany\_Bararia\_Oberbayern  
PCUPE0294-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762592\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
PCUPE0292-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762802\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
PCUPE0291-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762579\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
PCUPE0289-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762522\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
PCUPE0286-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762508\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
PCUPE0190-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762528\_France\_Hautes-Alpes  
PCUPE0185-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762456\_France\_Hautes-Alpes  
PCUPE0181-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762588\_France\_Hautes-Alpes  
PCUPE0293-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762459\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
PCUPE0290-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762571\_Italy\_Piedmont\_Verbano  
PCUPE0186-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762560\_France\_Hautes-Alpes  
PCUPE0183-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762574\_France\_Hautes-Alpes  
PCUPE0379-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762447\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0349-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762474\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0347-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762464\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0344-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762488\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0342-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762507\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0339-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762501\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0307-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762530\_Austria\_Tyrol  
PCUPE0306-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762600\_Austria\_Tyrol  
PCUPE0305-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762462\_Austria\_Tyrol  
PCUPE0303-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762570\_Austria\_Tyrol  
PCUPE0302-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762438\_Austria\_Tyrol  
PCUPE0261-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762540\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Bolzano  
PCUPE0259-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762556\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Bolzano  
PCUPE0258-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762409\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Bolzano  
PCUPE0253-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762476\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Bolzano  
PCUPE0374-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762445\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0304-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762448\_Austria\_Tyrol  
PCUPE0257-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762500\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Bolzano  
PCUPE0380-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762465\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0378-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762557\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0377-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762487\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0376-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762598\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0375-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762576\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0323-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762442\_Austria\_Carinthia  
PCUPE0318-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762563\_Austria\_Carinthia  
PCUPE0317-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762593\_Austria\_Carinthia  
PCUPE0316-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762561\_Austria\_Carinthia  
PCUPE0315-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762589\_Austria\_Carinthia  
PCUPE0314-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762529\_Austria\_Carinthia  
PCUPE0272-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762452\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0269-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762594\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0268-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762591\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0267-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762477\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0263-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762429\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0363-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762495\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0361-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762518\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0274-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762512\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0270-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762505\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0245-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762537\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
PCUPE0244-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762526\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
PCUPE0243-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762475\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
PCUPE0242-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762532\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
PCUPE0241-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762596\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
PCUPE0348-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762502\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0345-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762524\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0338-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762527\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0329-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762481\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0328-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762484\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0327-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762577\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE057-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762490\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE056-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762525\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0330-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762523\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE055-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762482\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PCUPE0346-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762536\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
PCUPE0248-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762562\_Italy\_Pordenone\_Veneto  
PCUPE0266-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762469\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PXB1180-15\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN139611\_Italy  
PCUPE0252-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762583\_Italy\_South\_Tyrol\_Suedtirol  
PCUPE0276-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762553\_France\_Ain  
PCUPE0343-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762538\_Italy\_Veneto\_Vicenza  
LEPAA496-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MK186309\_Switzerland\_Graubunden  
PER010F\_2\_EF7117035.ab1  
LEPAA329-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MK186310\_Switzerland\_Ticino  
PWBMS108-14\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN143266\_Italy\_Trentino-Alto\_Adige/Sudtirol\_Trento  
PBBSA1144-15\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_MN138628\_Italy  
PCUPE064-16\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_M762455\_Italy\_Alto\_Adige  
PHLAB369-10\_Erebia\_euryale\_COI-SP\_HQ988526\_Switzerland\_Graubunden  
PWBMS269-14\_Erebia\_ligea\_COI-SP\_MN139470\_Italy\_Lucca

E



**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.

	<b>Distanza</b>	<b>Errore Standard</b>
<i>Erebia ligea</i>	0,0196	0,0037
<i>Erebia euryale</i>	0,0029	0,0007
<b>Campioni bellunesi</b>	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.

	<i>Erebia ligea</i>	<i>Erebia euryale</i>	Campioni bellunesi
<i>Erebia ligea</i>	-	0,0024	0,0024
<i>Erebia euryale</i>	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 appartenerebbero 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.