

**UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE**  
**Area Didattica Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**  
**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Tesi di dottorato**

**Dottorato di ricerca in Biologia Avanzata**

**CICLO XXVI**  
(A.A. 2012/2013)

**Analisi filogeografica e tassonomica di**  
***Hierophis viridiflavus* (Lacépède, 1789) e *H. gemonensis* (Laurenti, 1768)**  
**(Squamata: Serpentes: Colubridae)**

Coordinatore: Prof. Luciano Gaudio

Dottorando: Dott. Marcello Mezzasalma

Tutore: Prof. Gaetano Odierna

Co-tutore: Dott. Fabio M. Guarino

# Indice

<b>1.Introduzione</b>	5
1.1 Filogeografia, diversità e conservazione	5
1.2 La radiazione dei Colubroidea	6
1.3 Il genere <i>Hierophis</i> Fitzinger, 1843	7
1.4 Caratteristiche eco-etologiche delle specie	10
1.5 Scopo della tesi	12
<b>2.Materiali e Metodi</b>	15
2.1 Campionamento	15
2.2 Analisi Molecolare	16
2.2.1 Estrazione del DNA	16
2.2.2 Amplificazione per PCR di marcatori mitocondriali e nucleari	19
2.2.3 Purificazione e sequenziamento degli amplificati	21
2.2.4 Analisi filogenetica	21
2.3 Analisi citogenetica	23
2.3.1 Allestimento dei cromosomi	23
2.3.2 Colorazioni con Giemsa, Fluorocromi, Ag-NOR banding e C-banding	24
2.3.3 NOR-FISH	25
2.4 Morfometria geometrica	26
2.5 Sequenze ripetute	29
2.5.1 Amplificazione per PCR	30
2.5.2 Ri-estrazione e ri-amplificazione	30
2.5.3 Biotinilazione di sonde a DNA	32
2.5.4 Southern blot	33
2.5.5 Dot blot	34
2.5.6 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	34
<b>3 Risultati</b>	35
3.1 Analisi molecolare	35
3.1.1 16S	35
3.1.2 Cyt-b	38
3.1.3 ND4	43
3.1.4 16S+Cyt-b+ND4	46

3.1.5 PRLR	50
3.2 Analisi citogenetica	54
3.3 Morfometria geometrica	57
3.4 Sequenze ripetute	62
3.4.1 Amplificazione e sequenziamento	62
3.4.2 Southern blot e Dot blot	63
3.4.3 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	66
<b>4 Discussione</b>	71
4.1 Filogeografia e tassonomia	71
4.1.1 Tempi e processi di diversificazione	75
4.2 Sequenze ripetute	78
<b>5 Conclusioni</b>	80
<b>Bibliografia</b>	81

*A Clelia e Ettore*

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1 DIVERSITÀ BIOLOGICA, FILOGEOGRAFIA E CONSERVAZIONE**

Lo studio della diversità e dell'evoluzione degli organismi viventi, intesa nella sua accezione darwiniana come "discendenza con modificazione" (Darwin, 1859) rappresenta l'argomento fondamentale della moderna biologia evolutiva.

I processi evolutivi possono essere esaminati a differenti livelli, ma i meccanismi di diversificazione all'interno delle specie e gli eventi di speciazione hanno un ruolo fondamentale nella generazione di nuova diversità biologica (Darwin & Wallace, 1858; Darwin, 1859; Cook, 1906; Dobzhansky, 1937; Mayr, 1963; White, 1978; Lewontin, 1997; Safran & Nosil, 2012).

A tale scala, la filogeografia, nata dall'incontro di filogenesi molecolare, genetica di popolazioni e biogeografia (Avice, 1987; Hickerson et al., 2010), è da intendersi come uno studio filogenetico di dati genetici geograficamente contestualizzati. Gli scopi principali dell'approccio filogeografico sono di avanzare e testare ipotesi riguardo i processi storici responsabili della distribuzione sul territorio degli organismi studiati e a proposito dei relativi meccanismi di diversificazione e speciazione (Avice et al., 1987; Avice, 2000). Tali analisi possono inoltre condurre ad una migliore risoluzione di queste problematiche quando vengono presi contemporaneamente in considerazione organismi caratterizzati da una simile distribuzione e/o che condividono una comune storia evolutiva (filogeografia comparata) (Avice et al., 1987; Hickerson et al., 2010). Tramite la ricostruzione di una genealogia di popolazioni è possibile identificare negli organismi di studio l'esistenza di distinti cladi con una diversa distribuzione spaziale, ottenendo utili informazioni che possono riguardare la loro storia demografica, i tempi di divergenza e l'esistenza di diversi raggruppamenti di livello tassonomico (Hickerson et al., 2010). Inoltre, una corretta valutazione della diversità esistente negli organismi di studio costituisce uno dei prerequisiti fondamentali per una loro adeguata conservazione, identificando aree geografiche e popolazioni meritevoli di particolari attenzioni (Moritz, 1994).

La diversità biologica globale è infatti ancora limitatamente conosciuta (Chapman, 2009), ma le moderne metodologie di indagine, grazie soprattutto agli strumenti offerti dalla biologia molecolare, stanno gradualmente contribuendo ad una migliore risoluzione della reale diversità di specie esistenti sul pianeta (Costello et al., 2013).

## **1.2 LA RADIAZIONE DEI COLUBROIDEA**

La superfamiglia Colubroidea, con più di 2500 specie di serpenti viventi, rappresenta uno dei più grandi e diversificati raggruppamenti di Vertebrati terrestri (vedi ad es. Pough et al., 2004; Lawson et al., 2005).

Nonostante negli ultimi anni diversi studi abbiano evidenziato la recente origine di questo ampio raggruppamento tassonomico, da collocarsi nel Cenozoico (Burbrink & Pyron, 2008; Vidal et al., 2009), i Colubroidea sono attualmente distribuiti su gran parte del pianeta, ad eccezione dei poli, esibendo una notevole varietà di forme e di adattamenti caratteristici.

Proprio la grande varietà e diversità di specie comprese in questa superfamiglia, unita alla loro considerevole adattabilità ad ambienti anche molto diversi tra loro, hanno reso la storia evolutiva e la biologia di questi animali particolarmente interessanti ed oggetto di studio di innumerevoli ricerche. Dal punto di vista evolutivo, l'origine monofiletica di questo gruppo è considerata fortemente supportata da dati morfologici e molecolari (Rieppel, 1988; Lee & Scanlon, 2002; Lawson et al., 2005; Pyron et al., 2011).

Tuttavia, le relazioni filogenetiche esistenti all'interno della superfamiglia sono complesse e sono state rivisitate più volte negli ultimi anni, soprattutto grazie ad analisi genetiche (vedi ad es. Cadle, 1988; Heise et al., 1995; Kraus & Brown, 1998; Gravlund, 2001; Nagy et al., 2004; Lawson et al., 2005; Pyron et al., 2011).

Attualmente si ritiene che il gruppo comprenda sette distinte famiglie di serpenti evolutivamente avanzati: Xenodermatidae, Pareasidae, Viperidae, Homalopsidae, Elapidae, Lamprophidae e Colubridae (Pyron et al., 2011) (Fig. 1).

Tra queste quella dei Colubridae, che comprende le specie oggetto di questa ricerca, è suddivisibile in almeno cinque sottofamiglie (le cui relazioni filogenetiche sono state però solo parzialmente chiarite da recenti studi molecolari (Lawson et al., 2005; Pyron et al., 2011).

Tale famiglia è ricca d'interesse dal punto di vista evolutivo, biogeografico ed ecologico, rappresentando, al proprio livello tassonomico, uno dei più vasti raggruppamenti di serpenti del pianeta (Pough et al., 2004; Pyron et al., 2011).

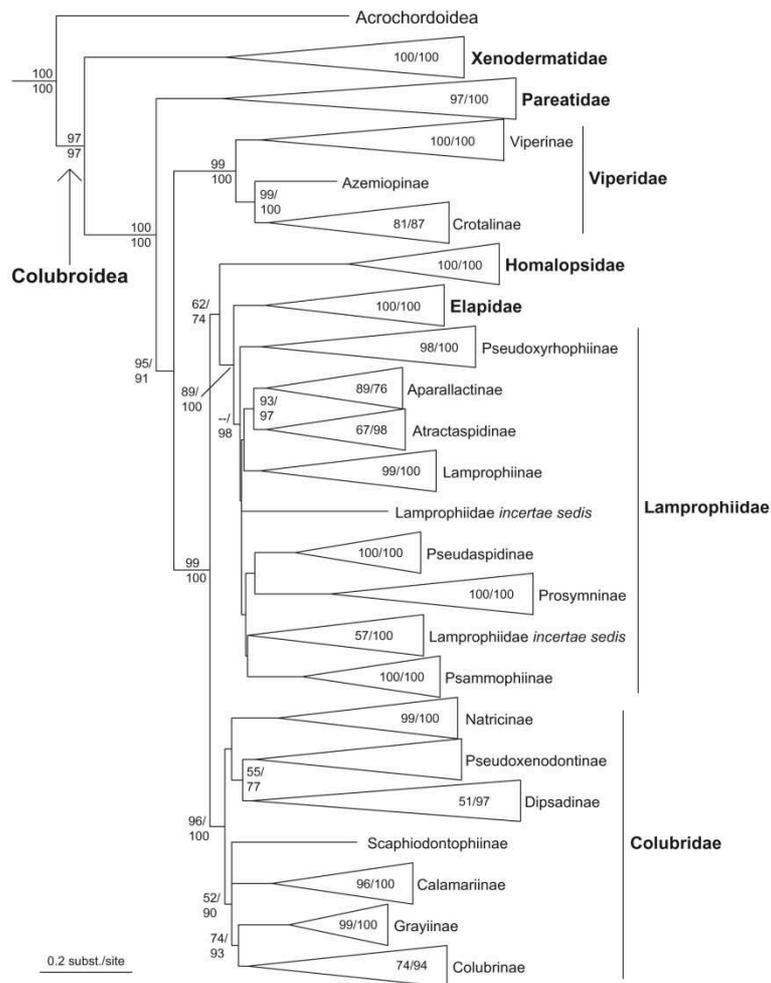


Fig. 1. Albero filogenetico dei Colubroidea, modificato da Pyron et al., 2011.

### 1.3 IL GENERE *HIEROPHIS* FITZINGER, 1843

Il genere *Hierophis* appartiene ad un'ampia e diversificata radiazione di colubridi, complessivamente noti come "whip snakes" o "racers", la cui posizione sistematica è stata oggetto di numerose revisioni (Ortenburger, 1928; Inger and Clark, 1943; Schatti, 1986a,b; 1987; 1988a,b; Schatti & Utiger, 2001; Nagy et al., 2004; Pyron et al., 2011). Fino alle più recenti indagini molecolari le specie appartenenti ai "whip snakes" euroasiatici erano quasi tutte ascritte al maxi-genere *Coluber* Linnaeus, 1758, poi riconosciuto come polifiletico e suddiviso in una serie di generi diversamente imparentati tra loro. In particolare, secondo le attuali conoscenze il ramo evolutivo del genere *Hierophis* comprende gli affini generi *Eirenis* Jan, 1863 e *Dolichophis* Gistel, 1868 (vedi Fig. 2) le cui relazioni filogenetiche sono state però solo parzialmente chiarite (Nagy et al., 2004; Pyron et al., 2011).

Alla luce delle recenti indagini, il genere *Hierophis* può essere ritenuto un'unità monofiletica se considerato composto esclusivamente dalle “sister species” *Hierophis viridiflavus* (Lacépède, 1789) (comunemente noto come biacco) e *H. gemonensis* (Laurenti, 1768) (colubro dei Balcani) (Fig. 3), oppure parafiletica se si includono anche specie attualmente di incerta attribuzione (quali *H. cypriensis* e *H. spinalis*) (vedi Nagy et al., 2004; Pyron et al., 2011).

Le due specie sorelle oggetto di questa ricerca, furono storicamente considerate un'unica entità specifica da Boulenger (1913) essendo molto simili morfologicamente. Esse presentano una distribuzione tipicamente parapatrica. *Hierophis viridiflavus* è diffuso nell'area mediterranea occidentale (in tutta l'Italia, Sicilia e Sardegna comprese, Istria, Slovenia meridionale, Svizzera meridionale, Spagna nord orientale), in Francia centro-meridionale e Lussemburgo, Malta e in molte isole minori (Fig. 4A) (Vanni & Nistri, 2006; Vanni & Zuffi, 2011). *Hierophis gemonensis* ha, invece, una distribuzione mediterranea a baricentro orientale (Fig. 4B), e risulta presente lungo tutta la costa balcanica e in Grecia, comprese varie isole (Ionie, Cicladi, Creta, e alcune delle Sporadi) (Valakos et al., 2008; Vanni et al., 2011). Gli areali di distribuzione delle due specie presentano una ristretta area di sovrapposizione che comprende una limitata porzione della Slovenia e dell'Istria (Gasc et al., 1997; Corti et al., 2011).

La storia tassonomica di entrambe le specie, più volte rivisitata negli ultimi anni, è complessa e presenta notevoli punti di interesse. Il biacco è stato a lungo considerato una specie politipica (Vanni & Zuffi, 2011), con diverse entità sottospecifiche tradizionalmente distinte in base a caratteri morfologici, principalmente rappresentati da diverse tipologie di colorazione dorsale: la sottospecie nominale; *H. v. carbonarius*, descritta da Bonaparte nel 1833; *H. v. kratzeri*, descritta da Kramer nel 1971, simile alla sottospecie nominale ma ritenuta endemica dell'Isola di Montecristo. Tuttavia attualmente si ritiene che le sottospecie sopra citate non abbiano valore tassonomico ma che rappresentino soltanto dei fenotipi differenti, e la sola morfologia non pare idonea a risolvere la tassonomia di questa specie (Schätti & Vanni, 1986; Vanni & Nistri, 2006; Vanni e Zuffi, 2011). Inoltre, recenti studi molecolari (Nagy et al., 2002; Rato et al., 2009) evidenziano come la specie sia altamente strutturata dal punto di vista genetico, ma non conducono a conclusioni tassonomiche definitive. Entrambi gli studi molecolari individuano due cladi principali, uno occidentale e l'altro orientale,

ma le relazioni filogenetiche esistenti tra le diverse popolazioni della specie restano ancora poco chiare e solo parzialmente definite. Inoltre, i confini geografici esistenti tra i diversi aplotipi individuati e le eventuali zone di sovrapposizione esistenti nella loro distribuzione restano tuttora largamente indeterminati. Alcuni autori propongono di elevare al rango di sottospecie alcune popolazioni dell'Italia meridionale (*H. v. xanthurus*) (vedi Nagy et al., 2003; Joger et al., 2010), ma ulteriori dati sembrano necessari per chiarire tali questioni.

Decisamente meno numerose sono le informazioni e gli studi riguardanti la tassonomia e, più in generale la storia naturale del colubro dei Balcani. Al contrario di quanto detto per il biacco, *H. gemonensis* è stato storicamente considerato un'entità specifica monotipica (Vanni et al., 2011) non presentando differenti fenotipi tra loro facilmente distinguibili. Un'unica eccezione riguarda la sottospecie *gyarosensis* Mertens, 1968 che, fino a poco tempo fa considerata un endemismo dell'isola di Gyros, fu poi riconosciuta non valida da Utiger & Schatti (2004). Inoltre, attualmente sono pochi i dati molecolari riguardanti il colubro dei Balcani, e conseguentemente le conoscenze tassonomiche e filogeografiche della specie appaiono ancora limitate. In particolare, i dati molecolari disponibili per il colubro dei Balcani sono in gran parte ascrivibili ad un recente studio relativo alla biogeografia dei serpenti di Creta (Kyriazi et al., 2013), il quale ha individuato sull'isola l'esistenza di popolazioni geneticamente diversificate rispetto a quelle presenti sul continente.

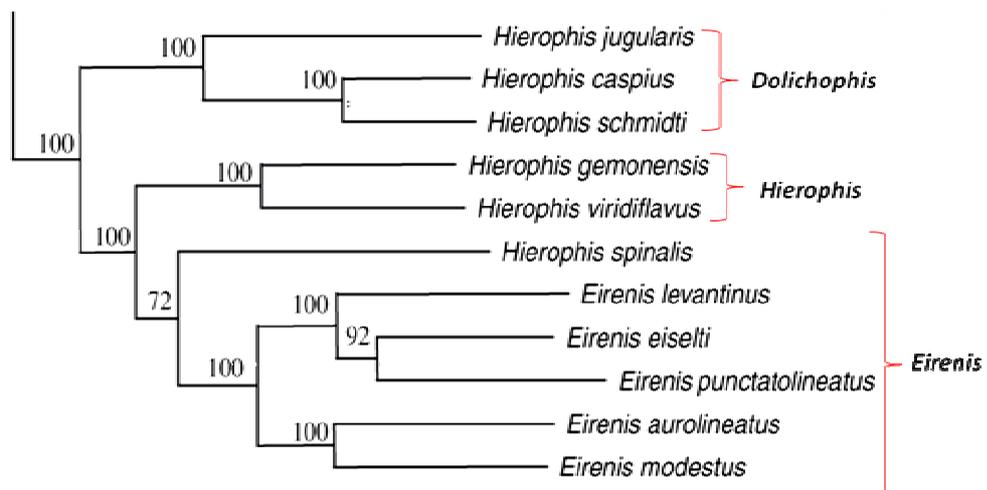


Fig. 2. Albero filogenetico del ramo evolutivo del genere *Hierophis* modificato da Nagy et al., 2004. A fianco alle parentesi vengono riportati i generi proposti dagli autori.



Fig. 3. Esemplici di *H. viridiflavus* (a sinistra) e *H. gemonensis* (a destra) Foto di M. Mezzasalma e A. Dall'Asta.

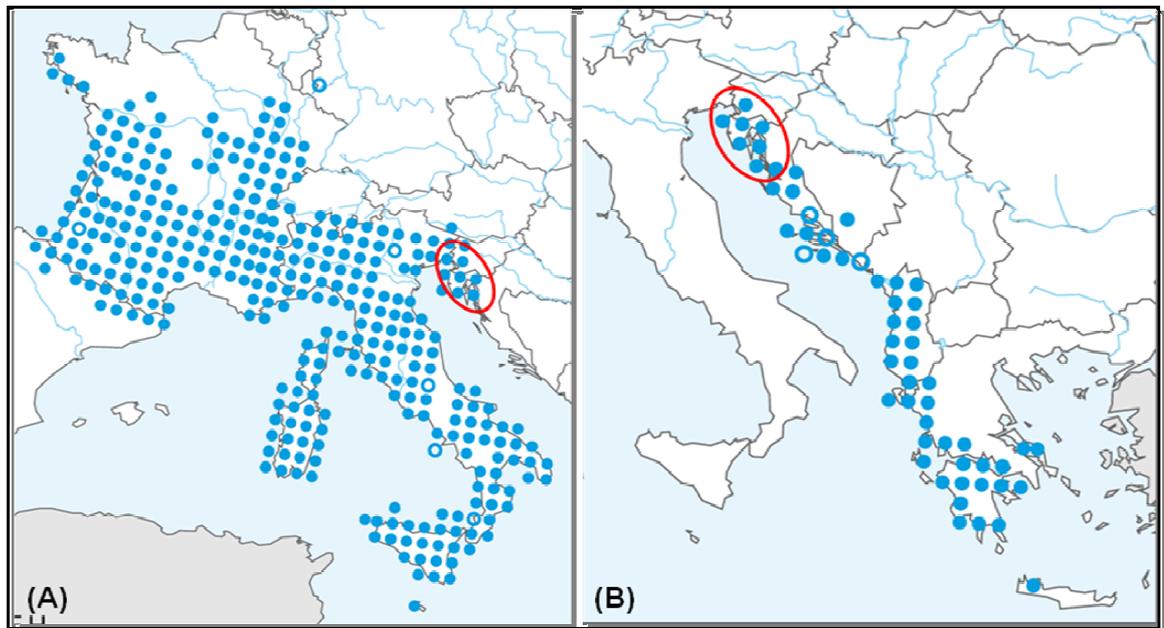


Fig. 4. Distribuzione di *H. viridiflavus* (A) e *H. gemonensis* (B) modificata da Gasc et al., 1997. Cerchiata in rosso viene mostrata la zona di sovrapposizione tra i due areali.

#### 1.4 CARATTERISTICHE ECO-ETOLOGICHE DELLE SPECIE

Le similitudini tra il biacco ed il colubro dei Balcani non si limitano alla morfologia e le due specie presentano simili caratteristiche biologiche ed ecologiche (Corti et al., 2011). Inoltre, le abitudini e le preferenze ambientali di *H. gemonensis* risultano ancora limitatamente studiate mentre sono state oggetto di un maggior numero di ricerche nel caso di *H. viridiflavus* (vedi ad es. Capula et al., 1997; 2008; Flippi et al.,

2004; Fornasiero et al., 2007; 2011). Pertanto, allo stato attuale non emergono chiare differenze eco-etologiche tra le due specie.

In generale, entrambe sono euriecie, adattabili e rinvenibili in una grande varietà di ambienti diversi. E' infatti possibile osservarle in luoghi aridi, in aree rocciose e in ambienti ricchi di vegetazione arborea o arbustiva di vario genere (boschi sempreverdi, boschi misti, macchia mediterranea, gariga ecc.) ed entrambe sono rinvenibili con frequenza in aree antropizzate. La distribuzione altitudinale di *H. viridiflavus* è compresa dal livello del mare fino a circa 1800 m di quota (Vanni & Nistri, 2006), *H. gemonensis* è invece rinvenibile fino a circa 1400 m (Valakos et al., 2008), ma entrambe risultano più comuni a basse altitudini. L'attività annuale si estende tra marzo-aprile a settembre-ottobre, con possibili variazioni in dipendenza di quota, latitudine e esposizione dei versanti. Se le condizioni sono localmente favorevoli il periodo di attività può prolungarsi anche in inverno (Corti et al., 2011). Sia *H. viridiflavus* sia *H. gemonensis* sono specie prevalentemente diurne, ma nei mesi più caldi l'attività giornaliera può estendersi anche ad ore crepuscolari o notturne (Corti et al., 2011; Delaguerre, 2013). Gli accoppiamenti hanno luogo tra aprile e giugno ed i maschi si affrontano in combattimenti ritualizzati. Tra giugno e luglio le femmine depongono normalmente 5-15 uova (Heimes, 1993) in nascondigli di vario tipo, generalmente sotto rocce, in fessure o alla base di cespugli. Le uova sono biancastre, di forma allungata e possono presentare delle concrezioni stellate. La schiusa avviene dopo circa 6-8 settimane, in prevalenza tra la seconda metà di agosto e gli inizi di settembre e i giovani misurano circa 15-25 cm di lunghezza (Vanni e Zuffi, 2011). In *H. viridiflavus* la maturità sessuale è raggiunta a circa 3-4 anni di età nei maschi e a 4-5 anni nelle femmine e la lunghezza della vita può arrivare a 30 anni (Bruno & Maugieri, 1990; Vanni & Zuffi, 2011). Entrambe le specie sono mordaci, veloci, molto rapide nei movimenti e possiedono buone doti di nuotatore e arrampicatore. La dieta può comprendere una grande varietà di prede che vengono cacciate a vista. Prede tipiche includono micromammiferi, Sauri, Uccelli, Anfibi e altri Serpenti (anche conspecifici). I principali predatori includono Mammiferi carnivori e diverse specie di Uccelli (Bruno & Maugieri, 1990).

## 1.5 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa ricerca è quello di descrivere la diversità esistente tra e all'interno delle due specie oggetto di studio, ricostruendo i meccanismi e i principali eventi che ne hanno plasmato i processi di diversificazione.

Più in particolare, nel presente studio è stata condotta un'analisi filogeografica e tassonomica comparata di *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* al fine di ricostruire le relazioni filogenetiche e le dinamiche evolutive esistenti tra le due specie e tra le diverse popolazioni delle stesse considerando l'insieme dei loro rispettivi areali di distribuzione. Alla luce del grado di diversità esistente nelle specie oggetto di studio, e considerando l'esistenza di diversi cladi di livello tassonomico e non, particolare attenzione è stata posta, infine, nello studio dei processi storici che possono aver contribuito a modellare la loro attuale distribuzione geografica.

*Hierophis viridiflavus* e *H. gemonensis* rappresentano ottimi modelli per lo studio dei processi di diversificazione inter- ed intraspecifici, essendo esse considerate "sister species" (vedi Nagy et al., 2004), ovvero specie tra loro strettamente imparentate e separate da un unico processo di speciazione (Coyne & Orr, 2004). La loro distribuzione tipicamente parapatria, contenente una ristretta area di sovrapposizione dei rispettivi areali (vedi Gasc et al., 1997; Corti et al., 2011), consente di valutare la presenza o l'assenza di flusso genetico e di fenomeni di ibridazione tra le due specie nella loro zona di simpatria. Inoltre, la complessità geomorfologica e le differenze e le somiglianze geografiche e ambientali che caratterizzano gli areali di distribuzione delle due specie rappresentano utili riferimenti nell'interpretazione delle rispettive diversità intraspecifiche.

La diversità esistente tra due organismi è, in ogni caso, da intendersi come una realtà complessa e non facilmente misurabile o descrivibile senza tenere in considerazione una serie di caratteristiche di diversa natura.

La presente ricerca è stata pertanto condotta seguendo un approccio metodologico multidisciplinare, comprendente: (i) analisi molecolare di marcatori nucleari e mitocondriali; (ii) analisi citogenetica classica e molecolare; (iii) analisi di morfometria geometrica.

L'analisi molecolare, basata sullo studio di una selezione di marcatori mitocondriali e nucleari, è principalmente preposta a stimare le diversità genetiche inter- ed intraspecifiche, ricostruendo una genealogia delle popolazioni delle due specie.

Inoltre, le distanze genetiche osservabili possono essere usate per una stima dei tempi di divergenza dei diversi cladi individuati suggerendo possibili correlazioni con eventi geologico-ambientali e permettendo di ricostruire i principali episodi che hanno caratterizzato la loro storia naturale (Kumar, 2005).

Sono stati presi in considerazione per questo tipo di analisi una serie di marcatori molecolari già utilizzati in diversi studi di filogenesi, sistematica e tassonomia molecolare di diversi raggruppamenti di Squamata, scelti in base alle loro diverse velocità di evoluzione e all'opportunità di reperire sequenze omologhe dalla rete (Burbrink et al., 2000; Oliverio et al., 2000; Ota et al., 2002; Lenk et al., 2001; Utiger et al., 2002; Harris et al., 2004; Nagy et al., 2004; Guicking et al., 2006; Santos et al., 2008; Townsend et al., 2008).

In particolare, lo studio del DNA mitocondriale, date le sue peculiari caratteristiche (Brown et al., 1979), risulta essere particolarmente adatto a descrivere la variabilità genetica a bassi livelli tassonomici, e diversi studi su diverse specie di rettili forniscono una robusta documentazione riguardo la significativa correlazione tra diversità genetica mitocondriale e il riconoscimento di distinte unità tassonomiche (vedi ad es. Ashton et al., 2001; Guicking et al., 2006; Joger et al., 2007; Ferchaud et al. 2012; Gvoždík et al., 2010, 2012; Kornilios et al., 2013).

La citogenetica e in particolare lo studio di ploidia, forma, dimensioni e struttura dei cromosomi può contribuire a fornire ulteriori informazioni, indipendenti da quelle molecolari e morfologiche, che possono essere utilizzate in analisi filogenetiche e tassonomiche (Oguiura et al., 2010). I cromosomi possono essere considerati infatti una manifestazione morfologica del patrimonio genetico di un organismo e le informazioni derivanti dal loro studio possono risultare utili nell'individuazione di caratteri distintivi di significato evolutivo non rilevabili con altre metodiche. Inoltre, è noto dalla letteratura disponibile che nei Rettili differenze cromosomiche sono spesso correlate a differenze tassonomiche (Olmo, 1986; Olmo, 2005). La maggior parte degli studi di citotassonomia classica è basato sul riconoscimento di differenze riscontrabili nel numero e nella morfologia dei cromosomi, e più raramente, sul diverso contenuto, struttura e localizzazione di eucromatina ed eterocromatina mediante vari tipi di bandeggio cromosomico (Olmo 1986; Session & Kezer, 1987; Macgregor et al, 1990; King, 1990; Green & Session, 1991). In generale, le principali differenze cromosomiche riscontrate in tali studi sono imputabili a traslocazioni

robertsoniane (fusioni e fissioni cromosomiche centromeriche) e a inversioni pericentriche (che coinvolgono il centromero) e paracentromeriche (che avvengono esternamente alla regione centromerica). Tali macromutazioni, possono infatti costituire caratteristiche cromosomiche peculiari di organismi appartenenti a distinti raggruppamenti tassonomici e quindi caratterizzati da una diversa storia naturale (vedi ad es. White, 1978; King, 1993; Kirkpatrick, 2010; Lee et al., 2013).

Essendo le due specie di studio molto simili tra loro sono pochi i caratteri morfologici che si prestano ad uno studio della diversità fenotipica esistente associabile ad una diversa storia filogenetica. Inoltre, i caratteri morfologici tradizionalmente utilizzati per analisi tassonomiche nei serpenti corrispondono in gran parte ad una serie di caratteri meristici (legati alla lepidosi) che risultano essere poco informativi nelle specie studiate (Corti et al., 2011).

Pertanto, allo scopo di individuare un possibile grado di variabilità morfologica (inter- e intraspecifica), associabile ad informazioni filogenetiche, è stata effettuata un'analisi di morfometria geometrica (Rohlf & Marcus, 1993), costituita da uno studio dei landmarks della lepidosi cefalica. La morfometria geometrica è stata utilizzata più volte per misurare il grado di variabilità fenotipica in diverse categorie di Vertebrati (vedi ad es. Loy et al., 2001; Bruner & Costantini, 2007; Kaliontzopoulou et al., 2007; Chakrabarty et al., 2010; Raia et al., 2010; Klingenberg & Marugán-Lobón, 2013), ma attualmente sono scarsi gli studi di questo tipo aventi come oggetto i serpenti (Manier, 2004; Tjarks, 2009; Kaliontzopoulou, 2011; Llorente et al., 2012).

In aggiunta, durante la realizzazione di questo studio, sono state isolate tre nuove sequenze ripetute intersperse di DNA. Tali sequenze sono state caratterizzate per quanto riguarda la loro composizione nucleotidica, quantizzazione genomica, localizzazione cromosomica e conservazione in altre specie di serpenti appartenenti alla vasta radiazione dei Colubroidea.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 CAMPIONAMENTO**

La rappresentatività del campione costituisce un fattore determinante per la realizzazione di studi tassonomici e filogeografici di livello specifico e sottospecifico. Prendere in considerazione la più ampia porzione possibile dell'areale di distribuzione delle specie studiate ricopre, infatti, particolare importanza nell'ottica di analizzare correttamente e con la minore approssimazione possibile le diversità specifiche e sottospecifiche (Avice, 1994).

Al fine di ottenere un campionamento di individui quanto più possibile rappresentativo dell'areale di distribuzione delle specie oggetto di studio sono state realizzate delle collaborazioni con diversi istituti museali italiani e internazionali e con diversi erpetologi che hanno fornito campioni provenienti dalle loro rispettive collezioni.

Gli istituti che hanno collaborato al presente progetto di ricerca fornendo campioni di esemplari presenti nelle loro rispettivi archivi sono i seguenti:

- Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II
- Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara
- Museo Civico di Storia Naturale di Trieste
- Natural History Museum of Crete
- Museo di Storia Naturale e del Territorio dell'Università di Pisa
- Museo Regionale di Storia Naturale di Torino
- Natural History Museum of Barcelona
- Centre d'ecologie fonctionelle et èvolutive. Montpellier
- Institute of Zoology, University of Belgrade

In tal modo è stato possibile ottenere un campione totale di 83 esemplari utilizzati per l'analisi molecolare (vedi Tab. 1) e di 96 esemplari per l'analisi di morfometria geometrica (vedi Tab. 3).

## 2.2 ANALISI MOLECOLARE

### 2.2.1 ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA genomico è stato estratto dai campioni disponibili utilizzando differenti metodiche in relazione alla diversa natura del campione di partenza.

L'estrazione del DNA da sospensioni cellulari conservate in Carnoy acetico (alcool metilico/acido acetico glaciale (3:1) è avvenuta seguendo il protocollo riportato da Sambrook et al. (1989).

- Centrifugare i campioni a 5.000 rpm per 5 min.
- Allontanare il surnatante e aggiungere 1 ml di PBS 1X (tampone salino-fosfato).
- Centrifugare a 5.000 rpm per 5 minuti.
- Allontanare il surnatante e aggiungere 1 ml di TE (Tris-EDTA in un rapporto di 10 mM a 1 mM a pH 8).
- Centrifugare a 5.000 rpm per 5 minuti e allontanare il supernatante.
- Aggiungere un volume finale di TE, in base alla quantità di DNA da estrarre, 1/100 di proteinasi K (10 mg/ml) e 1/10 del volume di SDS 10% (sodio dodecil solfato).
- Incubare 1-2 ore a 56°C 3 over-night a 37°C (opzionale).
- Aggiungere 1/10 del volume di perclorato di sodio 5 M (NaClO<sub>4</sub>) e un ugual volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1).
- Agitare lentamente per circa 5-10 min.
- Centrifugare a 10.000 rpm per 10 min e trasferire il surnatante è stato quindi prelevato e posto in nuove provette sterili.
- Aggiungere un ugual volume di cloroformio/alcool isoamilico (24:1).
- Agitare lentamente per 5 minuti-10 min.
- Centrifugazione a 7.000 rpm per 10 min.
- Trasferire il surnatante chiaro in nuove provette sterili.
- Precipitare il DNA mediante aggiunta del doppio in volume etanolo 100% a freddo.
- Agitare lentamente per mescolare le due fasi.
- Centrifugare a 10.000 rpm per 10 minuti.

- Allontanare il surnatante.
- Lavare in etanolo 70%.
- Centrifugare a 10.000 rpm per 10 minuti.
- Allontanare il surnatante.
- Essiccare il DNA.
- Sospendere il DNA con un'adeguato volume di TE (20-100 µl) in relazione alla quantità di precipitato ottenuto.

Il DNA genomico è stato estratto da campioni provenienti da collezioni museali e private (prevalentemente costituiti da frammenti di tessuto osseo, muscolare e connettivale, fissati in etanolo 100% e conservati in etanolo 70%) seguendo un protocollo modificato da Sokolov (2000).

Tale metodica prevede i seguenti passaggi:

- Frammentazione dei campioni di tessuto mineralizzato e loro demineralizzazione in acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0,5 M pH 7,4 per 2-3 giorni.
- Allontanare l'EDTA mediante centrifugazione e lavaggio in TE 1x pH8
- Digestione dei campioni in una soluzione tampone di lisi composta da Tris-HCl 50mM pH7,5, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, 1/10 in vol di sodio dodecilsolfato (SDS) e 1/100 in vol di proteinasi K, per 1-2 ore a 56°C e a 37°C "overnight" (opzionale).
- Aggiungere 1/10 di vol di soluzione satura di cloruro di potassio (KCl), e incubare in ghiaccio per 5 min.
- Centrifugare per 15 min a 13000 rpm e trasferire il supernatante in una nuova provetta sterile da 1,5 ml e processato come descritto precedentemente per la doppia estrazione con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1) e cloroformio/alcool isoamilico (24:1).

In alternativa ai protocolli descritti in precedenza, per alcuni campioni museali, la estrazione di DNA genomico sono state realizzate utilizzando il REDExtract-N-Amp<sup>™</sup> Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Tab. 1. Campioni utilizzati nell'analisi molecolare.

<b>SPECIE</b>	<b>TOPONIMO</b>	<b>CODICE</b>
<i>H. viridiflavus</i>	Lagonegro (PZ)	Hv1
<i>H. viridiflavus</i>	Pietraroja (BN)	Hv2
<i>H. viridiflavus</i>	Arties, Catalogna (Spagna)	Hv3
<i>H. viridiflavus</i>	Pisa	Hv4
<i>H. viridiflavus</i>	Lentiai (BL)	Hv5
<i>H. viridiflavus</i>	Sefro (AN)	Hv6
<i>H. viridiflavus</i>	Avellino	Hv7
<i>H. viridiflavus</i>	Monterano (RM)	Hv8
<i>H. viridiflavus</i>	Cetraro (CS)	Hv9
<i>H. viridiflavus</i>	Ancona	Hv10
<i>H. viridiflavus</i>	Cava dei Tirreni (SA)	Hv11
<i>H. viridiflavus</i>	Vallone Argentino	Hv12
<i>H. viridiflavus</i>	Bovino (FG)	Hv13
<i>H. viridiflavus</i>	Ancona	Hv14
<i>H. viridiflavus</i>	Padriciano (TS)	Hv15
<i>H. viridiflavus</i>	Amalfi (SA)	Hv16
<i>H. viridiflavus</i>	Gentili (PV)	Hv17
<i>H. viridiflavus</i>	Palinuro (SA)	Hv18
<i>H. viridiflavus</i>	Capraia (LI)	Hv19
<i>H. viridiflavus</i>	Iria (ME)	Hv20
<i>H. viridiflavus</i>	Montenovo (FC)	Hv21
<i>H. viridiflavus</i>	Mantova	Hv22
<i>H. viridiflavus</i>	Calanca, Corsica (Francia)	Hv23
<i>H. viridiflavus</i>	Lecce	Hv24
<i>H. viridiflavus</i>	Blegiers (Francia)	Hv25
<i>H. viridiflavus</i>	Montagnac la Crempx (Francia)	Hv26
<i>H. viridiflavus</i>	Valle Strona (VA)	Hv27
<i>H. viridiflavus</i>	Asti	Hv28
<i>H. viridiflavus</i>	Brusques (Francia)	Hv29
<i>H. viridiflavus</i>	Campi Bisenzio (FI)	Hv30
<i>H. viridiflavus</i>	Lamone (PI)	Hv31
<i>H. viridiflavus</i>	Obzova, Krk (Croazia)	Hv32
<i>H. viridiflavus</i>	Talponedo (PN)	Hv33
<i>H. viridiflavus</i>	Tombolo (PI)	Hv34
<i>H. viridiflavus</i>	Calci (PI)	Hv35
<i>H. viridiflavus</i>	Roma	Hv36
<i>H. viridiflavus</i>	Castelnau Chalosse (Francia)	Hv37
<i>H. viridiflavus</i>	Milau (Francia)	Hv38
<i>H. viridiflavus</i>	Larzac (Francia)	Hv39
<i>H. viridiflavus</i>	Monzuno (BO)	Hv40
<i>H. viridiflavus</i>	Biguglia, Corsica (Francia)	Hv41
<i>H. viridiflavus</i>	S. Bartolomeo in Bosco (FE)	Hv42
<i>H. viridiflavus</i>	Alessandria	Hv43

<i>H. viridiflavus</i>	Aosta	Hv44
<i>H. viridiflavus</i>	Asinara (SS)	Hv45
<i>H. viridiflavus</i>	S. Nicola Arcella (CS)	Hv46
<i>H. viridiflavus</i>	Lago Spartà (ME)	Hv47
<i>H. viridiflavus</i>	Foulon (Francia)	Hv48
<i>H. viridiflavus</i>	Ravin des Sauzeries (Francia)	Hv49
<i>H. viridiflavus</i>	Pescara	Hv50
<i>H. viridiflavus</i>	Soccavo	Hv51
<i>H. gemonensis</i>	Pag (Croazia)	Hg1
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	Hg2
<i>H. gemonensis</i>	Voukkanou (Grecia)	Hg3
<i>H. gemonensis</i>	Fiume Aoos, Iperios (Grecia)	Hg4
<i>H. gemonensis</i>	Megalo Peristeri (Grecia)	Hg5
<i>H. gemonensis</i>	Araxos (Grecia)	Hg6
<i>H. gemonensis</i>	Mursini, Creta (Grecia)	Hg7
<i>H. gemonensis</i>	Voni, Creta (Grecia)	Hg8
<i>H. gemonensis</i>	Tebloni, Corfù (Grecia)	Hg9
<i>H. gemonensis</i>	Kalogria (Grecia)	Hg10
<i>H. gemonensis</i>	Kalogria (Grecia)	Hg11
<i>H. gemonensis</i>	Foloi (Grecia)	Hg12
<i>H. gemonensis</i>	Chani Panopoulou (Grecia)	Hg13
<i>H. gemonensis</i>	Megalo Kouneli (Grecia)	Hg14
<i>H. gemonensis</i>	Michoi (Grecia)	Hg15
<i>H. gemonensis</i>	Makrokythira, Kithira (Grecia)	Hg16
<i>H. gemonensis</i>	Argos (Grecia)	Hg17
<i>H. gemonensis</i>	Mt Parnasos (Grecia)	Hg18
<i>H. gemonensis</i>	Lampaina (Grecia)	Hg19
<i>H. gemonensis</i>	Ostros (Montenegro)	Hg20
<i>H. gemonensis</i>	Nafpaktos (Grecia)	Hg21
<i>H. gemonensis</i>	Sibinj (Croazia)	Hg22
<i>H. gemonensis</i>	Zadar (Croazia)	Hg23
<i>H. gemonensis</i>	Lastva (Montenegro)	Hg24
<i>H. gemonensis</i>	Debar (Macedonia)	Hg25
<i>H. gemonensis</i>	Vilusi (Montenegro)	Hg26
<i>H. gemonensis</i>	Tzoumerka (Grecia)	Hg27
<i>H. gemonensis</i>	Kalamata (Grecia)	Hg28
<i>H. gemonensis</i>	Argos (Grecia)	Hg29
<i>H. gemonensis</i>	Fitiai (Grecia)	Hg30
<i>H. gemonensis</i>	Cres (Croazia)	Hg31
<i>H. gemonensis</i>	Argos (Grecia)	Hg32

### 2.2.2 AMPLIFICAZIONE PER PCR DI MARCATORI MITOCONDRIALI E NUCLEARI

Per l'analisi filogenetica molecolare è stata presa in considerazione una selezione di marcatori mitocondriali composta dal gene della subunità ribosomale mitocondriale 16S (16S), dal gene codificante per il citocromo-b (Cyt-b) e dal gene codificante per la

sub-unità 4 dell'NADH deidrogenasi (ND4). E' stato inoltre adoperato come marcatore nucleare il gene codificante per il recettore della prolattina (PRLR).

Tutte le amplificazioni di PCR sono state effettuate in un volume di reazione di 20 µl utilizzando i seguenti reagenti: 2 µl di Buffer (10x) 0,4 µl di MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,8 µl di dNTP (mix 2,5 mM), 0,2 µl di Primers (mix di For + Rev 50 mM) 0,2 ml di Taq DNA Polymerase Invitrogen (5U/ml) 1 ml di DNA (100ng/ml), mQH<sub>2</sub>O a volume.

I campioni di DNA estratti usando REDEExtract-N-Amp<sup>™</sup> Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) sono stati amplificati mediante PCR seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Un tratto di circa 550 cb del 16S è stato amplificato utilizzando una coppia di primers universali (Palumbi, 1996):

16Sa 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3',

16Sb 5'- CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

e una coppia appositamente disegnata:

16SHvF 5'- WAACTGTGAMCCCAACACAG-3'

16SHvR 5'-ATAGATAGAAACCGACCTGG -3'.

Un frammento del Cyt-b di circa 550 cb è stato amplificato utilizzando le due seguenti coppie di primers appositamente disegnate per questo studio:

per *H. viridiflavus*

CytbHvF 5'-ATGCCCAACCATCATATAC-3'

CytbHvR 5'- GAGCCTTCAGTATGGAGA -3'

per *H. gemonensis*

CytbHgF 5'-ATGTCCAACCAACACATAC-3'

CytbHgR 5'- CGGTTATTGAGATCTTATTTTC-3'.

Un tratto di circa 550 cb del gene nucleare PRLR è stato amplificato mediante la coppia di primers appositamente disegnata:

P8F 5'-CATGGAAAGAGTCACCCCAA-3'

P8R 5'- GTAGAGGTGAAAGGCAACTC-3',

Un frammento di circa 600 cb dell'ND4 è stato amplificato utilizzando la coppia di primers appositamente disegnata:

ND4HvF 5'-AAGCTCGGAGGRTAYGG-3'

ND4HvR 5-GGRYTAGKGGGRTGATG-3'.

Le condizioni di PCR utilizzate per le reazioni di amplificazione dei marcatori mitocondriali 16S, Cyt-b del gene nucleare PRLR sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 94°C per 5 min, seguita da 36 cicli, ognuno composto da denaturazione a 94°C per 30 s, “annealing” a 50°C per 45 s, estensione a 72°C per 45 s; fase di estensione finale a 72°C per 7 min.

I parametri delle reazioni di amplificazione del marcatore mitocondriale ND4 sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 94°C per 5 min; 36 cicli, ognuno composto da denaturazione a 94°C per 30 s, annealing a 54°C per 45 s, estensione a 72°C per 45 s; fase di estensione finale a 72°C per 7 min.

### **2.2.3 PURIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLIFICATI**

Tutti gli amplificati di PCR sono stati purificati utilizzando le colonnine NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel®).

Per le reazioni di sequenziamento, effettuate in entrambe le direzioni, sono state utilizzate, per i relativi marcatori, le medesime coppie di primers precedentemente riportate per le reazioni di PCR di amplificazione. Le reazioni sono state eseguite utilizzando il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®). I parametri utilizzati nelle reazioni di sequenziamento sono stati i seguenti: 30 cicli, ognuno composto da 96°C per 10 sec, 50°C per 5 sec, 60°C per 4 min.

Il sequenziamento è stato realizzato utilizzando un sequenziatore automatico ABI 377 (Applied Biosystems®).

### **2.2.4 ANALISI FILOGENETICA**

I cromatogrammi sono stati editati a mano utilizzando Chromas Lite© ed allineati con BioEdit (versione 7.0.5.3; Hall, 1999). Le sequenze ottenute sono state lanciate in GenBank e paragonate con tratti omologhi disponibili in rete.

Le sequenze ottenute per il 16S sono state allineate con le sequenze disponibili in rete di un esemplare di *H. viridiflavus*, di *H. gemonensis* e con il tratto omologo di un esemplare di *Hierophis spinalis* (Peters, 1866) (Nagy et al., 2004; AY376774, AY376770, AY376773), usato come “outgroup” nell'analisi filogenetica.

L'allineamento del Cyt-b è stato effettuato includendo sequenze disponibili in rete di *H. viridiflavus* (Nagy et al., 2004; AY486925, AY376745), *H. gemonensis* (Kyriazi et al., 2013; JX315470, JX315473, JX315480, JX315482) e l'omologo tratto di una esemplare di *Coronella austriaca* Laurenti, 1768 (Nagy et al., 2004; AY486930), usato come outgroup nell'analisi filogenetica. Le sequenze di ND4 sono state allineate con sequenze disponibili in rete di *H. viridiflavus* (Rato et al., 2008; FJ430634, FJ430660) e *H. gemonensis* (Nagy et al., 2004; AY487044) e con l'omologo tratto di un esemplare di *Dolicophis jugularis* (Linnaeus, 1758) (Nagy et al., 2004; AY487046), utilizzato come outgroup nell'analisi filogenetica.

Un allineamento complessivo dei tratti relativi ai tre marcatori mitocondriali utilizzati è stato realizzato includendo gli omologhi tratti del genoma mitocondriale di un esemplare di *Oreocryptophis porphyraceus* (Cantor, 1839) (Lin et al., dati non pubblicati; GQ181130), usato come outgroup nella relativa analisi filogenetica.

La variabilità di una selezione aplotipi mitocondriali rinvenuti nell'analisi dei tre marcatori sopracitati è stata testata anche per il marcatore nucleare PRLR.

L'allineamento delle sequenze di PRLR è stato effettuato includendo il tratto omologo di un esemplare di *Lampropeltis pyromelana* (Cope, 1866) (Burbrink et al., 2011; AN: JN034329), utilizzato come outgroup.

Per ogni insieme di dati sono state condotte due analisi filogenetiche indipendenti, una con Maximum Likelihood (ML) ed una con statistica bayesiana.

Il calcolo delle distanze nucleotidiche (p-distance) e le analisi filogenetiche con ML sono state effettuate con MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Il migliori modelli di sostituzione per le analisi con ML sono stati calcolati in base ai relativi "Bayesian Information Criterion" (BIC), "Akaike Information Criterion, corrected" (AICc) e "Maximum Likelihood value" (lnL) utilizzando MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Le analisi filogenetiche con statistica bayesiana sono state effettuate utilizzando MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). In tali analisi sono state usate quattro catene di Markov di cui una fredda e tre calde per 2.000.000 di generazioni per le analisi effettuate con 16S, Cyt-b, ND4, PRLR e per 5.000.000 di generazioni con l'insieme congiunto dei tre marcatori mitocondriali (16S+Cyt-b+ND4). Il migliori modelli di sostituzione sono stati calcolati utilizzando JModeltest (Posada, 2008), valutando i relativi valori di AICc.

I modelli di sostituzione utilizzati nell'analisi filogenetica sono stati: HKY per il PRLR, HKY+I per il 16S (Hasegawa et al., 1985); GTR+I+G (Nei & Kumar, 2000) per il Cyt-b e per il set congiunto dei 3 marcatori mitocondriali.

Un'analisi di genealogia degli aplotipi mitocondriali è stata effettuata con il metodo statistico della parsimonia utilizzando il programma TCS v.1.21 (Clement et al., 2000), considerando un limite di parsimonia del 95%. Due diverse analisi sono state effettuate in questo modo, una per il Cyt-b (marcatore per il quale sono disponibili più sequenze) e una per l'insieme congiunto dei tre marcatori mitocondriali (16S+Cyt-b+ND4). L'indipendente risoluzione di diversi reticoli di aplotipi è stata considerata per valutare la presenza di distinte "Evolutionarily Significant Units" (ESUs) (Fraser & Bernatchez 2001).

### 2.3 ANALISI CITOGENETICA

L'analisi citogenetica è stata effettuata su diversi esemplari di *H. viridiflavus* provenienti da distinte zone geografiche dell'areale di distribuzione della specie (vedi Tab. 2).

Tab. 2. Campioni utilizzati nell'indagine citogenetica

<b>Specie</b>	<b>Toponimo</b>
<i>H. viridiflavus</i>	Pavia (PV)
<i>H. viridiflavus</i>	Mantova (MN)
<i>H. viridiflavus</i>	Sefro (AN)
<i>H. viridiflavus</i>	Ancona (AN)
<i>H. viridiflavus</i>	Asinara (SS)
<i>H. viridiflavus</i>	Avellino (AV)
<i>H. viridiflavus</i>	Cava dei Tirreni (SA)
<i>H. viridiflavus</i>	Cetraro (CO)
<i>H. viridiflavus</i>	Aosta (AO)
<i>H. viridiflavus</i>	Iria (ME)

#### 2.3.1 ALLESTIMENTO DEI CROMOSOMI

Quando possibile, i cromosomi sono stati allestiti da sospensioni cellulari disponibili in laboratorio mediante "air drying" su vetrini istologici precedentemente preparati.

In alternativa i cromosomi sono stati allestiti a mediante la realizzazione di colture di sangue in vitro. Tale metodica è stata eseguita a partire dal prelievo di un' aliquota di

sangue, di 200 - 500 µl, dalla doccia ematica delle vertebre caudali tramite l'ago di una siringa da insulina. L'aliquota è stata poi processata come riportato di seguito:

- Incubare a 30°C per 72 ore in 2 - 5 ml di terreno di coltura, contenente il 20% di Calf serum, 0.3% di un agente mitogeno linfocitario (Phytohaemagglutinin M) [alternativa alla PHA M, possono essere usati il pokeeweed (0.2%) e il forbolo allo 0.1%] antibiotici (100 U/ml e 100 µg, rispettivamente, di penicillina e streptomicina) e 50 U/ml di insulina.
- Aggiungere al terreno di coltura colchicina ad una concentrazione finale di 0.25 µg/ml e lasciare agire per circa due ore.
- Isolare le cellule tramite centrifugazione a 1000 rpm per 10 min.
- Lavare in liquido di Hank.
- Incubare le cellule per 30 minuti in soluzione ipotonica (sodio citrato allo 0.5% +cloruro di potassio allo 0.56%: volume- volume).
- Fissare le cellule per 20 min in Carnoy acetico (alcool metilico/acido acetico glaciale 3:1).
- Rinnovare più volte il fissativo dopo successive centrifugazioni per 10 min a 1000 rpm.
- Aggiungere al pellett una quantità finale di fissativo tale da ottenere una sospensione cellulare opalescente.
- Allestire i vetrini mediante "air drying".

### **2.3.2 COLORAZIONI CON GIEMSA, FLUOROCROMI, AG-NOR BANDING E C-BANDING**

Le piastre metafasiche ottenute da esemplari appartenenti a diverse popolazioni di *H. viridiflavus* sono state colorate con colorazioni convenzionali utilizzando soluzioni di colorante Giemsa al 5% a pH7.

Colorazioni cromosomiche con Cromomicina A<sub>3</sub>(CMA<sub>3</sub>)/Verde Metile sono state realizzate secondo il protocollo riportato da Sahar & Latt (1980).

Le colorazioni con Ag-Nor banding sono state effettuate secondo le metodiche descritte da Howell & Black (1980).

Le colorazioni di bandeggio-C con fluorocromi sono state effettuate modificando la metodica riportata da Sumner (1972). In particolare, i vetrini sono stati incubati in idrossido di bario (Ba(OH)<sub>2</sub>) per 5 min a 45°C e successivamente i cromosomi sono stati colorati sequenzialmente con CMA<sub>3</sub> e DAPI (Odierna et al., 2004).

### 2.3.3 NOR-FISH

Reazioni di NOR-FISH sono state condotte come descritto di seguito utilizzando come sonda sequenze biotinilate del 18S di *Adamussium colbecki* Smith, 1902.

I cromosomi, allestiti come precedentemente descritto, sono stati sottoposti a invecchiamento per 2 ore a 60°C e ad un trattamento preliminare con RNasi (100 µg/µl) in Tris-HCl 10 mM pH 7,5, per 15 min a 37°C. Dopo un lavaggio in 2x SSC sotto blanda agitazione, è stata eseguita una disidratazione dei vetrini in serie ascendente di etanolo (50%, 75%, 90% e 100%). I cromosomi sono stati denaturati e preriscaldati a 72°C e ad ogni vetrino è stata aggiunta una miscela di ibridazione contenente:

- 32 µl di formammide 70% in 2x SSC.
- 2 µl di DNA di *E. coli* frammentato e denaturato
- 30-50 ng di sonda biotinilata

L'ibridazione è stata condotta "overnight" in camera umida a 37°C.

La rilevazione del segnale di ibridazione è stata eseguita in accordo al seguente protocollo:

- Effettuare lavaggio di stringenza in 1x SSC a 72°C per 5 min
- Lavare con 1x SSC per 2 min a temperatura ambiente.
- Aggiungere rabbit serum 1:20 in PTB (per 10 ml di PTB: 50 µl Tween 20% + 0,1 g di dry milk + 2 ml di PBS 10%) e incubare in camera umida a temperatura ambiente per 20 min.
- Allontanare il surnatante.
- Incubare in camera umida a 37°C per 1 ora con anticorpo primario anti-biotina diluito 1:500 in PTB.
- Lavare in 1x PBS per 5 min.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30 min con anticorpo secondario anti-anticorpo primario marcato con fluoresceina e diluito 1:50 in PTB.
- Lavare in 1x PBS per 5 min.
- Colorare con ioduro di propidio 5 µg/ml in 1x PBS per 15 min.
- Lavare in 1x PBS per 5 min.
- Montare il vetrino in glicerolo + anti-fade.

## 2.4 MORFOMETRIA GEOMETRICA

Una misura del grado di variabilità morfologica delle specie oggetto di studio è stata analizzata mediante un'analisi di morfometria geometrica applicata su esemplari di *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* provenienti da diverse aree geografiche dei loro rispettivi areali di distribuzione.

Tale metodica è stata basata su di uno studio di "landmarks" della lepidosi cefalica, composto da un'analisi di variabilità della forma e da un'analisi dimensionale. Di tutti gli esemplari presi in considerazione per tale analisi sono state realizzate delle fotografie planari della superficie della testa, archiviate in un banca dati informatizzata.

Tutti gli esemplari fotografati sono stati marcati con 21 landmarks (di cui 5 mediani e 16 bilaterali), posizionati lungo punti di giuntura o al margine di squame cefaliche (Fig. 5), simili a quelli utilizzati per altre specie di serpenti (Llorente et al., 2012). Il posizionamento dei landmarks è stato effettuato utilizzando il programma tpsDig2 (Rohlf, 2006). Eventuali errori di misurazione sono stati testati ripetendo la digitalizzazione dei landmarks su dieci esemplari per tre volte e, successivamente, è stata effettuata un'analisi della varianza (ANOVA) con 100 ricampionamenti.

La configurazione dei landmarks è stata ruotata, traslata e scalata a dimensioni unitarie mediante una "Generalized Procrustes Analysis" (GPA) (Rohlf & Slice, 1990) utilizzando tpsRelw e MorphoJ (Klingenberg, 2011) e successivamente le relative analisi dei componenti principali (PCA) sono state effettuate con i medesimi programmi.

Le variazioni di taglia sono state valutate mediante analisi del "Centroid Size" (CS) utilizzando il software PAST (2002).



Fig.5. Esempio del posizionamento dei 21 landmarks utilizzati nell'analisi di morfometria geometrica.

Tab.3. Campioni utilizzati nell'analisi di morfometria geometrica

<b>SPECIE</b>	<b>TOPONIMO</b>	<b>SESSO</b>	<b>CODICE</b>
<i>H. viridiflavus</i>	Soccavo (NA)	M	ID0
<i>H. viridiflavus</i>	Baragge novaresi (NO)	M	ID1
<i>H. viridiflavus</i>	Isola d'Elba (LI)	M	ID2
<i>H. viridiflavus</i>	Firenze	M	ID3
<i>H. viridiflavus</i>	Baratz (SS)	M	ID4
<i>H. viridiflavus</i>	Doberdò del Lago (GO)	M	ID5
<i>H. viridiflavus</i>	Krk (Croazia)	M	ID6
<i>H. viridiflavus</i>	Blegiers (Francia)	M	ID7
<i>H. viridiflavus</i>	Castellane (Francia)	M	ID8
<i>H. viridiflavus</i>	Orlu (Francia)	M	ID9
<i>H. viridiflavus</i>	Pirio, Corsica (Francia)	M	ID10
<i>H. viridiflavus</i>	Le Caylar (Francia)	M	ID11
<i>H. viridiflavus</i>	Ripoli (Spagna)	M	ID12
<i>H. viridiflavus</i>	Larzac (Francia)	M	ID13
<i>H. viridiflavus</i>	Aurières (Francia)	M	ID14
<i>H. viridiflavus</i>	Tuarelli, Corsica (Francia)	M	ID15
<i>H. viridiflavus</i>	Cazenave (Francia)	M	ID16
<i>H. viridiflavus</i>	Camaldoli (NA)	M	ID17
<i>H. viridiflavus</i>	Mallemoisson (Francia)	M	ID18
<i>H. viridiflavus</i>	Brusques (Francia)	M	ID19
<i>H. viridiflavus</i>	Sagone (Francia)	M	ID20
<i>H. viridiflavus</i>	Asinara (SS)	F	ID21
<i>H. viridiflavus</i>	Lentiai (BL)	F	ID22
<i>H. viridiflavus</i>	Isola di Montecristo (LI)	F	ID23

<i>H. viridiflavus</i>	Cepic (Opertalj, Croazia)	F	ID24
<i>H. viridiflavus</i>	Villeneuve-d'Entraunes (Francia)	F	ID25
<i>H. viridiflavus</i>	Larzac (Francia)	F	ID26
<i>H. viridiflavus</i>	(Francia)	F	ID27
<i>H. viridiflavus</i>	Puget Théniers (Francia)	F	ID28
<i>H. viridiflavus</i>	Région de Patrimonio, Corsica (Francia)	F	ID29
<i>H. viridiflavus</i>	Galeria, Corsica (Francia)	F	ID30
<i>H. viridiflavus</i>	Galeria, Corsica (Francia)	F	ID31
<i>H. viridiflavus</i>	Santa Giulia, Corsica (Francia)	F	ID32
<i>H. viridiflavus</i>	Causse du Larzac (Francia)	F	ID33
<i>H. viridiflavus</i>	Castel S. Vincenzo (IS)	F	ID34
<i>H. viridiflavus</i>	Nonatola (MO)	F	ID35
<i>H. viridiflavus</i>	Loiano (BO)	F	ID36
<i>H. viridiflavus</i>	Pietraraja (BN)	F	ID37
<i>H. viridiflavus</i>	Martano (LE)	Nd	ID38
<i>H. viridiflavus</i>	Cortenova (CO)	Nd	ID39
<i>H. viridiflavus</i>	Prada, Faenza (RA)	Nd	ID40
<i>H. viridiflavus</i>	Lipari (ME)	Nd	ID41
<i>H. viridiflavus</i>	Sestola (MO)	Nd	ID42
<i>H. viridiflavus</i>	Montiano (FC)	Nd	ID43
<i>H. viridiflavus</i>	Cà Verde (FE)	Nd	ID44
<i>H. viridiflavus</i>	Denore (FE)	Nd	ID45
<i>H. viridiflavus</i>	Premilcuore (FC)	Nd	ID46
<i>H. viridiflavus</i>	Spirito Santo (NU)	Nd	ID47
<i>H. viridiflavus</i>	Sant'Agata sul Salerno (RA)	Nd	ID48
<i>H. viridiflavus</i>	Krk (Croazia)	F	ID49
<i>H. viridiflavus</i>	Vercelli	F	ID50
<i>H. viridiflavus</i>	S. Cataldo (LE)	F	ID51
<i>H. viridiflavus</i>	Calanca, Corsica (Francia)	M	ID52
<i>H. viridiflavus</i>	Biguglia, Corsica (Francia)	F	ID53
<i>H. viridiflavus</i>	Lago Spartà (ME)	M	ID54
<i>H. viridiflavus</i>	Asinara (SS)	M	ID55
<i>H. gemonensis</i>	Rab (Croazia)	M	ID56
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	M	ID57
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	M	ID58
<i>H. gemonensis</i>	Cres (Croazia)	M	ID59
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	M	ID60
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	M	ID61
<i>H. gemonensis</i>	Lussino (Croazia)	M	ID62
<i>H. gemonensis</i>	Creta (Grecia)	M	ID63
<i>H. gemonensis</i>	Michoi (Grecia)	M	ID64
<i>H. gemonensis</i>	Creta (Grecia)	M	ID65
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	M	ID66
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	F	ID67
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	F	ID68
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	F	ID69
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	F	ID70
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	F	ID71

<i>H. gemonensis</i>	Creta (Grecia)	F	ID72
<i>H. gemonensis</i>	Creta (Grecia)	F	ID73
<i>H. gemonensis</i>	Chani Panopoulou (Grecia)	F	ID74
<i>H. gemonensis</i>	Lampania (Grecia)	F	ID75
<i>H. gemonensis</i>	Voulkanou monastery (Grecia)	F	ID76
<i>H. gemonensis</i>	Peloponneso (Croazia)	F	ID77
<i>H. gemonensis</i>	Iperios (Grecia)	F	ID78
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	F	ID79
<i>H. gemonensis</i>	Creta (Grecia)	F	ID80
<i>H. gemonensis</i>	Kithira (Grecia)	F	ID81
<i>H. gemonensis</i>	Kithira (Grecia)	F	ID82
<i>H. gemonensis</i>	Istiaia (Grecia)	F	ID83
<i>H. gemonensis</i>	Argo (Grecia)	F	ID84
<i>H. gemonensis</i>	Iperios (Grecia)	F	ID85
<i>H. gemonensis</i>	Creta (Grecia)	F	ID86
<i>H. gemonensis</i>	Parnasos (Grecia)	F	ID87
<i>H. gemonensis</i>	Atene (Grecia)	F	ID88
<i>H. gemonensis</i>	Atene (Grecia)	F	ID89
<i>H. gemonensis</i>	Corfù (Grecia)	F	ID90
<i>H. gemonensis</i>	Megalo Kouneli (Grecia)	Nd	ID91
<i>H. gemonensis</i>	Creta (Grecia)	Nd	ID92
<i>H. gemonensis</i>	Iperios (Grecia)	Nd	ID93
<i>H. gemonensis</i>	Verin (Croazia)	Nd	ID94
<i>H. gemonensis</i>	Zante (Grecia)	Nd	ID95
<i>H. gemonensis</i>	Krk (Croazia)	Nd	ID96

## 2.5 SEQUENZE RIPETUTE

Per questo tipo di analisi è stata considerata, oltre alle specie oggetto di studio, una selezione di specie riportata in Tab.4 a fini comparativi.

Tab. 4. Specie utilizzate nell'analisi delle sequenze ripetute

<b>Specie</b>	<b>Famiglia</b>
<i>Hierophis viridiflavus</i>	Colubridae
<i>H. gemonensis</i>	Colubridae
<i>Elaphe quatuorlineata</i>	Colubridae
<i>Coronella austriaca</i>	Colubridae
<i>Malpolon monspessulanus</i>	Lamprophidae
<i>Phisalixella variabilis</i>	Lamprophidae
<i>Vipera aspis</i>	Viperidae
<i>Thyphlops vermicularis</i>	Thyphlopidae

### 2.5.1 AMPLIFICAZIONE PER PCR

L'amplificazione mediante PCR utilizzando una coppia di primers aspecifici, inizialmente disegnati per lo studio di marcatori mitocondriali ha dato origine ad un prodotto a multibande con un pattern simile a quello di un "RAPD marker" (Fig. 6). Il "pattern" di bande derivante da tale amplificazione, nonostante mostrasse alcune differenze in differenti individui, presentava bande comuni a molti di essi. L'amplificazione mediante PCR che ha dato inizialmente origine a tale prodotto a multibande è stata effettuata utilizzando la seguente coppia di primers:

RL1L-240F 5'-CACCAAAACACAACCAAAAAA-3'

RL1L240R 5'-GTGATAAGCTACTAGGGCA-3'.

Come parametri della reazione di amplificazione sono stati utilizzati i seguenti: denaturazione iniziale a 94°C per 4 min seguita da 36 cicli a 94°C per 30 s, 48°C per 30 s, 72°C per 30 s, seguiti da un allungamento finale a 72°C per 5 min.



Fig. 6. Elettroforesi sul gel di agarosio all'1,5%. A) e B) = DNA ladder 1000 cb. Hv10- 9= codici di esemplari di *H. viridiflavus* usati nell'indagine molecolare (vedi Tab. 1). Hei= *Hemorrhhois hippocrepis*. Il rettangolo rosso evidenzia le bande selezionate per la ri-estrazione.

### 2.5.2 RI-ESTRAZIONE E RI-AMPLIFICAZIONE

La ri-estrazione delle sequenze amplificate è stata eseguita mediante escissione da gel di agarosio di bande selezionate di circa 300 cb (vedi Fig. 6) e loro successivo "freeze

n' squeeze" secondo il protocollo riportato da Tautz & Renz (1983) leggermente modificato.

La ri-amplificazione mediante PCR è stata realizzata usando la stessa coppia di primers (RL1L-240F e RL1L-240R) e le stesse condizioni di reazione utilizzate nell'amplificazione originale.

I prodotti di PCR sono stati purificati e sequenziati ottenendo una sequenza di circa 240 cb (denominata RL1L-240), dalla quale sono stati disegnati nuovi primers interni (RL1L-360F e RL1L-360R) allo scopo di estenderne la lunghezza e per ottenere informazioni sulla sua organizzazione genomica (Fig. 7). Ulteriori amplificazioni mediante PCR sono state effettuate utilizzando le seguenti combinazioni di primers:

RL1L-240F 5'-CACCAAAACACAACCAAAAAA-3'

e

RL1L-360R 5'-AAAACCAGTTTGATCGTTATGAA-3';

RL1L-360F 5'- CTGGTTTTATAAATGGAAGACAA - 3'

e

RL1L-360R 5'-AAAACCAGTTTGATCGTTATGAA-3';

RL1L-360 F 5'-CTGGTTTTATAAATGGAAGACAA -3'

e

RL1L-240R 5'-GTGATAAGCTACTAGGGCA-3'.

Le nuove coppie di primers sono state utilizzate per nuove amplificazioni di PCR a partire da DNA genomico di *H. viridiflavus* e di una selezione di specie appartenenti a diversi raggruppamenti tassonomici della vasta superfamiglia Colubroidea per scopi comparativi. I parametri delle amplificazioni con RL1L-360 F e RL1L-360 R sono stati impostati come di seguito: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min seguita da 10 cicli a 94°C per 30 s; 55°C per 45 s e 72°C per 45 s e da 15 cicli a 94°C per 30 s; 50°C per 45 s e 72°C per 45 s.

I parametri utilizzati per le reazioni di amplificazione con i primers RL1L-240F e RL1L-360R e con RL1L-360F e RL1L240R e sono stati i seguenti: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min seguita da 36 cicli a 94°C per 30 s, 50°C per 30 s e 72°C per 45 s. I prodotti di PCR ottenuti mediante tali amplificazioni sono stati purificati e sequenziati. Le amplificazioni con i primers RL1L-360F e RL1L-360R e con RL1L-360F RL1L-240F e RL1L-240R hanno permesso l'isolamento di due sequenze di circa

360 cb e 240 cb, chiamate rispettivamente RL1L-Like 360 e RepHv (vedi Risultati). I primers RL1L-240F e RL1L-360R sono stati utilizzati per l'amplificazione di un tratto 5' comune alle sequenze RL1L-240 e RL1L-360, chiamato CTL1L (vedi Risultati). Le sequenze RL1L-240, RL1L-360 e RepHv sono state utilizzate nelle reazioni di biotinilazione, Southern blot, Dot blot e FISH riportate di seguito.

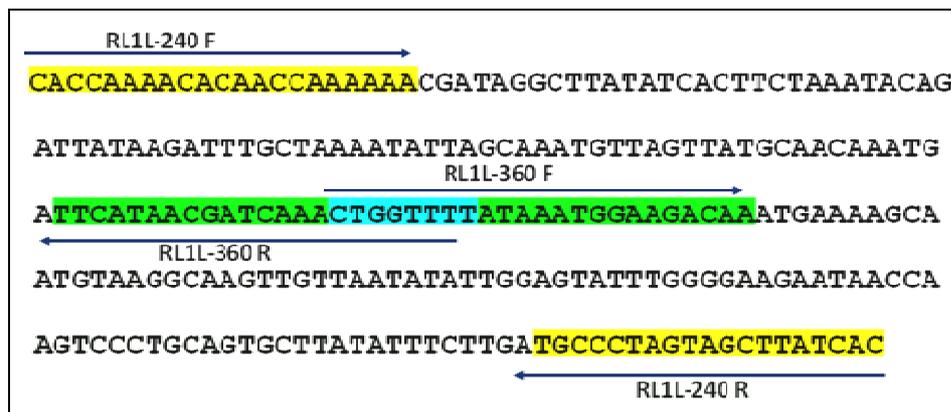


Fig.7. Sequenza RL1L-240 e primers utilizzati (evidenziati) nelle amplificazioni con PCR delle sequenze ripetute..

### 2.5.3 BIOTINILAZIONE DI SONDE A DNA

Le PCR di biotinilazione sono state condotte in una mix con volume totale di 50 µl, contenente:

- 1 µl di amplificato diluito
- 5 µl di buffer 10x
- 1 µl di primers (mix di forward e reverse)
- 1 µl di MgCl<sub>2</sub>.
- 1 µl di Taq DNA polimerasi
- 5 µl di dACG+T nelle con concentrazione rispettivamente di 2 mM e di 0,2 mM
- 1 µl di dUTP marcati con biotina
- H<sub>2</sub>O sterile a volume

Parallelamente ad ogni reazione di bionitilazione sono state realizzate delle normali reazioni di PCR di controllo. La riuscita biotinilazione delle sonde a DNA è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%.

#### 2.5.4 SOUTHERN BLOT

Le reazioni di Southern blot (Southern, 1975) sono state realizzate utilizzando 5 µg di DNA genomico digerito per 16 ore con: *MboI* per RL1L-240; *HaeIII* per RL1L-Like 360; *AluI*, *MboI*, e *PstI* per CTL1L; *MboI* per RepHv. Il DNA così digerito è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% e successivamente è stato effettuato il trasferimento su membrana di nylon (BioBond Sigma). Il "cross linking" è stato effettuato mediante esposizione a raggi UV per 30 min. Il filtro di nylon è stato esposto a 65°C per circa un'ora ad una mix di pre-ibridazione composta da:

- Dry milk 2%.
- N-lauroilsarcosina 0,1%.
- SDS 0,02%.
- 20 µg/ml di DNA di *E. coli* denaturato e frammentato.
- Sonda biotinilata denaturata (10 ng per ml di miscela di ibridazione).
- 6x SSC (fino ad un volume totale di 5-10 ml).

L'ibridazione è stata condotta "overnight" a 65°C esponendo il filtro di nylon ad una miscela di ibridazione, realizzata con gli stessi componenti della mix di pre-ibridazione con l'aggiunta di 10 ng di sonda biotinilata denaturata per ml di miscela di ibridazione.

Un lavaggio di stringenza è stato effettuato in 0,2x SSC + SDS 0,5% per 15 min a 55°C.

La rilevazione del segnale di ibridazione è stata realizzata mediante NBT-BCIP secondo i seguenti passaggi:

- Lavare il filtro in buffer 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 + NaCl 0,15 M) per 1 min sotto blanda agitazione.
- Lavare in buffer 2 (buffer 1 + 2% dry milk) per 30 min con blanda agitazione.
- Aggiungere una soluzione composta da streptavidina-fosfatasi alcalina (1 µg/ml in buffer 1) in busta sigillata, lasciata agire al buio per 15 min.
- Lavare in buffer 2 per 15 min con blanda agitazione.
- Lavare in buffer 1 per 15 min con blanda agitazione per 3 volte.
- Lavare in buffer 3 (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5 + NaCl 0,1 M + MgCl<sub>2</sub> 0,05 M) per 5 min con blanda agitazione.
- Aggiungere una soluzione contenente NBT-BCIP (0,33 mg/ml in buffer 3) in busta sigillata e conservare fino a sviluppo ottenuto.

### **2.5.5 DOT BLOT**

Analisi di quantizzazione genomica delle sequenze RL1L-Like 360 e RepHv sono state effettuate mediante Dot blot quantitativo.

Ciascuna reazione è stata condotta utilizzando 100 ng/ml di DNA genomico di *H. viridiflavus* (e di specie di confronto nel caso di RepHv) + 100/ml di DNA di *E. coli* in diluizioni progressive in soluzione tampone denaturante (0.4 M NaOH, 1 M NaCl).

Dal purificato di ciascuna sequenza sono state preparate soluzioni a 10 ng/ml + 1 µg/ml di DNA di *E. coli* in soluzione tampone denaturante. Da ciascuna di queste soluzioni sono state operate delle diluizioni progressive. Un'aliquota di 100 µl di ogni diluizione è stata inserita in un pozzetto di un apparato per Dot blot (Bio-Rad) e filtrata su membrana di nylon (BioBond Sigma). Ibridazione e colorazione sono state effettuate come precedentemente descritto per le reazioni di Southern blot.

### **2.5.6 FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)**

Le reazioni di ibridazione in situ sono state realizzate secondo il protocollo descritto in precedenza per le NOR-FISH (vedi paragrafo 2.3.3), ma utilizzando le sonde biotinilate delle sequenze RL1L-240 e RL1L-360.

## 3 RISULTATI

### 3.1 ANALISI MOLECOLARE

#### 3.1.1 16S

L'analisi del 16S ha riguardato un totale di 81 sequenze, producendo un allineamento finale di 511 posizioni nucleotidiche. All'interno dell'allineamento sono state riscontrate 27 posizioni variabili, delle quali 15 informative per la parsimonia. Il rapporto transizioni/transversioni è risultato 2,36. All'interno del frammento di 16S esaminato è stata riscontrata la presenza di 4 inserzioni/delezioni, di cui una ha riguardato esclusivamente l'outgroup (*H. spinalis*).

L'analisi filogenetica eseguita con il tratto considerato del 16S ha identificato le due specie come due raggruppamenti monofiletici, evidenziando all'interno di esse l'esistenza di una diversa variabilità intraspecifica.

Più in particolare, questa analisi ha evidenziato, all'interno delle due specie oggetto di studio, l'esistenza di 3 distinti cladi, statisticamente ben supportati sia dall'analisi con ML (Fig. 8) sia da quella effettuata con statistica bayesiana (Fig. 9). Due di questi cladi rappresentano due diversi aplotipi, uno orientale e l'altro occidentale (E e W), di *H. viridiflavus*, mentre il rimanente si riferisce ad un unico aplotipo riscontrato in esemplari di *H. gemonensis* provenienti da tutto l'areale di distribuzione della specie, dalla Croazia settentrionale all'isola di Creta (Fig. 10).

La distanza genetica (p-distance) interspecifica tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* è di circa 2,8% mentre la distanza genetica intraspecifica riscontrata tra i cladi E e W di *H. viridiflavus* è di circa 1,6%.

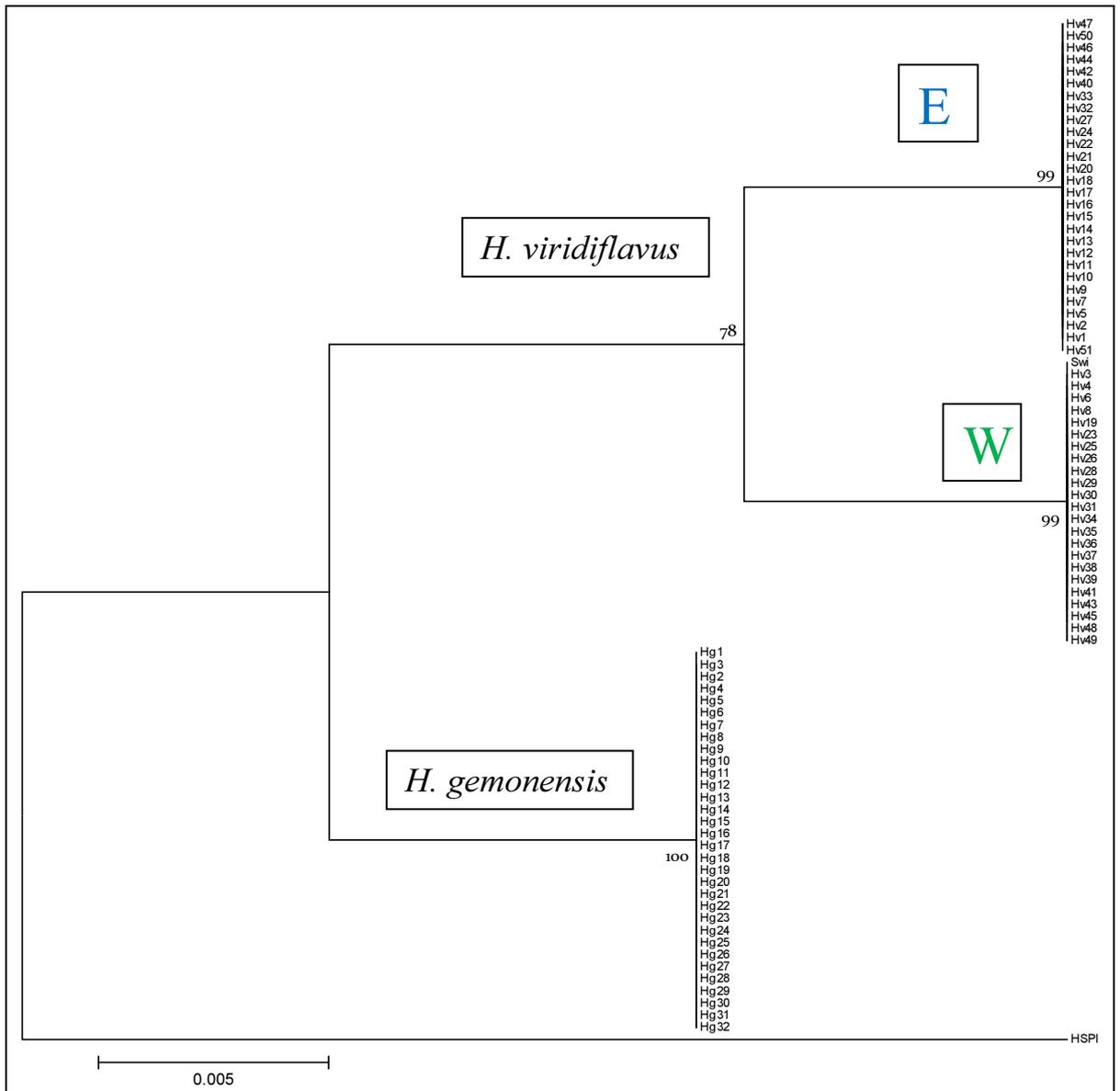


Fig. 8. Albero filogenetico con Maximum Likelihood (ML) per il frammento di 16S. I valori ai nodi rappresentano le percentuali di supporto statistico riferite a 1000 ricampionamenti di bootstrap. L'outgroup è rappresentato da un esemplare di *H. spialis* (AN: AY376773).

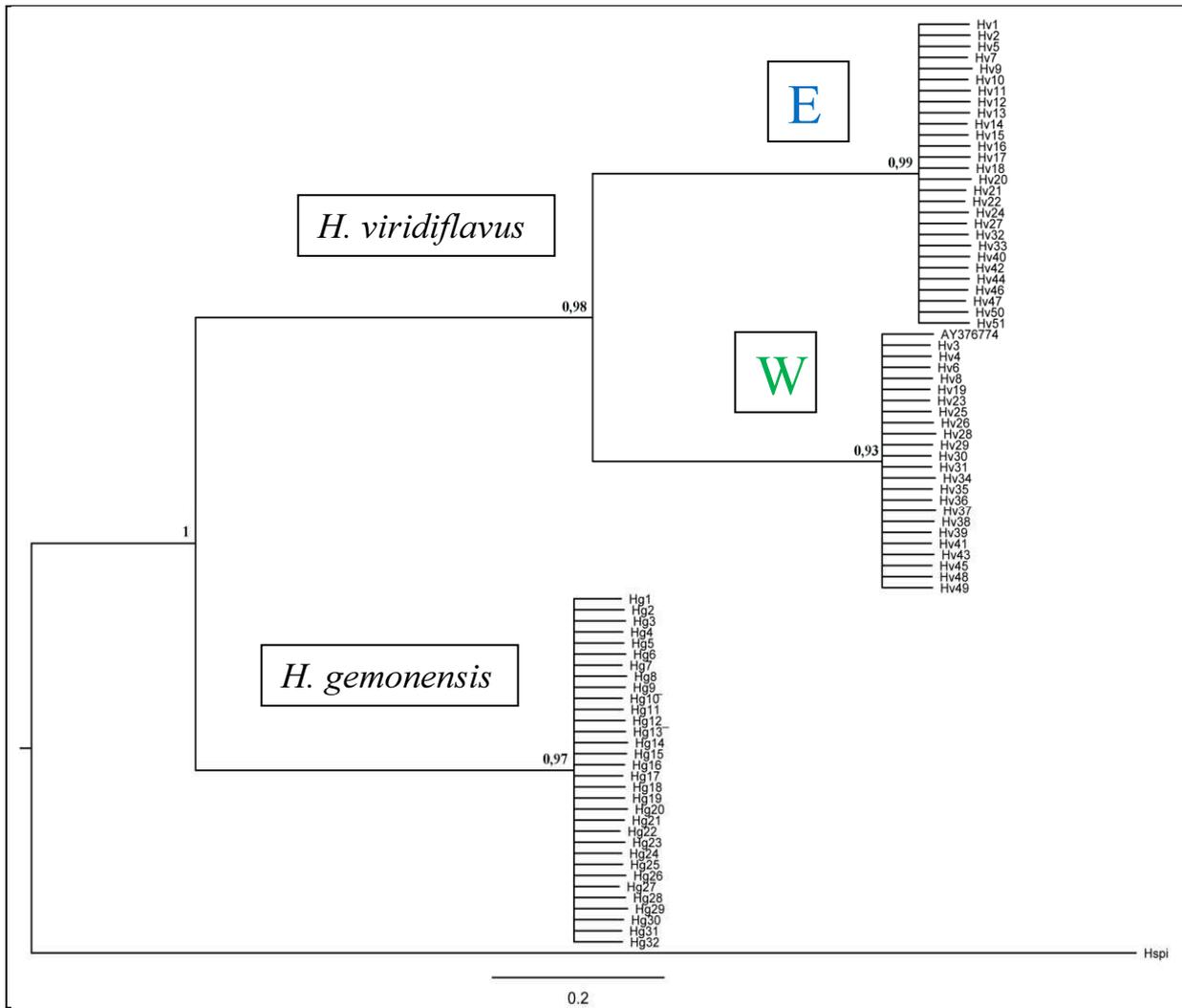


Fig. 9. Albero filogenetico per il frammento di 16S con statistica bayesiana e 2.000.000 di generazioni. I numeri ai nodi rappresentano i valori di supporto statistico. L'outgroup è rappresentato da un esemplare di *H. spinalis* (AN: AY376773).



Fig. 10. Georeferenziazione degli aplotipi del 16S. In arancione *H. gemonensis*, in azzurro il clade E di *H. viridiflavus* e in verde il clade W.

### 3.1.2 CYT-B

Le 89 sequenze considerate per il frammento di Cyt-b utilizzato in questo studio hanno prodotto un allineamento di 520 posizioni nucleotidiche. Tra queste sono stati individuati 112 siti variabili di cui 67 informativi per la parsimonia. Non sono state individuate delezioni/inserzioni o interruzioni nella cornice di lettura in nessuna delle sequenze considerate. Il rapporto transizioni/transversioni è risultato di 2,41.

Nel biacco l'analisi filogenetica con il Cyt-b ha confermato l'esistenza dei due cladi principali (E e W) già individuati con il 16S, che vengono però suddivisi in una serie di sub-aplotipi tra loro diversamente imparentati (Fig. 11, 12, 13).

In particolare, il clade E di *H. viridiflavus* risulta essere composto da 7 differenti aplotipi, maggiormente differenziati nell'Italia meridionale. Tra questi è possibile riconoscere un aplotipo numericamente e geograficamente molto rappresentato (CE1),

che risulta presente in Italia lungo tutta la costa adriatica, in Campania ed, al settentrione, in buona parte della pianura padana.

Altri aplotipi isolati sono ristretti all'Italia nord-orientale (CE3, CE4), ma la maggior parte di essi si concentra in Italia meridionale, lungo i rilievi appenninici (CE2, CE6, CE7) ed un aplotipo insulare è presente in Sicilia (CE5).

Il clade W risulta essere meno diversificato di quello orientale e composto da un totale di quattro aplotipi. Tra questi uno risulta essere geograficamente molto esteso (CW1) (presente in Italia centrale, nel blocco sardo-corso, Francia e Spagna settentrionale) mentre gli altri tre (CW2, CW3, CW4), ciascuno rappresentato da un unico esemplare sono presenti in Toscana, Svizzera e Francia orientale.

L'analisi del Cyt-b ha rivelato l'esistenza di diversi aplotipi anche in *H. gemonensis*. In totale sono stati individuati in questa specie un totale di 10 diversi aplotipi (Fig. 11, 12 e 14). Quello maggiormente rappresentato numericamente e geograficamente (CG1) comprende esemplari dalla Croazia settentrionale fino alla Grecia continentale. Tra gli altri risultano essere identificabili diversi aplotipi cretesi (CG9, CG10), uno dei quali comprendente anche un'esemplare dell'Eubea. Gli altri aplotipi sono localizzati in Croazia (CG3) nell'Argolide (CG7), nel Peloponneso (CG4, CG5, CG6, CG8), ed un altro è un aplotipo insulare di Krk (CG2).

La distanza genetica riscontrata per il tratto considerato di Cyt-b è di circa 10% tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis*, e di circa 4% tra i cladi E e W del biacco.

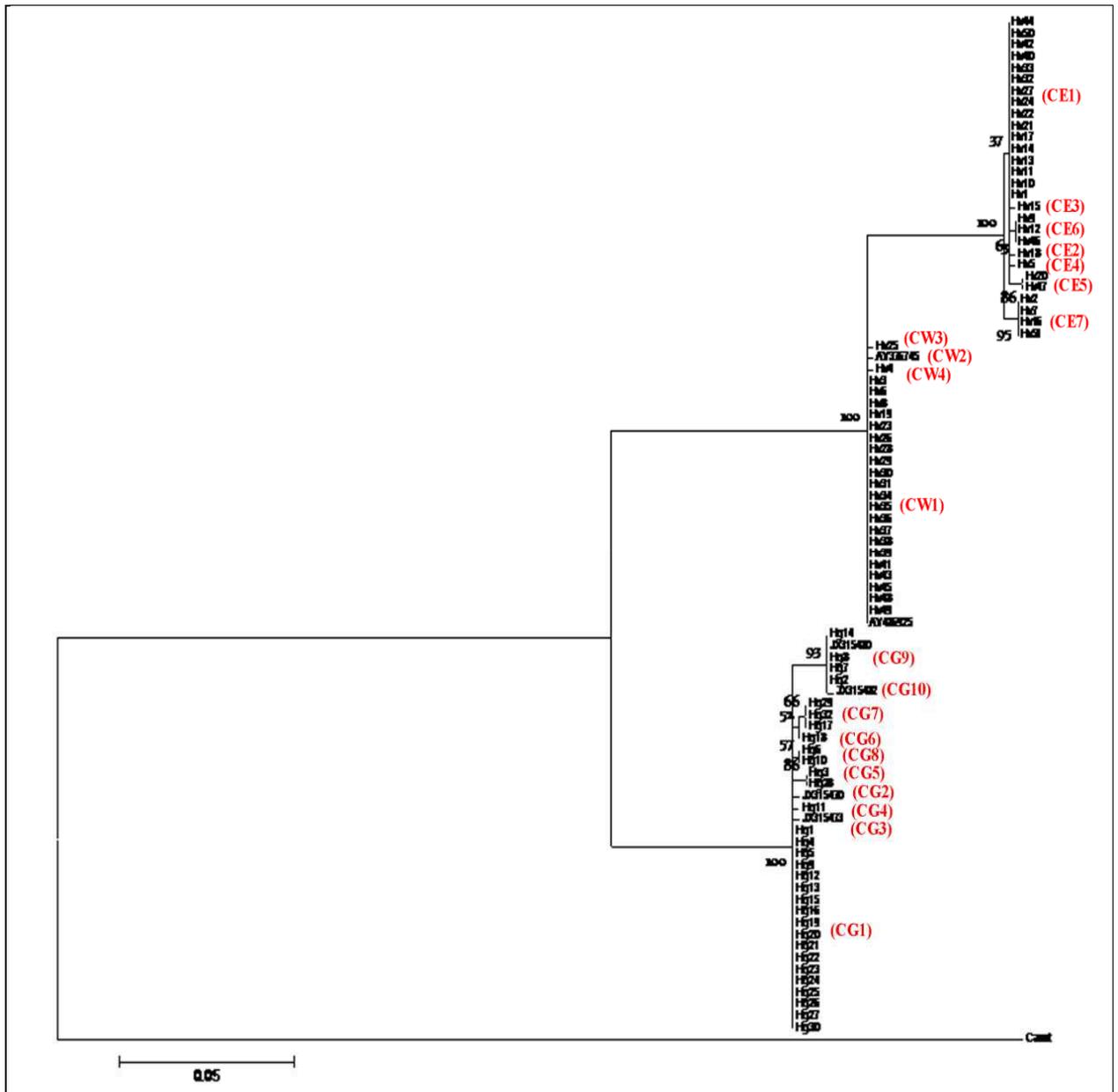


Fig. 11. Albero filogenetico con Maximum Likelihood (ML) per il frammento di Cyt-b. I valori ai nodi rappresentano le percentuali di supporto statistico considerando 1000 ricampionamenti di bootstrap. Tra parentesi sono indicati i diversi aplotipi individuati. Come outgroup è stato utilizzato un esemplare di *C. austriaca* (AN: AY486930).

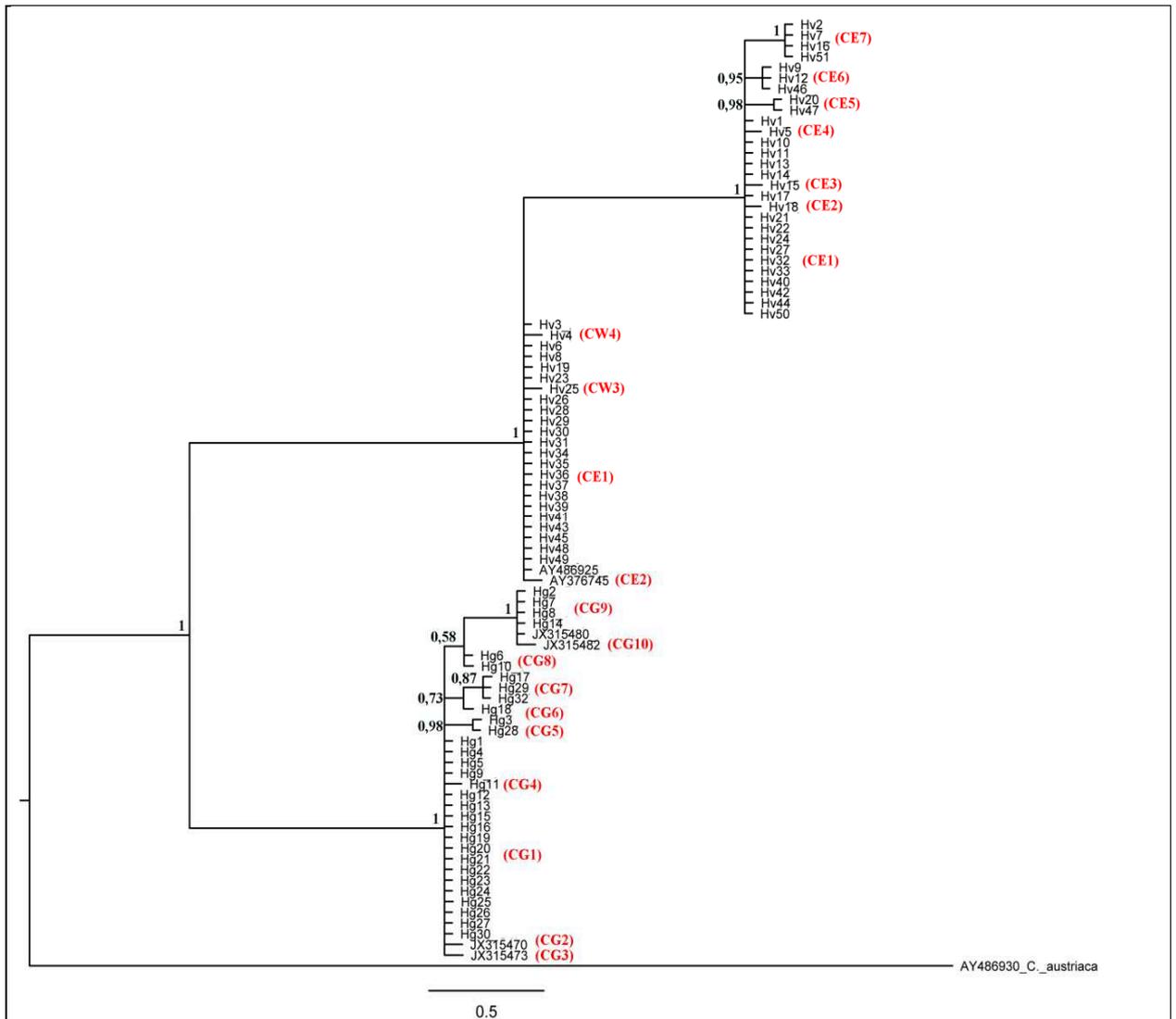


Fig. 12. Albero filogenetico per il frammento di Cyt-b con statistica bayesiana e 2.000.000 di generazioni. I numeri ai nodi rappresentano i valori di supporto statistico. Tra parentesi sono indicati i diversi aplotipi individuati. L'outgroup è rappresentato da un esemplare di *C. austriaca* (AN: AY486930).

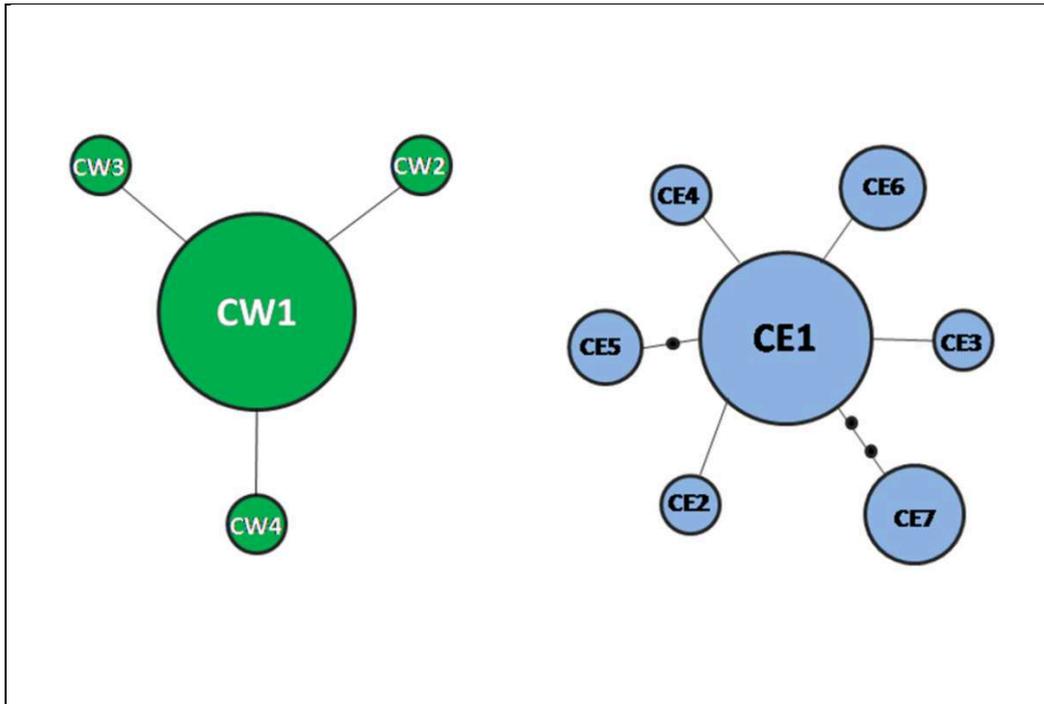


Fig. 13. Reticolo di derivazione di aplotipi di Cyt-b di *H. viridiflavus* con limite statistico del 95% della parsimonia. I cerchi colorati rappresentano i diversi aplotipi. Le dimensioni dei cerchi sono in relazione al numero di individui per aplotipo. In verde il clade W e in azzurro il clade E. I punti neri rappresentano aplotipi mancanti.

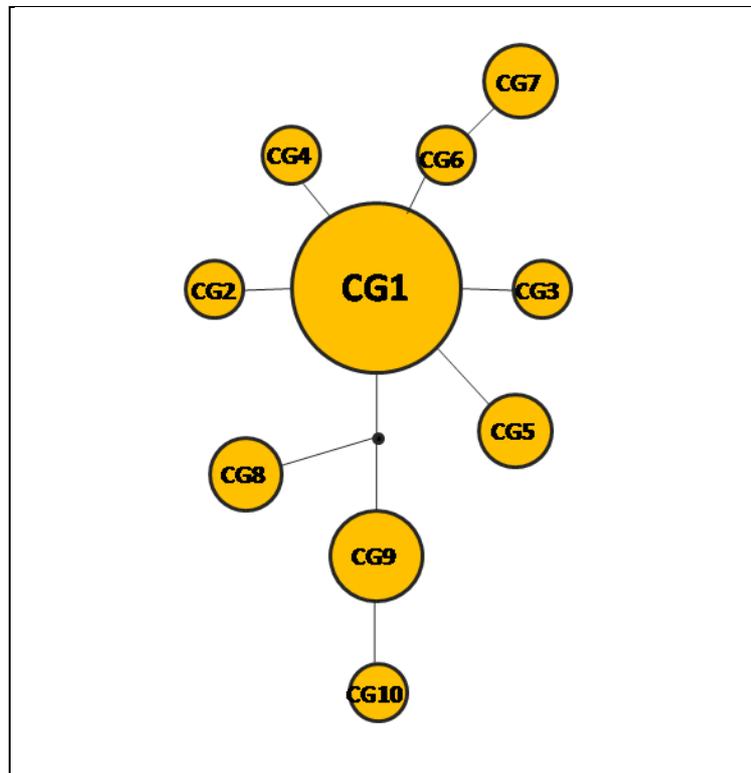


Fig. 14. Reticolo di derivazione di aplotipi di Cyt-b di *H. gemonensis* con limite statistico del 95% della parsimonia. I cerchi colorati rappresentano i diversi aplotipi. Le dimensioni dei cerchi sono in relazione al numero di individui per aplotipo. I punti neri rappresentano aplotipi mancanti.

### 3.1.3 ND4

Per analisi dell'ND4 sono state considerate un totale di 81 sequenze allineate per un totale di 584 posizioni nucleotidiche. Tra queste sono stati individuati un totale di 122 siti variabili di cui 72 sono risultati essere informativi per la parsimonia. Non sono state individuate delezioni/inserzioni o interruzioni nella cornice di lettura in nessuna delle sequenze considerate. Il rapporto transizioni/transversioni è risultato di 2,77.

L'analisi filogenetica con l'ND4 ha prodotto risultati simili a quanto precedentemente descritto per il Cyt-b (Fig. 15 e 16). In particolare l'ND4 ha confermato l'esistenza in *H. viridiflavus* dei cladi principali (E e W) già individuati con il 16S, all'interno dei quali sono stati identificati una serie di sub-aplotipi. In particolare per quanto riguarda il clade E di *H. viridiflavus* sono stati individuati 7 diversi aplotipi. Tra questi, la maggior parte è presente in Italia meridionale e quello maggiormente rappresentato è presente in un'estesa porzione della costa adriatica, dalla Puglia alla pianura padana. Nel clade W sono stati individuati 2 diversi aplotipi di cui uno rappresentato da un unico esemplare piemontese.

In *H. gemonensis* sono stati riscontrati 9 distinti aplotipi (Fig. 15 e 16), simili per distribuzione sul territorio a quelli precedentemente descritti per il Cyt-b.

Inoltre, similmente a quanto riportato per il Cyt-b la distanza genetica osservata per l'ND4 è di circa il 10% tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* e di circa 4% tra i principali cladi, E e W, di *H. viridiflavus*.

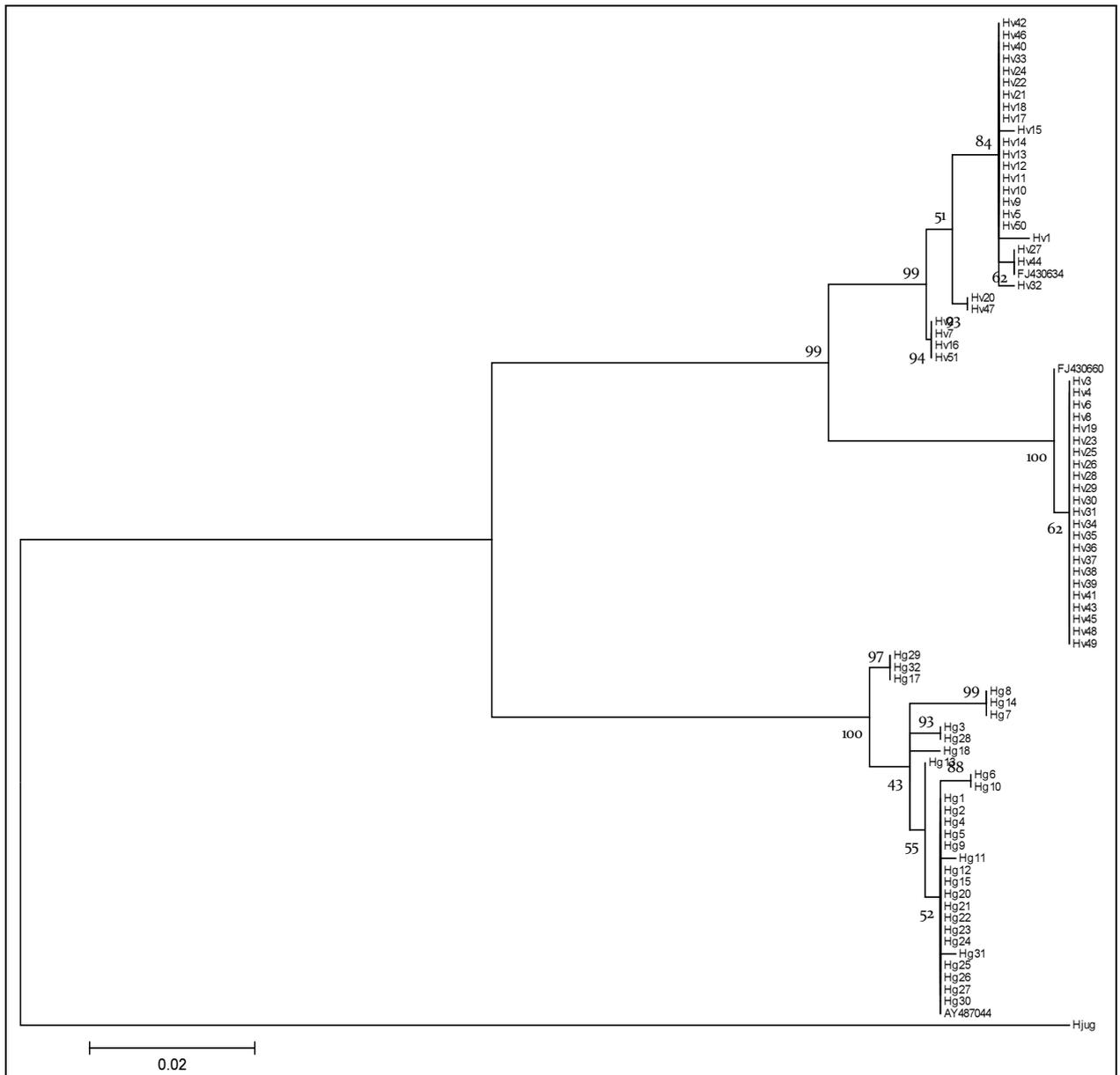


Fig. 15. Albero filogenetico con Maximum Likelihood (ML) per il frammento di ND4. I valori ai nodi rappresentano le percentuali di supporto statistico considerando 1000 ricampionamenti di bootstrap. Come outgroup è stato utilizzato un esemplare di *D. jugularis* (AN: AY487046).

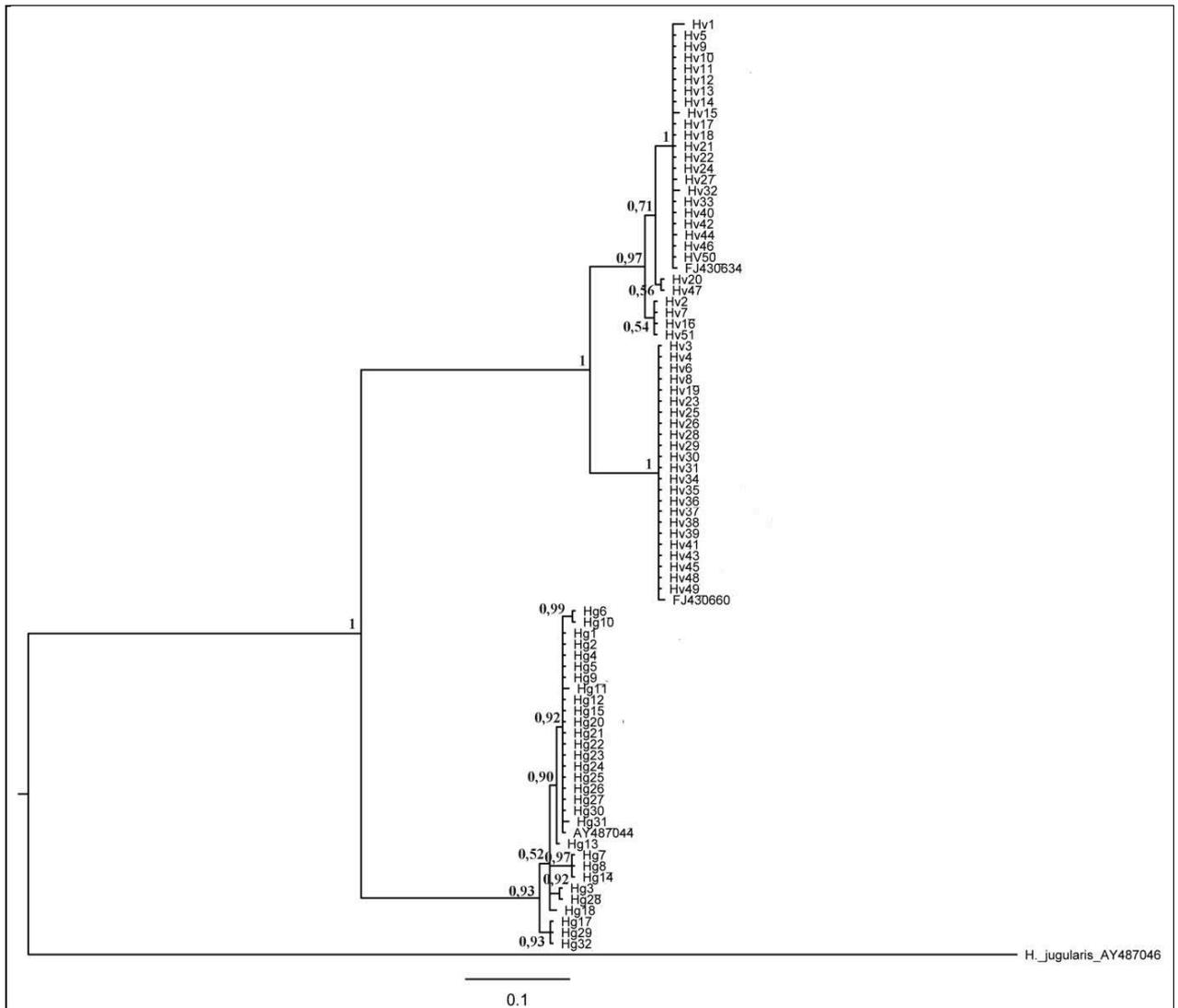


Fig. 16. Albero filogenetico per il frammento di ND4 con statistica bayesiana e 2.000.000 di generazioni. I numeri ai nodi rappresentano i valori di supporto statistico. L'outgroup è rappresentato da un esemplare di *D. jugularis* (AN: AY487046).

### 3.1.4 16S+CYT-B+ND4

L'analisi filogenetica basata sul totale dei marcatori mitocondriali considerati in questo studio (16S+Cyt-b+ND4) ha coinvolto 81 sequenze nucleotidiche per un allineamento totale di 1613 posizioni nucleotidiche del genoma mitocondriale. Tra queste sono stati individuati 288 siti variabili di cui 152 informativi per la parsimonia.

L'analisi congiunta effettuata utilizzando l'insieme dei tre marcatori mitocondriali, e condotta indipendentemente con ML, statistica bayesiana, e metodo della parsimonia per la derivazione degli aplotipi, ha fornito un quadro più dettagliato delle relazioni filogenetiche esistenti tra i diversi aplotipi individuati nelle due specie.

In particolare, nel clade E del biacco sono stati rinvenuti 10 diversi aplotipi (Fig. 17, 18, 19, 21). Dall'aplotipo a più ampia distribuzione (ME1), presente dalla Puglia alla pianura padana, risultano essere derivati una serie di aplotipi (Fig. 19) sia nell'Italia settentrionale (ME2, ME3, ME6, ME7), sia nel meridione (ME4, ME5, ME8, ME9, ME10). Tra questi, quelli maggiormente differenziati sono gli aplotipi ME9 e ME10, presenti rispettivamente in Sicilia e lungo l'Appennino meridionale (Fig. 21).

Il clade W risulta essere meno differenziato rispetto al precedente, con 3 diversi aplotipi (Fig. 17, 18, 19, 21) di cui uno geograficamente molto esteso (MW1), dal Lazio fino alla Francia, includendo anche il blocco sardo-corso e l'arcipelago toscano. Gli altri due, derivati indipendentemente dall'aplotipo MW1, sono entrambi rappresentati da un singolo esemplare, rinvenuto rispettivamente in Toscana (MW3) e Francia (MW2) (Fig. 21).

In *H. gemonensis* è stata evidenziata l'esistenza di 9 diversi aplotipi (Fig. 17, 18, 20, 21). Quello più ampiamente distribuito comprende esemplari dalla Grecia settentrionale alla Croazia (MG1). Da questo, e tra loro variamente imparentati, derivano una serie di aplotipi (Fig. 20), rinvenibili rispettivamente: a Krk (MG2), a Creta ed Eubea (MG6), in Grecia nord-orientale (MG8), nell'Argolide (MG9), e nel Peloponneso (MG3, MG4, MG5, MG7, MG10), che racchiude una consistente porzione della variabilità genetica della specie (Fig. 21).



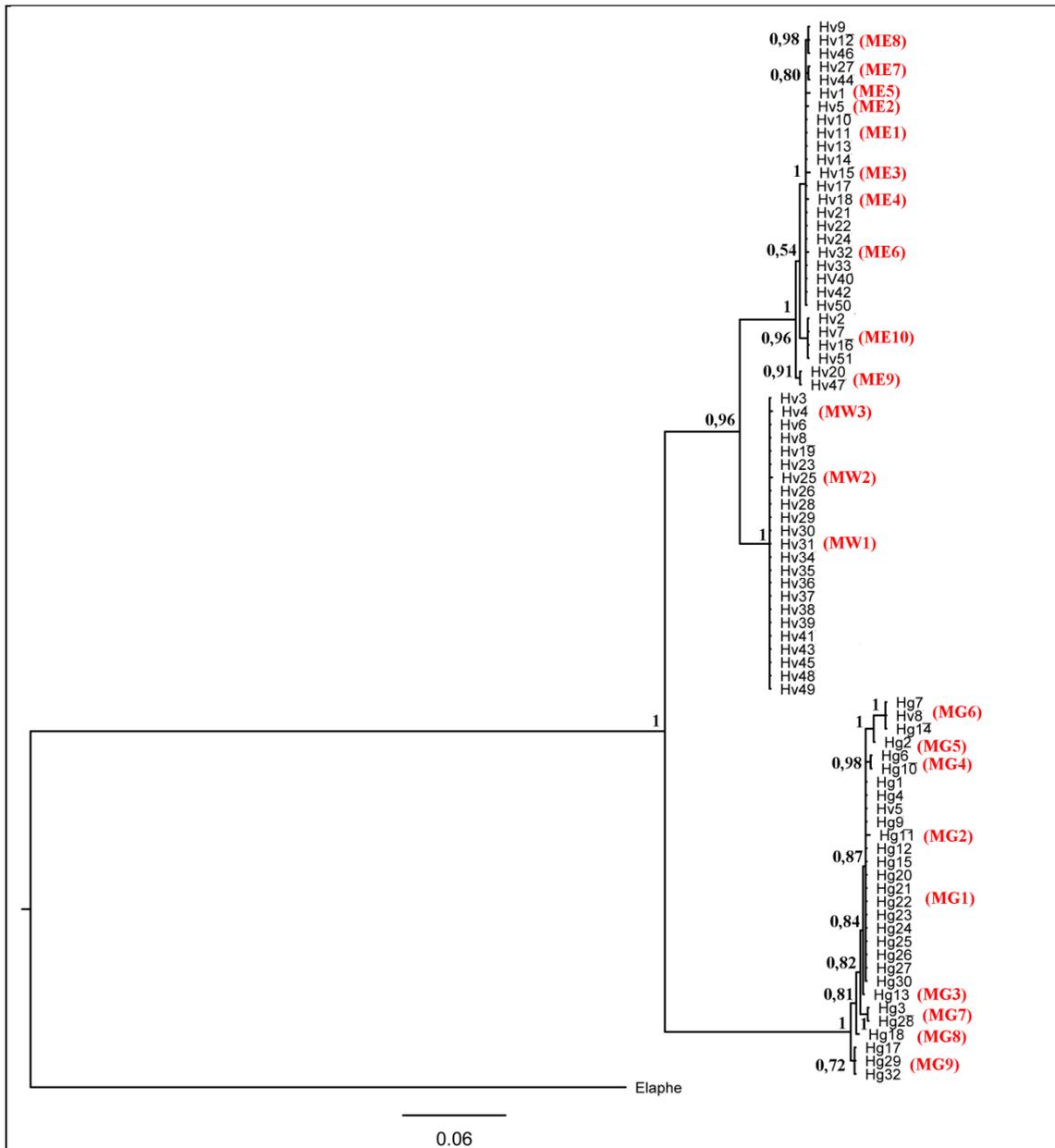


Fig. 18. Albero filogenetico con statistica bayesiana e 5.000.000 di generazioni considerando i frammenti di 16S, Cyt-b e ND4. I numeri ai nodi rappresentano i valori di supporto statistico. Tra parentesi sono indicati i diversi aplotipi individuati. L'outgroup è rappresentato da un esemplare di *O. porphyraceus* (AN: GQ181130).

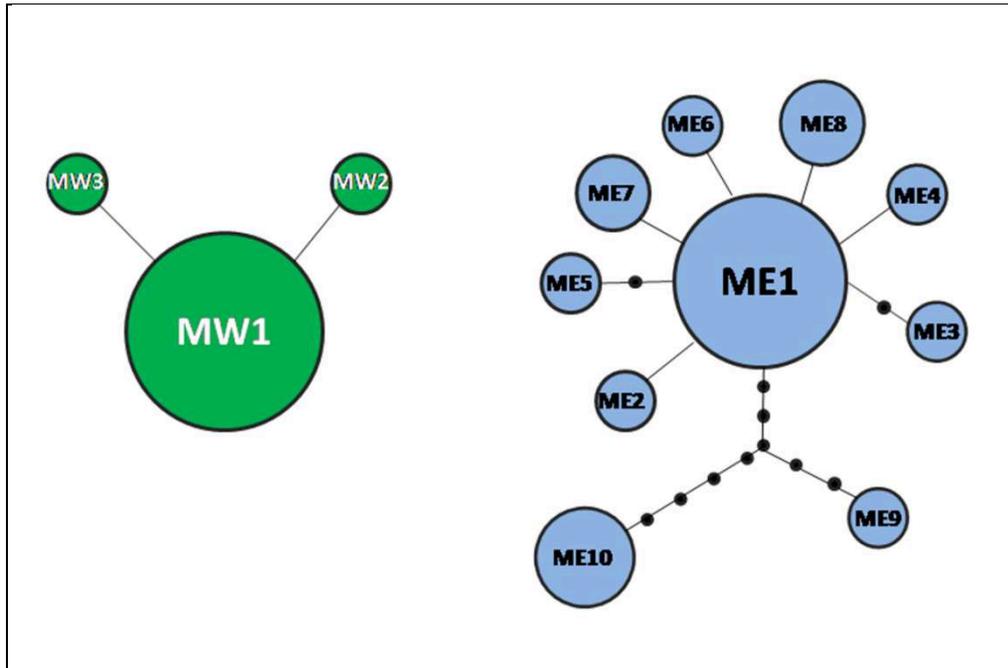


Fig. 19. Reticolo di derivazione di aplotipi mitocondriali (16S+Cyt-b+ND4) di *H. viridiflavus* con limite statistico del 95% della parsimonia. I cerchi colorati rappresentano i diversi aplotipi. Le dimensioni dei cerchi sono in relazione al numero di individui per aplotipo. In verde il clade W e in azzurro il clade E. I punti neri rappresentano aplotipi mancanti.

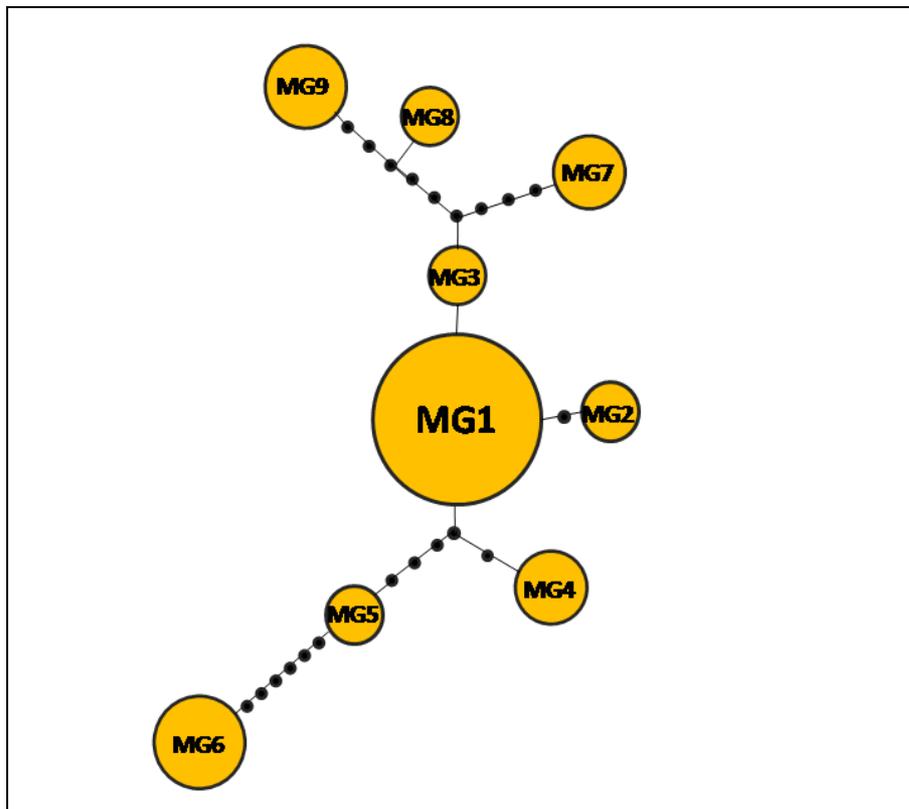


Fig. 20. Reticolo di derivazione di aplotipi mitocondriali (16S+Cyt-b+ND4) di *H. gemonensis* con limite statistico del 95% della parsimonia. I cerchi colorati rappresentano i diversi aplotipi. Le

dimensioni dei cerchi sono in relazione al numero di individui per aplotipo. I punti neri rappresentano aplotipi mancanti.

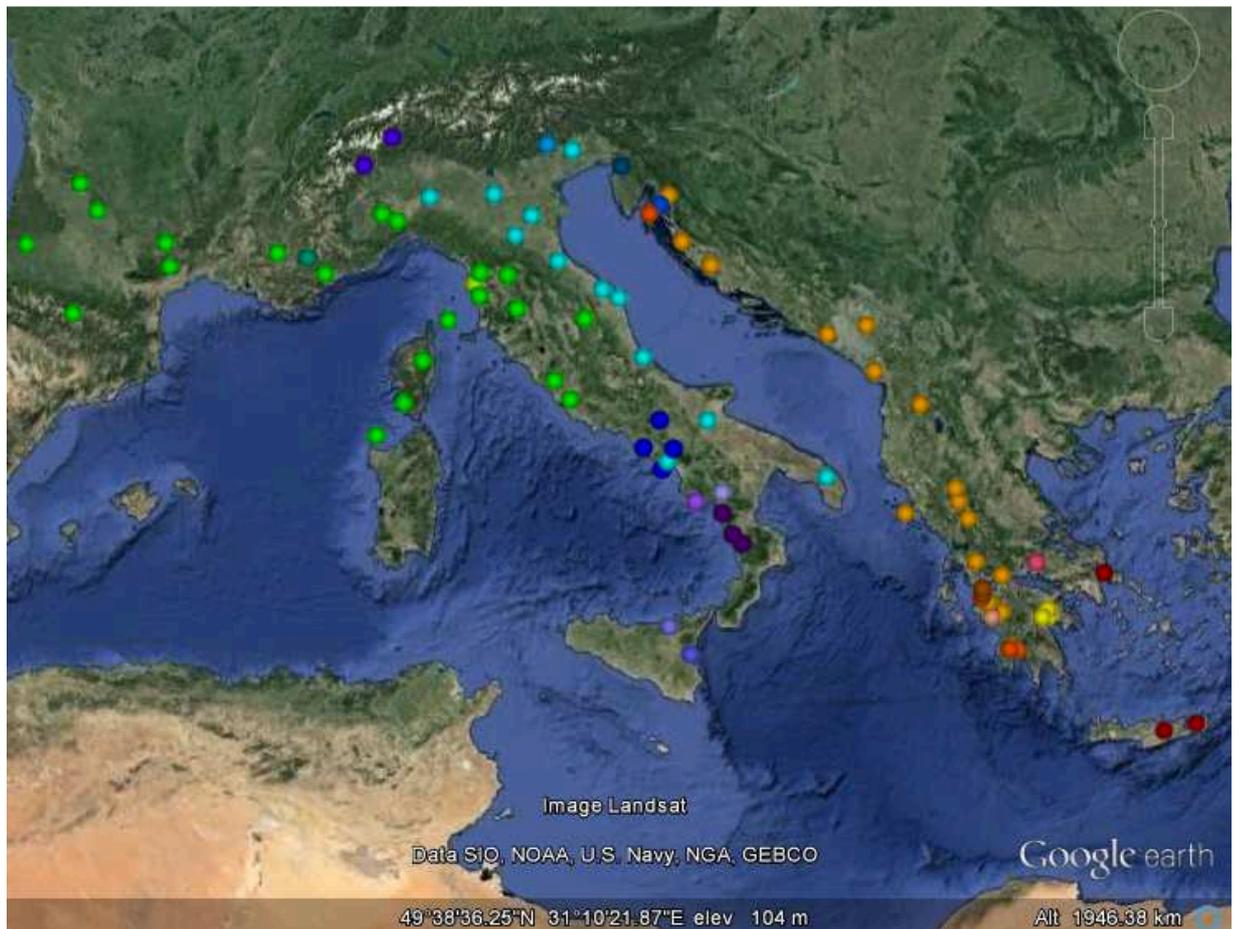


Fig. 21. Georeferenziazione degli aplotipi mitocondriali (16S+Cyt-b+ND4). In diverse tonalità di arancione, giallo e rosso sono rappresentati gli aplotipi di *H. gemonensis*. In azzurro, blu e viola sono rappresentati gli aplotipi del clade E di *H. viridiflavus* e in tonalità verde quelli del clade W.

### 3.1.5 PRLR

La variabilità di una selezione di individui, caratterizzati da diversi aplotipi riscontrati nelle analisi filogenetiche con i marcatori mitocondriali, è stata testata anche per il marcatore nucleare PRLR.

L'analisi filogenetica effettuata con il PRLR ha prodotto un allineamento totale di 540 posizioni nucleotidiche. Il rapporto transizioni/transversioni è risultato di 7,52. Confrontando le sequenze di *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* con le sequenze omologhe di altre specie di squamati appartenenti a diversi raggruppamenti tassonomici è stata individuata nel biacco una delezione di 18 cb (Fig. 22), che non modifica la cornice di lettura.

Nell'allineamento sono stati individuati 36 siti variabili (54 considerando la delezione) di cui 10 informativi per la parsimonia (27 considerando la delezione).

Il PRLR riconosce le due entità specifiche, ma, rispetto ai più veloci marcatori mitocondriali Cyt-b e ND4, risulta essere meno adatto a descrivere la diversità genetica intraspecifica esistente nelle specie studiate.

In particolare, l'analisi filogenetica con il PRLR (Fig. 23 e 24) ha fornito per *H. viridiflavus* un risultato simile a quello precedentemente riportato per il 16S, riconoscendo i due cladi principali (E e W). Il PRLR tuttavia non identifica, all'interno di questi ultimi una serie di sub-aplotipi simili a quelli individuati con il Cyt-b e l'ND4.

In *H. gemonensis* sono stati invece identificati 6 diversi aplotipi (Fig. 23 e 24), che mostrano una caratterizzazione geografica simile, ma complessivamente meno dettagliata, rispetto a quella precedentemente descritta per i marcatori mitocondriali Cyt-b e ND4.

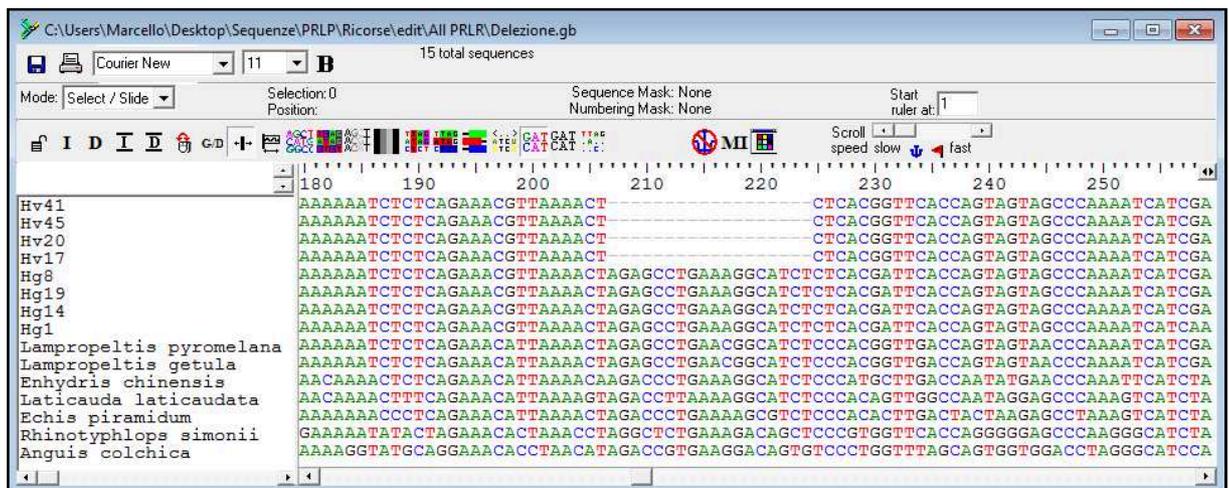


Fig. 22. Allineamento della porzione del tratto considerato del PRLR contenente la delezione riscontrata nelle sequenze di *H. viridiflavus*.

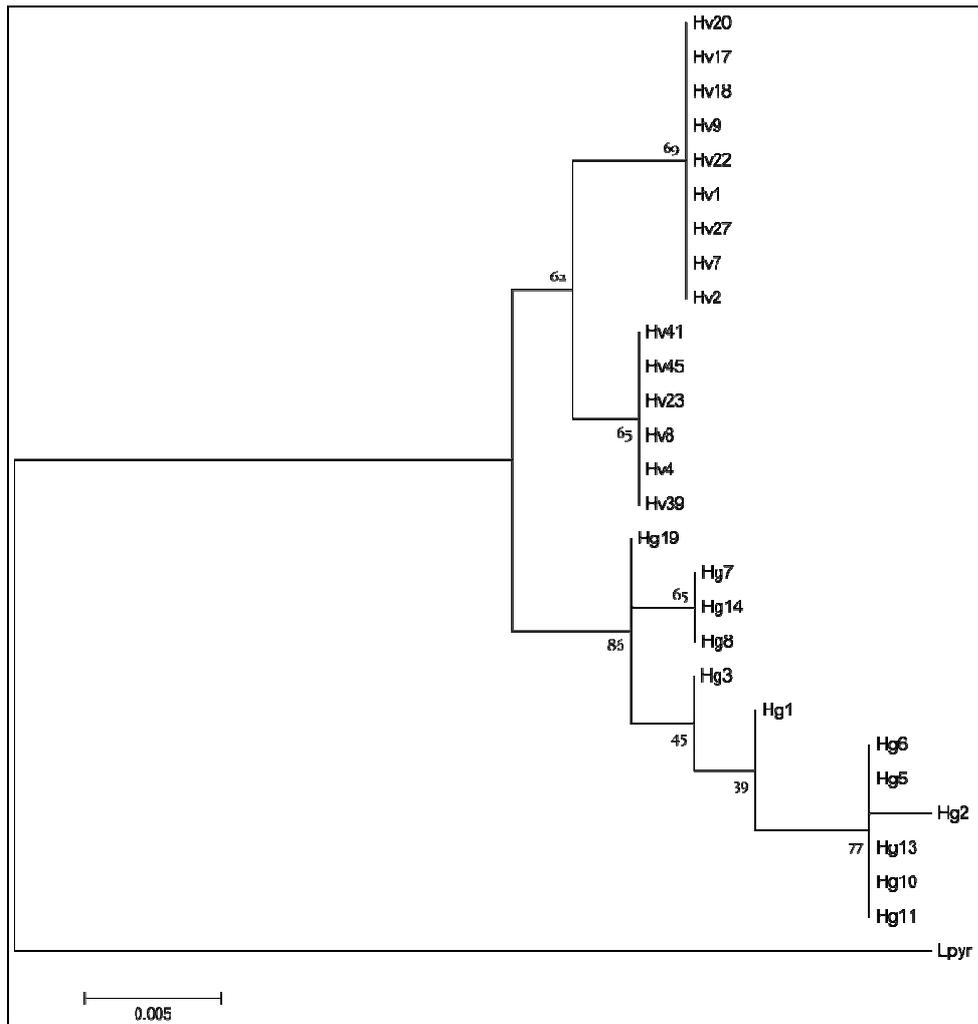


Fig. 23. Albero filogenetico del PRLR con Maximum Likelihood (ML). I valori ai nodi rappresentano le percentuali di supporto statistico considerando 1000 ricampionamenti di bootstrap. Come outgroup è stato utilizzato un esemplare di *L. pyromelana* (AN: JN034329).

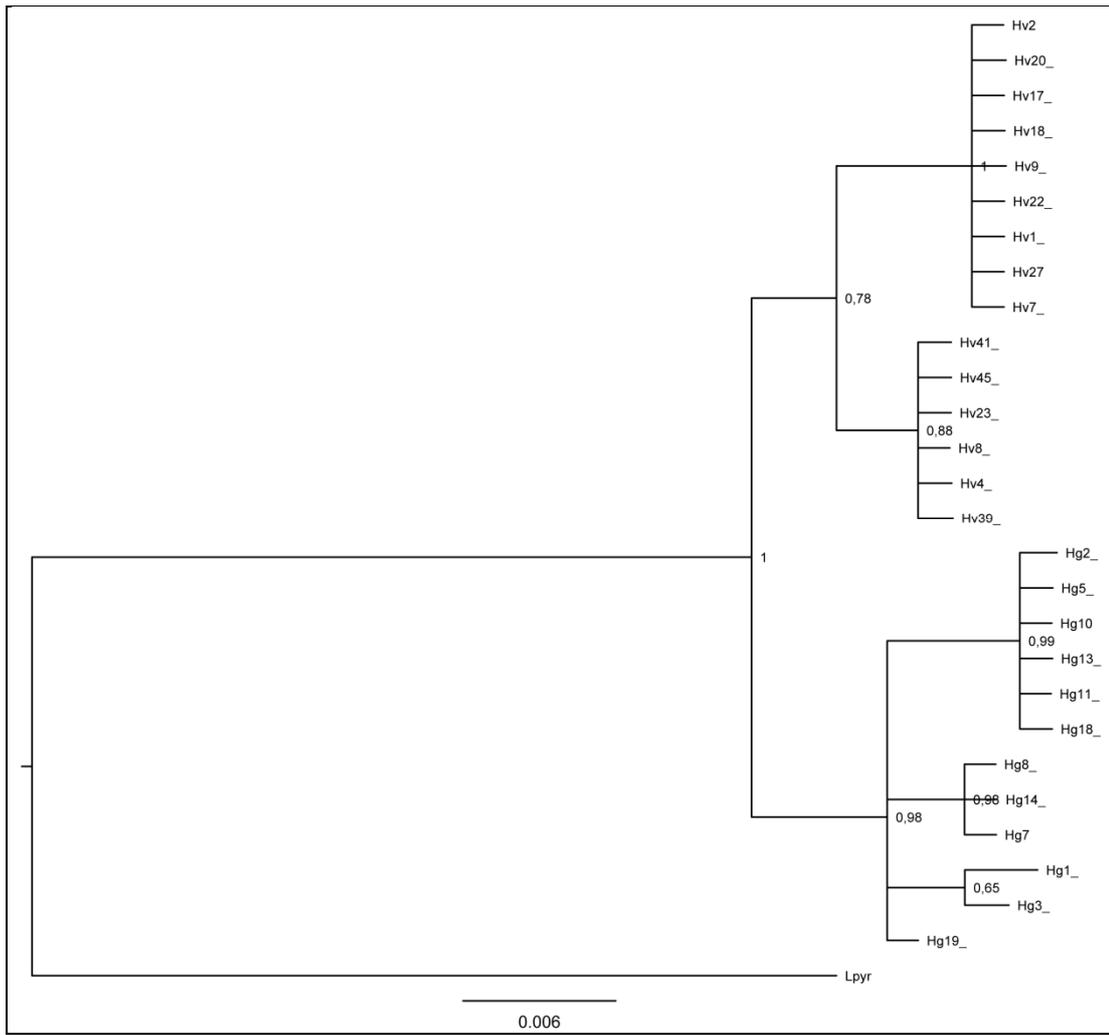


Fig. 24. Albero filogenetico del PRLR con statistica bayesiana con 2.000.000 di generazioni. I numeri ai nodi rappresentano i valori di supporto statistico. L'outgroup è rappresentato da un esemplare di *L. pyromelana* (AN: JN034329).

### 3.2 ANALISI CITOGENETICA

L'analisi citogenetica ha evidenziato che il cariotipo di *H. viridiflavus* risulta essere composto da  $2n=36$  cromosomi, con 8 coppie di macrocromosomi e 10 coppie di microcromosomi. Tra i macrocromosomi 7 coppie sono risultate essere a due braccia (metacentriche o submetacentriche) ed una coppia è risultata essere invece composta da elementi telocentrici (Fig. 25). È stato inoltre individuato all'interno della specie il sistema di determinazione sessuale tipico dei serpenti (Olmo, 1986; Olmo et al., 2005), caratterizzato dalla presenza dei cromosomi ZW, localizzabili nella quarta coppia di macrocromosomi (Fig. 25).

Dopo colorazioni di bandeggio il cromosoma W appare in avanzato stato di differenziamento dal cromosoma Z risultando quasi completamente eterocromatico (Fig. 26). Oltre all'eterocromatina W-associata, sono visibili, tramite le colorazioni di bandeggio, delle ristrette aree eterocromatiche autosomiche localizzate ai telomeri e nelle zone centromeriche della maggior parte dei macrocromosomi (Fig. 26).

Inoltre, i risultati ottenuti mediante colorazioni tradizionali e di bandeggio hanno permesso l'individuazione di due differenti citotipi all'interno della specie, tra loro differenziati in base ad una diversa morfologia del cromosoma W (Fig. 26). Tale elemento appare infatti metacentrico in alcune femmine e telocentrico in altre. Mediante la georeferenziazione dei campioni utilizzati è stato possibile identificare questi due citotipi come caratteristici dei due cladi principali (E e W) individuati mediante l'analisi molecolare, di cui appaiono essere caratteristiche cromosomiche fissate (Fig. 27).



Fig. 25. Cariotipo di un maschio (a sinistra) e di una femmina (a destra) di *H. viridiflavus*. All'interno dei cerchi sono evidenziate le coppie di cromosomi sessuali ZZ e ZW.

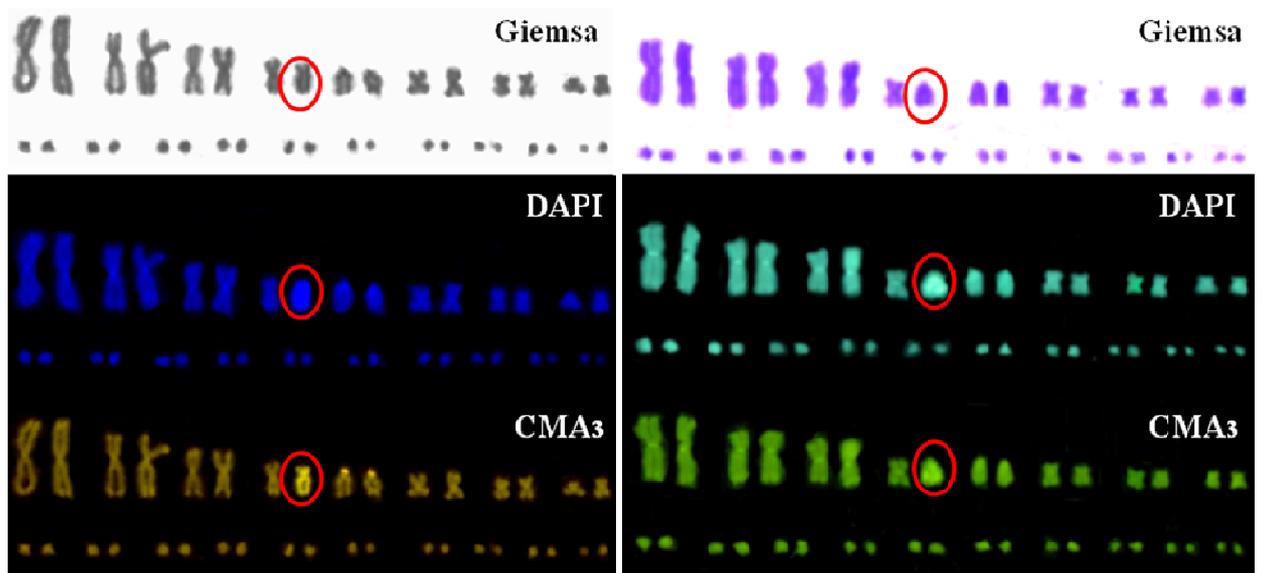


Fig. 26. Citotipi E (a sinistra) e W (a destra) di *H. viridiflavus* colorati con colorazione Giemsa, C-banding+DAPI e C-banding+CMA<sub>3</sub>. All'interno dei cerchi sono evidenziati i cromosomi W.

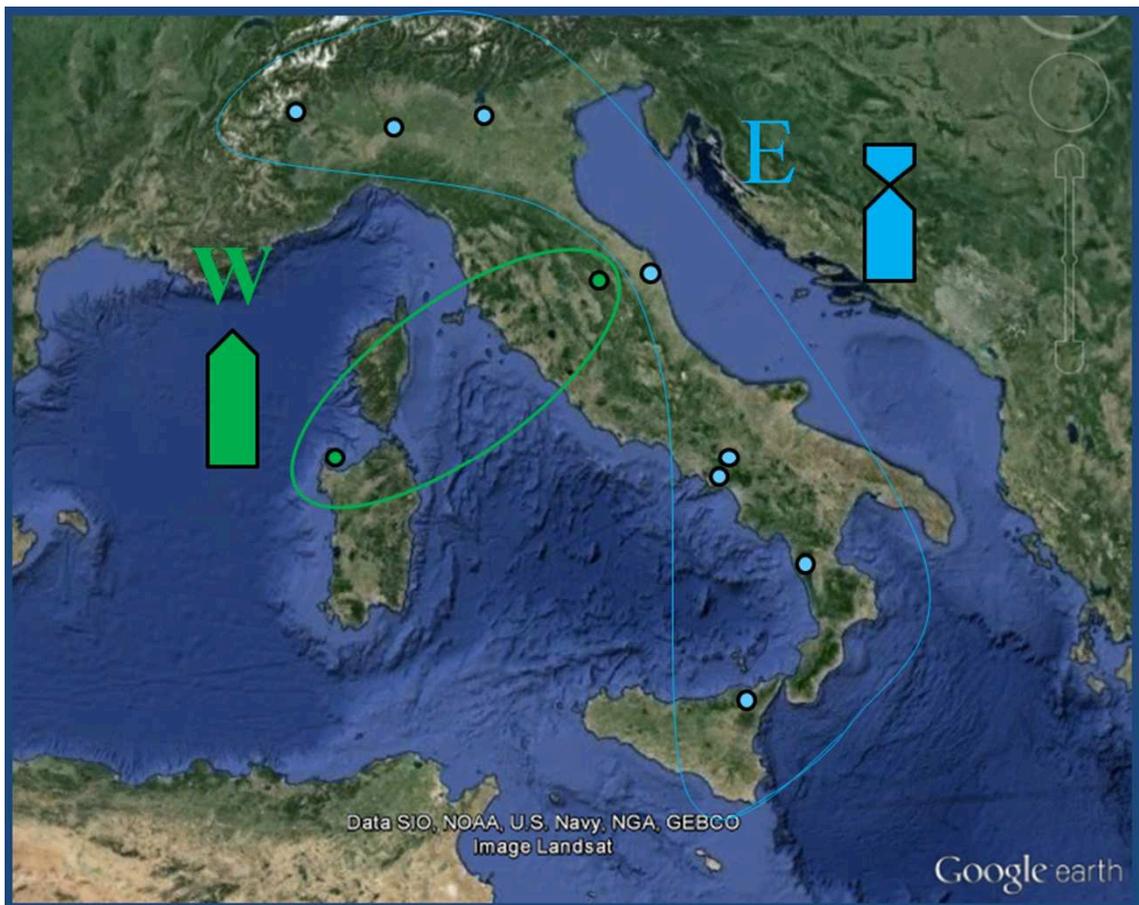


Fig. 27. Georeferenziazione dei 2 citotipi individuati in *H. viridiflavus* legati ad una diversa morfologia del cromosoma W, telocentrico nel clade occidentale e submetacentrico in quello orientale.

Le colorazioni con Ag-NOR banding, NOR-FISH e CMA<sub>3</sub> hanno permesso l'individuazione dei loci NOR che risultano essere invariabilmente localizzati sul braccio corto della quinta coppia di macrocromosomi telocentrici (Fig. 28 e 29).

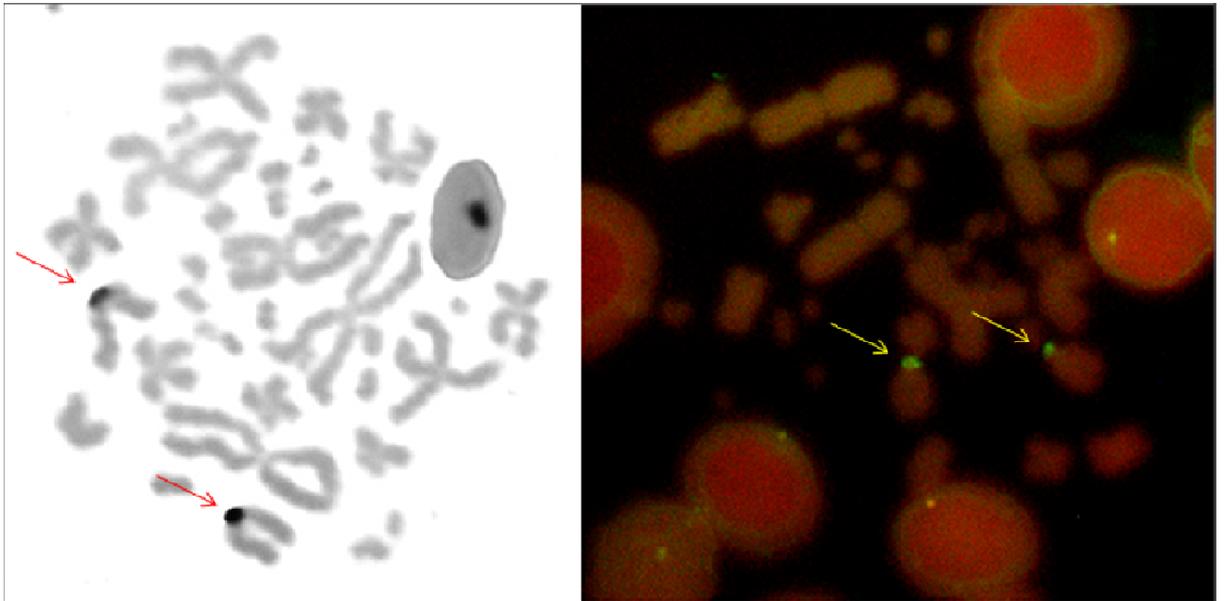


Fig. 28. Piastre metafasiche di *H. viridiflavus* colorate con Ag-NOR banding (a sinistra) e NOR-FISH (a destra). Le frecce indicano i loci NORs.

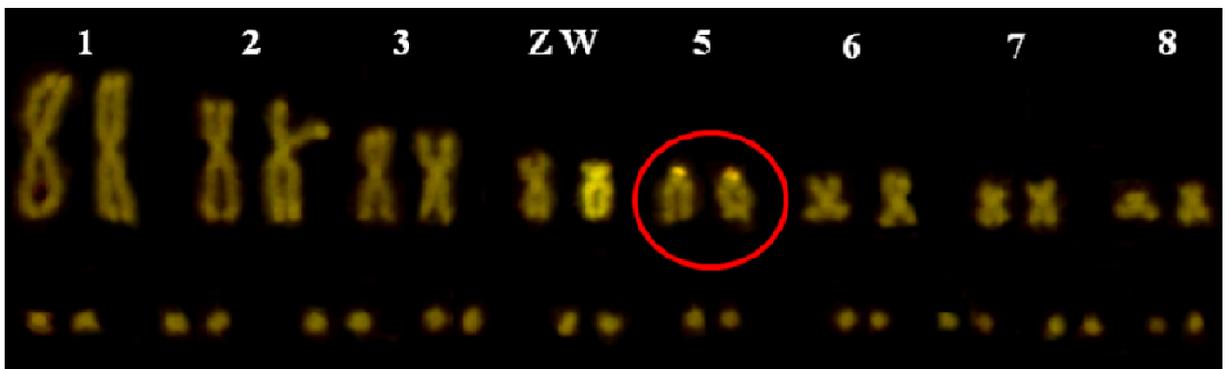


Fig. 29. Piastre metafasiche di *H. viridiflavus* colorate con C-banding+CMA<sub>3</sub>. All'interno del cerchio è evidenziata la quinta coppia di cromosomi recante i loci NORs.

### 3.3 MORFOMETRIA GEOMETRICA

L'analisi dei landmarks della lepidosi cefalica è stata effettuata considerando diversi insiemi di dati. Dapprima l'analisi è stata condotta considerando il campionamento totale degli esemplari disponibili delle due specie. Nella relativa PCA i componenti principali PC1 e PC2 sono risultati sufficientemente informativi, descrivendo la maggior parte della diversità di forma (circa il 60% di quella totale) relativa ai landmarks utilizzati in questo studio (Fig. 30).

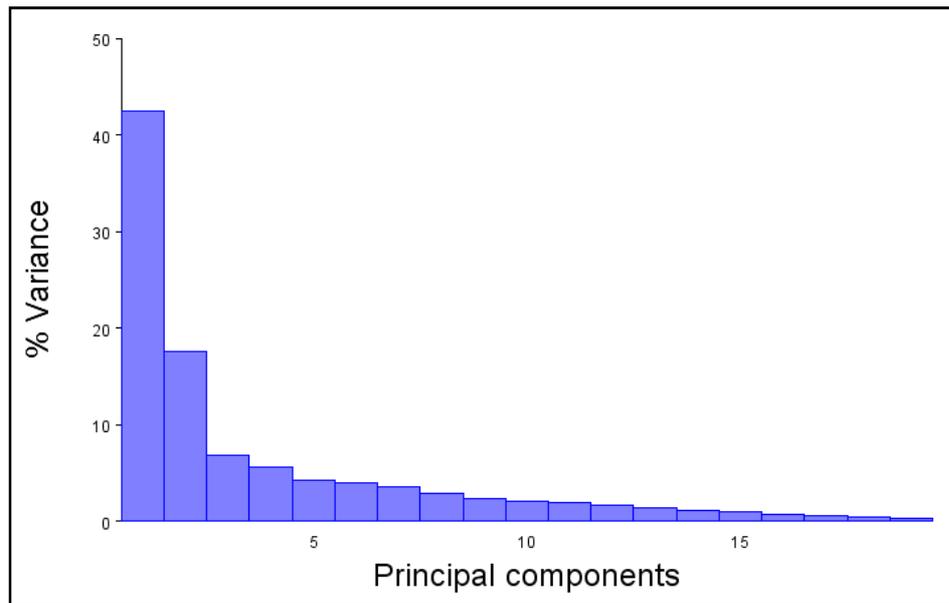


Fig. 30. Eigenvalues dei diversi componenti principali utilizzati nelle analisi morfometriche considerando tutto il campione disponibile per le due specie.

Come è possibile osservare nelle relative griglie di deformazione il PC1 comprende una varianza principalmente orientata in senso longitudinale mentre il PC2 si riferisce in maggior misura anche ad una componente trasversale (Fig. 31 e 32).

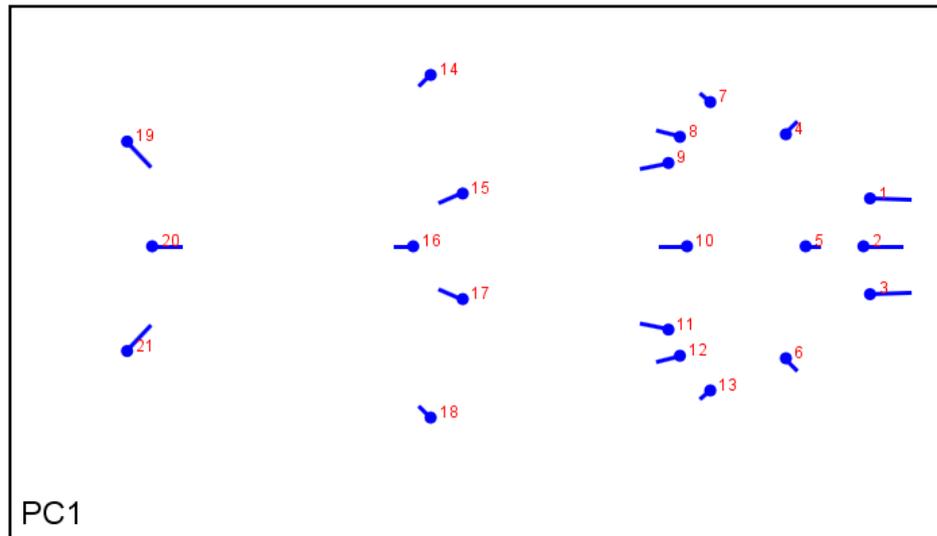


Fig. 31. Cambiamenti di forma relativi alla varianza del PC1 considerando il campione totale.

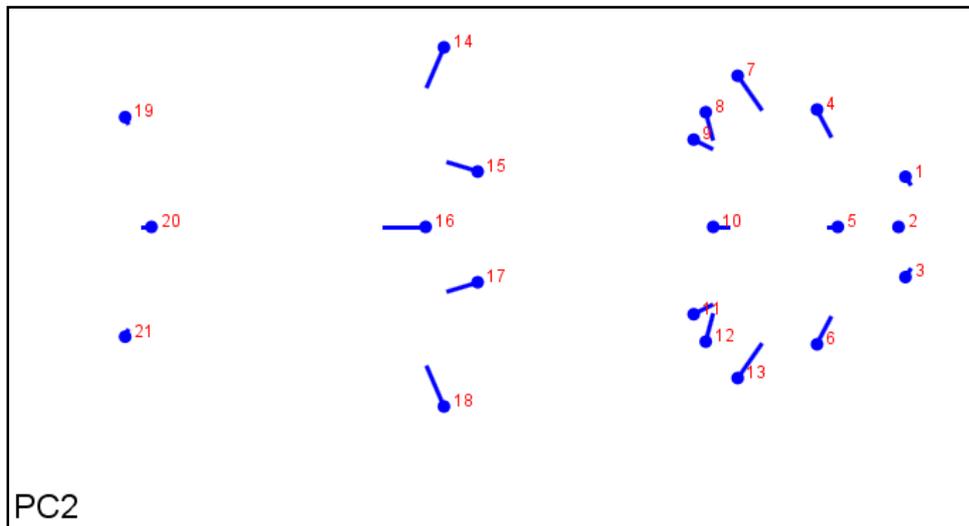


Fig. 32. Cambiamenti di forma relativi alla varianza del PC1 considerando il campione totale.

L'analisi dei campioni delle due specie in toto mostra l'esistenza di un gradiente specifico morfologico, principalmente orientato lungo il PC2 (Fig. 33).

Successive analisi hanno tuttavia evidenziato la presenza di una componente relativa al dimorfismo sessuale in *H. viridiflavus* (Fig. 34). Analoghe analisi non hanno riscontrato invece in *H. gemonensis* alcuna presenza di differenze di forma relative ad un dimorfismo sessuale (Fig. 35).

Ulteriori analisi effettuate escludendo esemplari "outliers" e utilizzando come campione il totale degli esemplari di *H. gemonensis* e solo uno dei due sessi in *H.*

*viridiflavus* hanno consentito di ottenere una migliore descrizione del grado di diversità morfologica relativo a differenze di forma tra le due specie (Fig. 36).

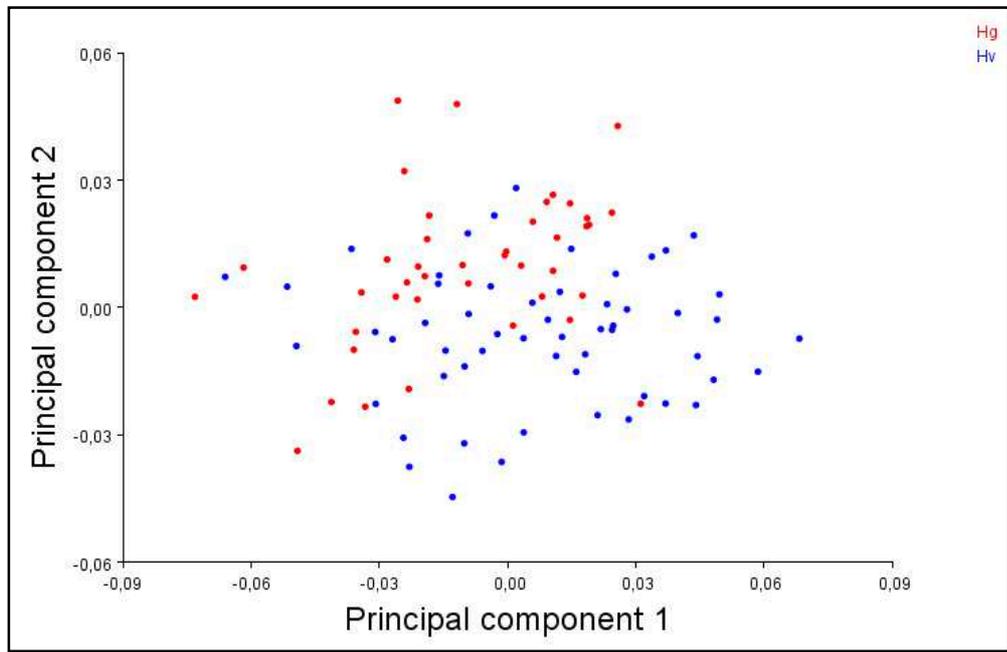


Fig. 33. PCA relativa a differenze di forma considerando il campione totale di *H. viridiflavus* (in blu) e *H. gemonensis* (in rosso).

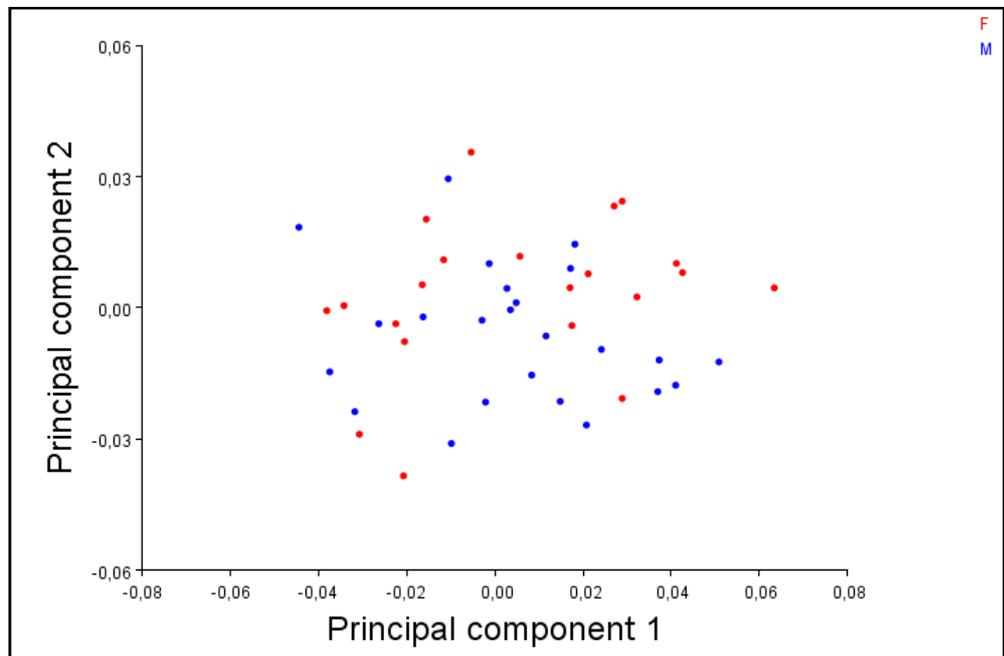


Fig. 34. PCA relativa a differenze di forma considerando solo i campioni di *H. viridiflavus* ripartiti in base al sesso. I maschi sono rappresentati in blu e le femmine in rosso.

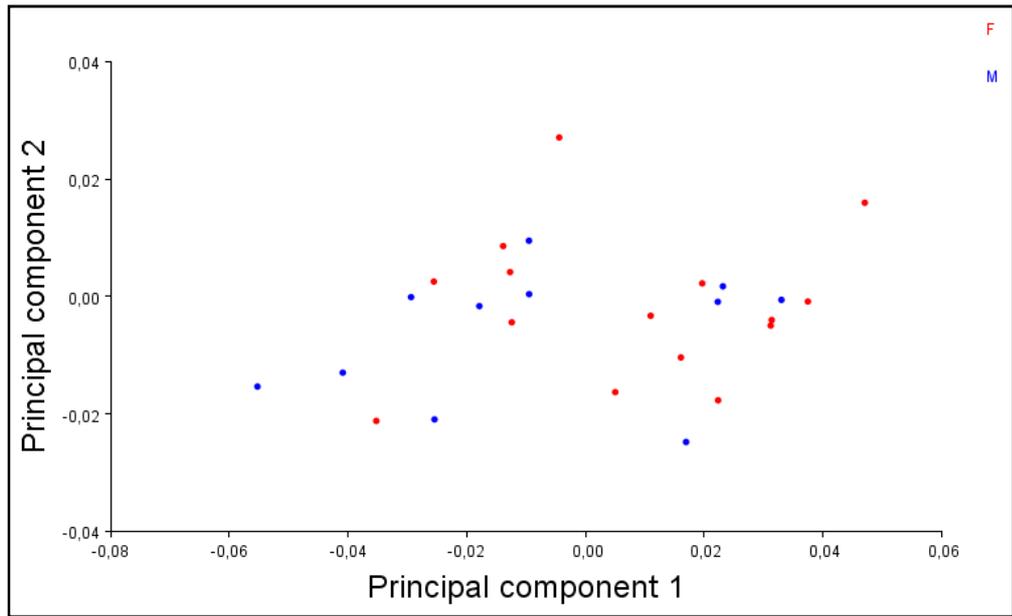


Fig. 35. PCA relativa a differenze di forma considerando solo i campioni di *H. gemonensis* ripartiti in base al sesso. I maschi sono rappresentati in blu e le femmine in rosso.

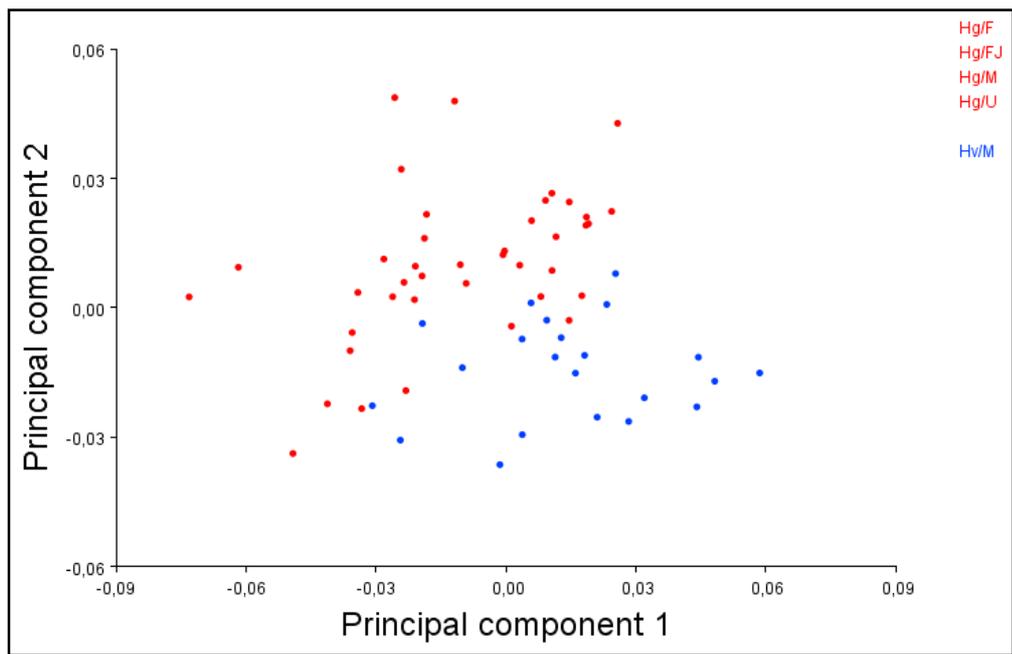


Fig. 36. PCA relativa a differenze di forma considerando il totale dei campioni *H. gemonensis* (in rosso) e i maschi di *H. viridiflavus* (in blu).

L'analisi dimensionale relativa al CS (Centroid Size) evidenzia nel confronto tra le due specie le maggiori dimensioni medie di *H. viridiflavus*. Tuttavia, considerando anche esemplari "outliers" emerge una notevole sovrapposibilità delle rispettive varianze (Fig. 37).

In maniera analoga, quando si analizza il CS di maschi e femmine di *H. viridiflavus* è possibile osservare maggiori dimensioni medi nei maschi ma ampia sovrapposibilità tra le varianze dei due sessi (Fig. 38).

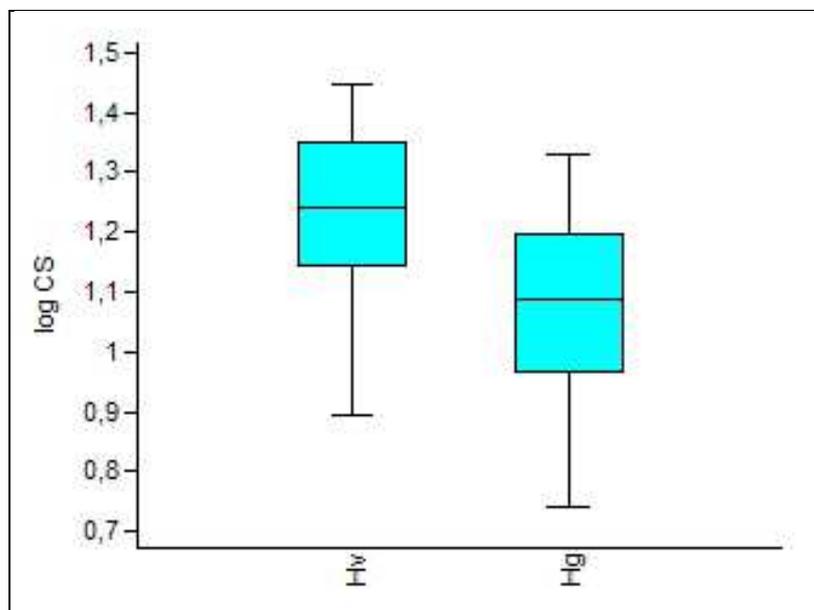


Fig. 37. Box-plot del CS relativo a maschi di *H. viridiflavus* e *H. gemonensis*.

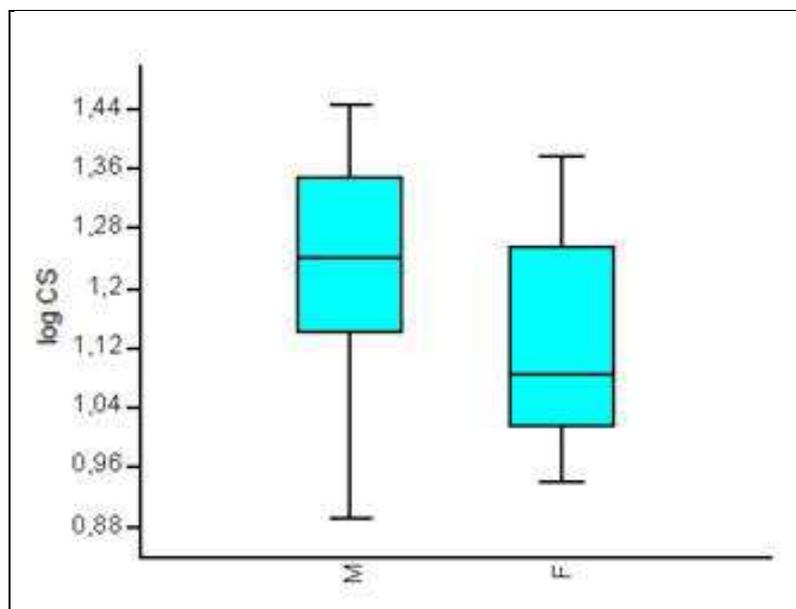


Fig. 38. Box-plot del CS relativo a maschi e femmine di *H. viridiflavus*

### 3.4 SEQUENZE RIPETUTE

#### 3.4.1 AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO

Le amplificazioni condotte con le diverse coppie di primers hanno prodotto delle bande nette solo utilizzando campioni appartenenti a specie del genere *Hierophis*, nelle altre specie utilizzate in questa analisi è stato ottenuto solo uno smear o nessun segnale di amplificazione.

Le sequenze RL1L-240 e RL1L-360 sono risultate tra loro correlate, rispettivamente di 243 e 360 cb. In entrambe è stato rilevato un elevato contenuto in AT (di 67,9% e 65,4%, rispettivamente) e nessuna delle due esibisce alcuna sub-struttura interna. Queste due sequenze presentano un tratto 5' comune (CTL1L) con un'identità di circa l'80% (Fig. 39). Inoltre, tale tratto comprende circa 80 cb con un'elevata identità (di circa il 70%) con un elemento trasponibile non-LTR della famiglia L1 di *Anolis carolinensis* (Piskurek et al., 2009, AN) (Fig. 39) e *Lacerta agilis* (DQ117995, dati non pubblicati).

La sequenza RepHvir, di 239 cb e con un contenuto in AT di 64,4%, non presenta nessuna sub-struttura interna. Tale sequenza non ha mostrato significative identità con nessuna sequenza depositata in rete.

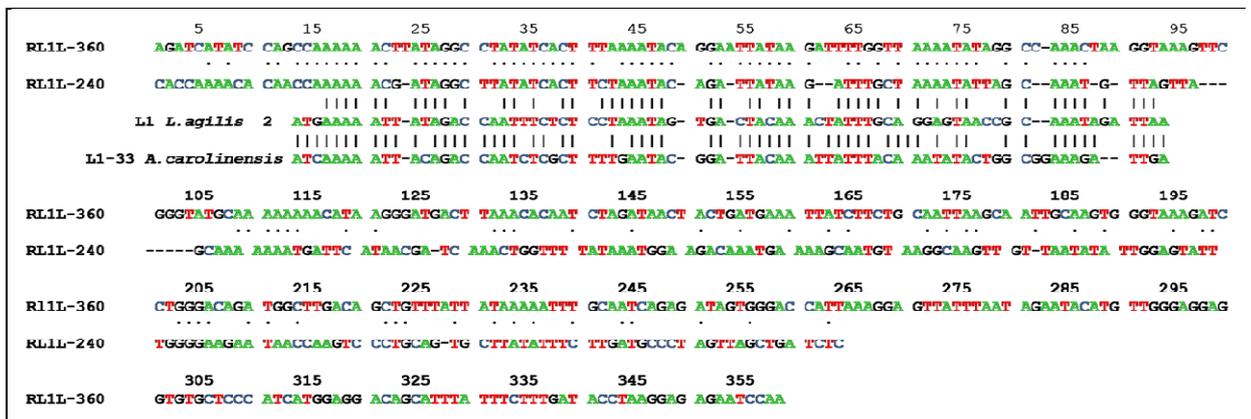


Fig. 39. Allineamento tra le sequenze RepL1L-240 RepL1L-360 e elemento L1 di *Anolis carolinensis* e *L. agilis*. I punti neri rappresentano identità nucleotidiche tra RL1L-240 e RL1L-360, le linee verticali rappresentano identità nucleotidiche tra RL1L-240 e gli elementi L1 di *A. carolinensis* e *L. agilis*.

### 3.4.2 SOUTHERN BLOT E DOT BLOT

Le analisi di Southern blot hanno evidenziato per RL1L-240, RL1L360 e CTL1L un segnale di ibridazione solo su DNA genomico di specie appartenenti al genere *Hierophis*.

Southern blot utilizzando la sonda RL1L-240 hanno evidenziato la presenza di un segnale diffuso in *H. viridiflavus* ma nessuna banda chiaramente identificabile (evidenza non mostrata.)

Per RL1L-360 è stato riscontrato in *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* un simile profilo di ibridazione costituito da un segnale diffuso e da distinte bande (da circa 200 a circa 800 cb) non organizzate in multimeri (Fig. 40). Analisi con Dot blot quantitativo hanno evidenziato che tale sequenza rappresenta circa lo 0,6% del genoma del biacco. Considerando che il genoma della specie è di 2,2 pg/N tale sequenza risulta presente con circa 36700 copie (Fig. 43).

Southern blot su DNA genomico di *H. viridiflavus* utilizzando la sonda CTL1L ha evidenziato in *H. viridiflavus* la presenza di un segnale diffuso e distinte bande da circa 700 a circa 1300 cb, che non presentavano organizzazione multimerica (Fig. 41).

Il Southern blot realizzato per RepHv ha evidenziato un segnale di ibridazione in tutte le specie esaminate. Il segnale di ibridazione riscontrato per tale sequenza ha mostrato in tutte le specie studiate. Nei tre colubridi considerati (*H. viridiflavus*, *H. gemonensis* e *E. quatuorlineata*) e nel lamprofide *M. monspessulanus* sono state riscontrate bande distinte non organizzate in multimeri e mostranti un simile pattern (Fig. 42). In *V. aspis* è stato riscontrato solo un segnale di ibridazione diffuso a partire da circa 500 cb fino ad alto peso molecolare, mentre in *T. vermicularis* è stato rinvenuto un segnale di ibridazione solo ad alto peso molecolare.

Analisi di Dot blot quantitativo per la sequenza RepHv hanno mostrato che tale sequenza costituisce circa il 2% del genoma di *H. viridiflavus* (risultando presente con circa 180000 ripetizioni) (Fig. 44), il 3% del genoma di *E. quatuorlineata*, il 2% del genoma di *M. monspessulanus*, e lo 0,5% del genoma di *V. aspis* (Fig. 45).

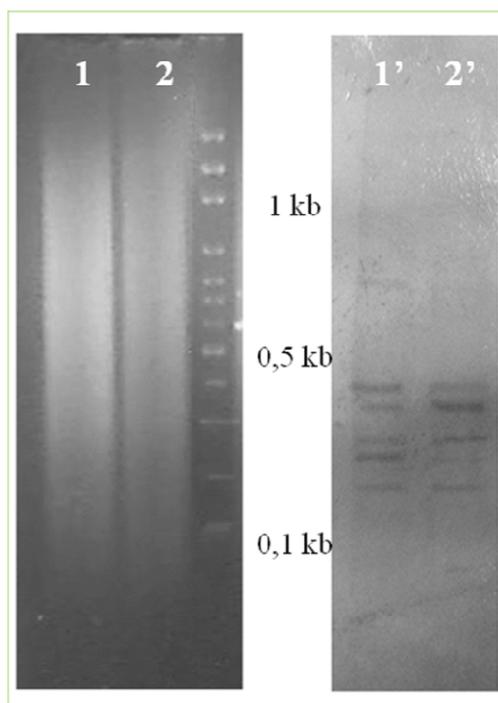


Fig. 40. Southern blot su DNA genomico di *H. viridiflavus* (1 e 1') e *H. gemonensis* (2 e 2') digerito con *Mbo*I e ibridato con la sonda RepL1L360.

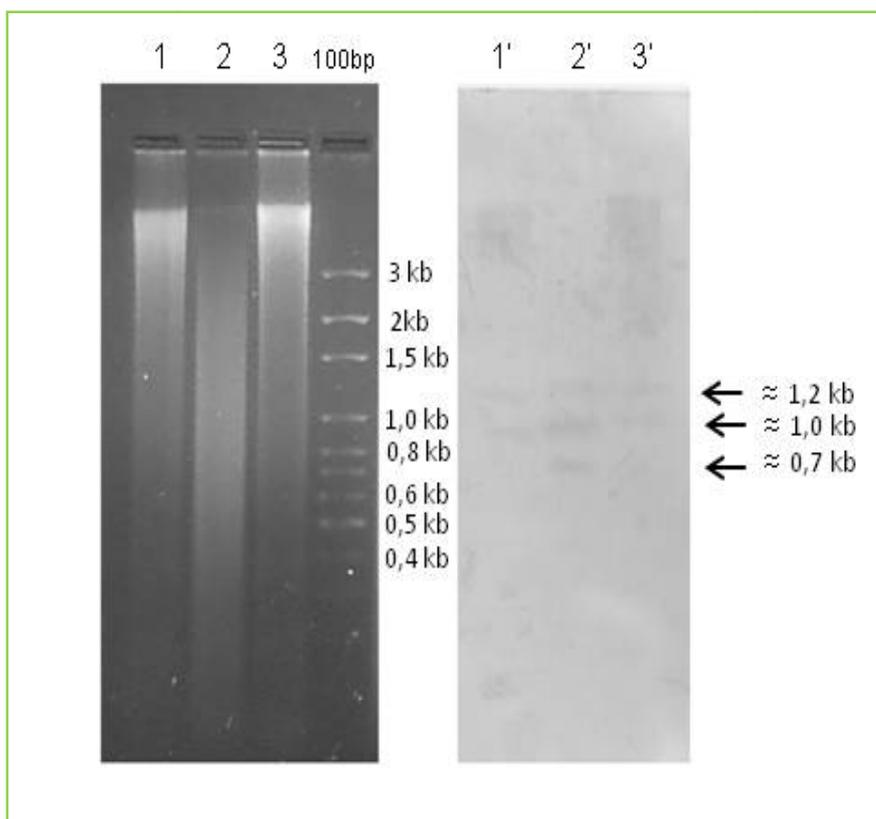


Fig. 41. Southern blot su DNA genomico di *H. viridiflavus* digerito con *Bg*III (1 e 1'), *Hae*III (2 e 2') e *Stu*I (3 e 3') ed ibridato con la sonda CTL1L.

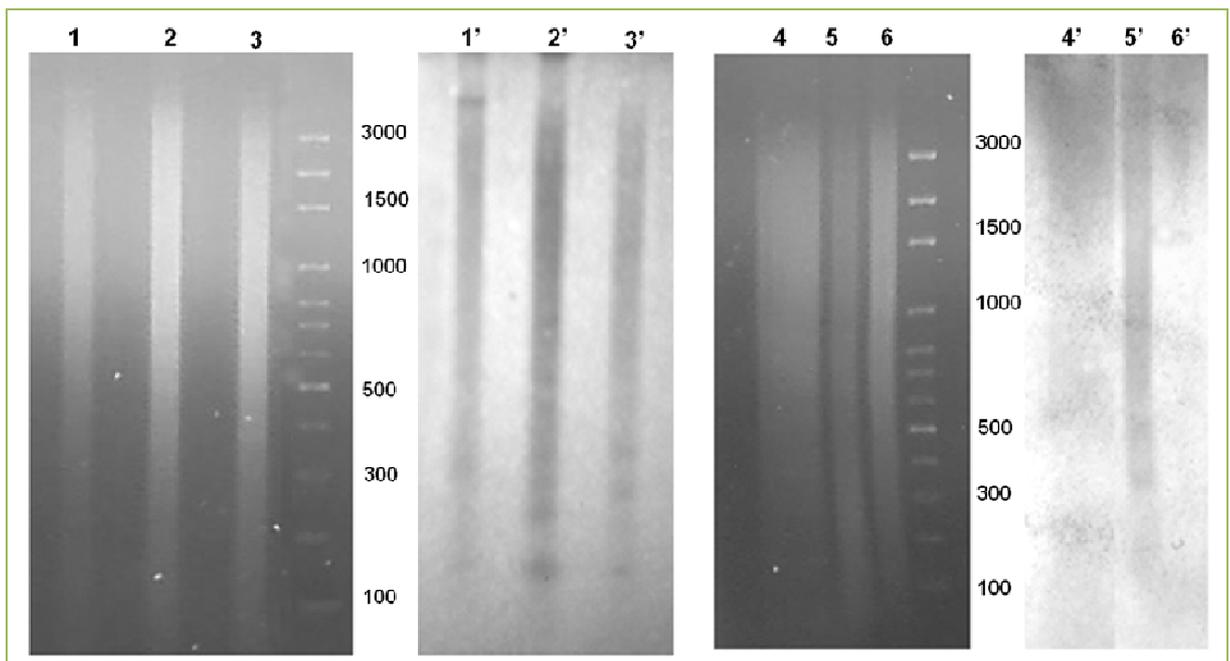


Fig. 42. Southern blot su DNA genomico di *H. viridiflavus* (1 e 1') e *E. quatuorlineata* (2 e 2'), *M. monspessulanus* (3 e 3'), *V. aspis* (4 e 4'), *H. gemonensis* (5 e 5') e *T. vermicularis* (6 e 6') digerito con *Hae*III e ibridato con la sonda RepHv.

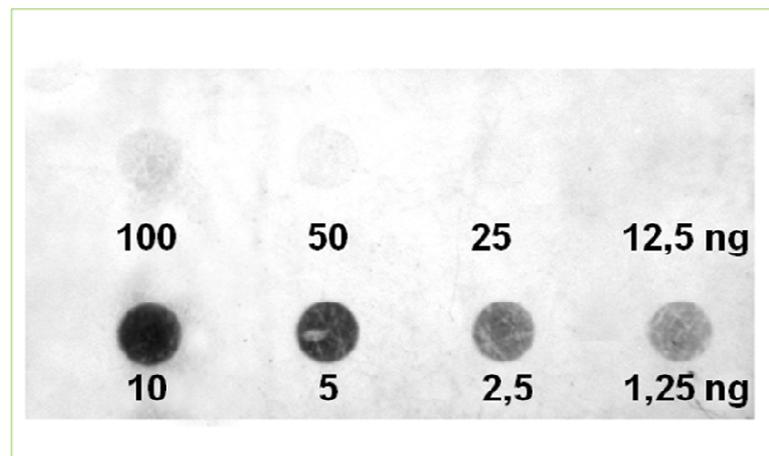


Fig. 43. Dot blot con sonda RL1L360 su DNA di *H. viridiflavus* (sopra) e clone (sotto).

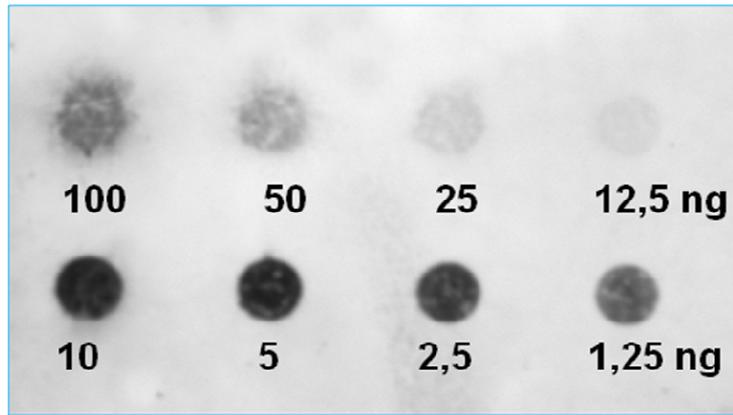


Fig. 44. Dot blot con sonda RepHv su DNA di *H. viridiflavus* (sopra) e clone (sotto).

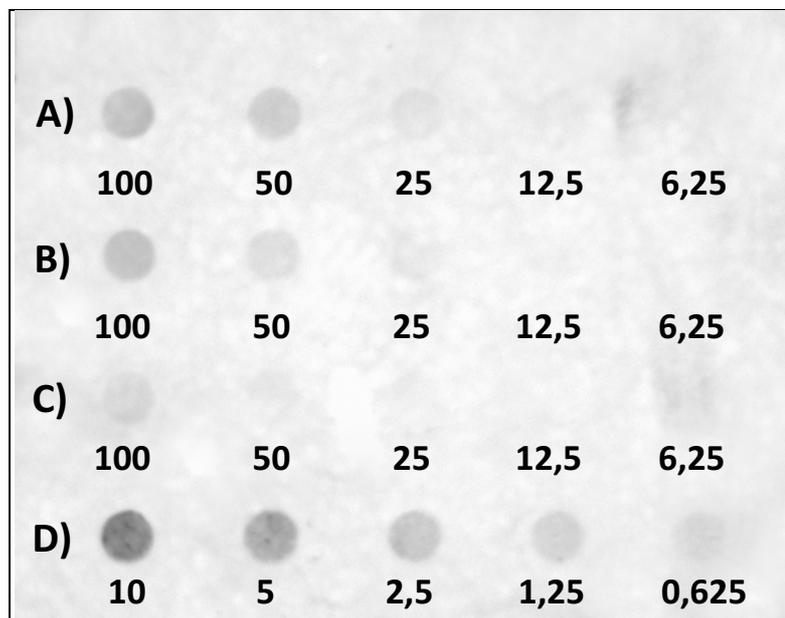


Fig. 45. Dot blot con sonda RepHv su DNA di: A) *E. quatuorlineata*; B) *M. monspessulanus*; C) *V. aspis*; D) clone.

### 3.4.3 FISH

Le analisi di ibridazione *in situ* utilizzando come sonda le sequenze RL1L-240 e RL1L360 hanno evidenziato simili segnali di ibridazione, esclusivamente su piastre metafasiche di *H. viridiflavus*. In particolare, distinti segnali di ibridazione sono stati localizzati esclusivamente sul cromosoma sessuale W in tutte le piastre esaminate di tale specie (Fig. 46 e 47). Altri deboli segnali, difficilmente interpretabili, sono stati variabilmente localizzati su altri cromosomi della specie in differenti piastre metafasiche.

Le FISH realizzate con la sonda RepHv hanno prodotto segnali di ibridazione in tutte le specie esaminate. Forti segnali di ibridazione interspersi su tutti i cromosomi sono stati osservati in *H. viridiflavus* e *C. austriaca*, entrambe appartenenti alla famiglia dei Colubridae (Fig. 48 e 49). Nel lamprofide *P. variabilis* un intenso segnale di ibridazione è risultato presente ed intersperso su un numero limitato di cromosomi (Fig. 50). In *V. aspis* è stato riscontrato un segnale di ibridazione caratterizzato da una minore intensità, ma che risultava intersperso sulla maggior parte dei cromosomi della specie (Fig. 51).

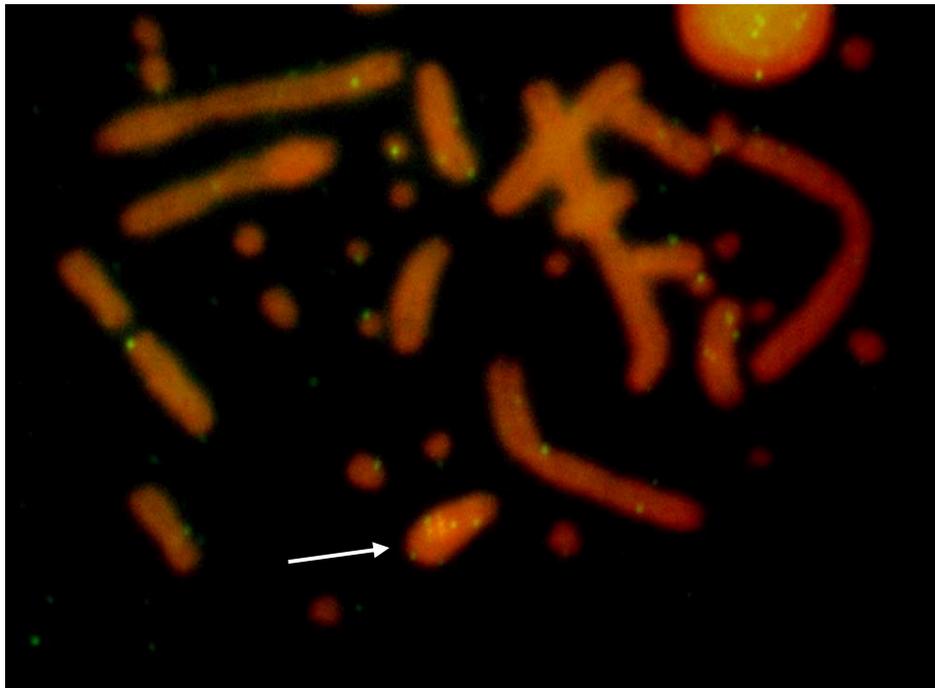


Fig. 46. FISH con sonda RL1L-240 su piastra metafasica di un esemplare femmina di *H. viridiflavus*.  
La freccia indica il cromosoma W.

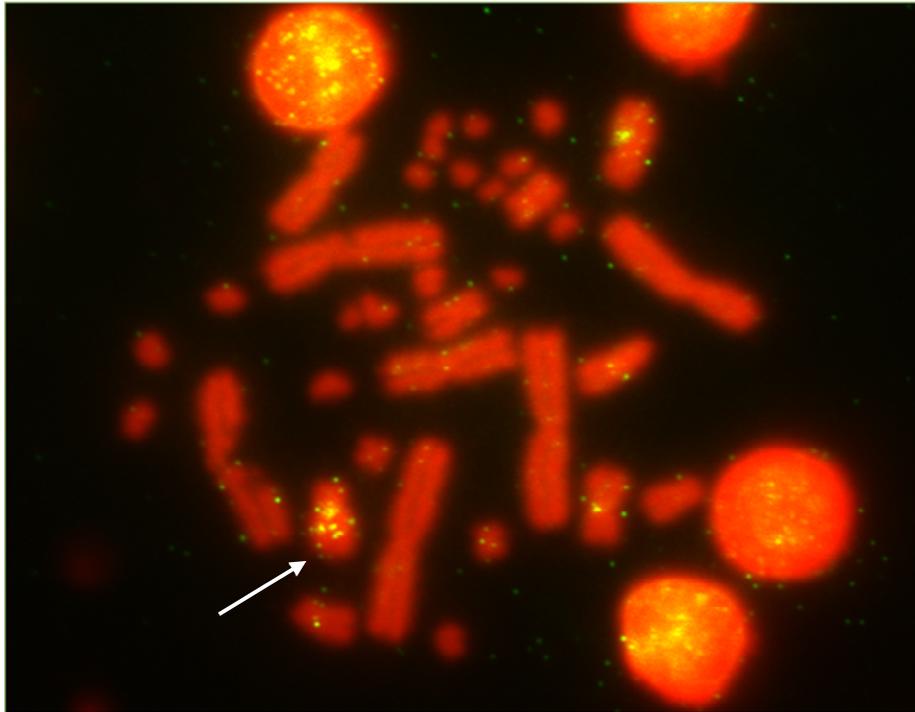


Fig. 47.: FISH con sonda RLIL-360 su piastra metafascica di un esemplare femmina di *H. viridiflavus*.  
La freccia indica il cromosoma W.

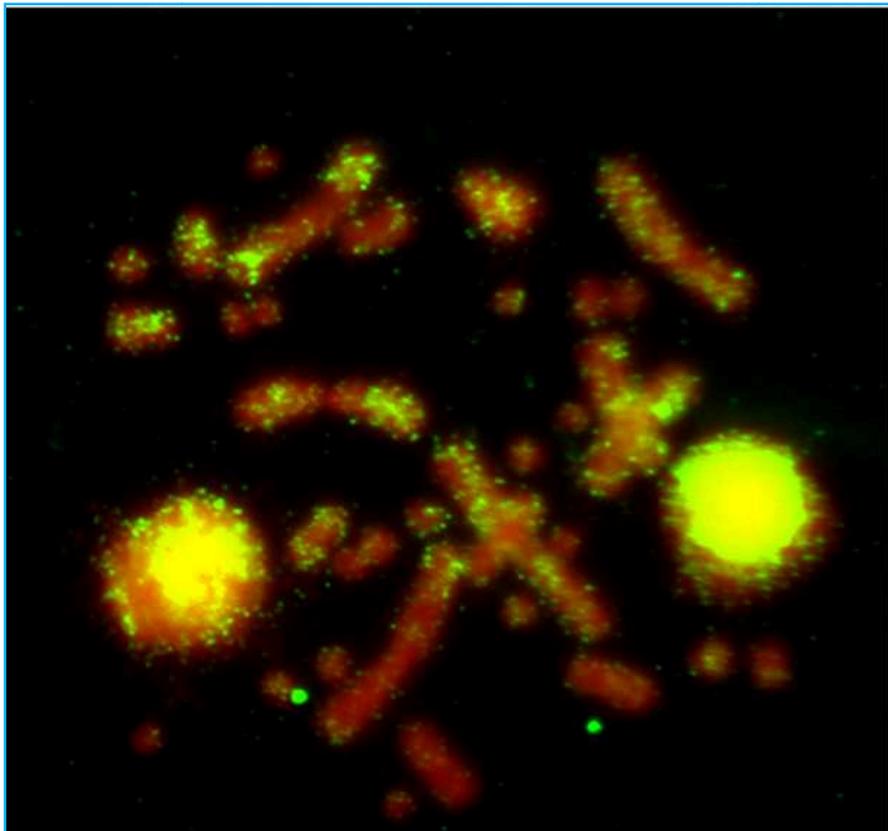


Fig. 48. FISH con sonda RepHv su piastra metafascica di *H. viridiflavus*.

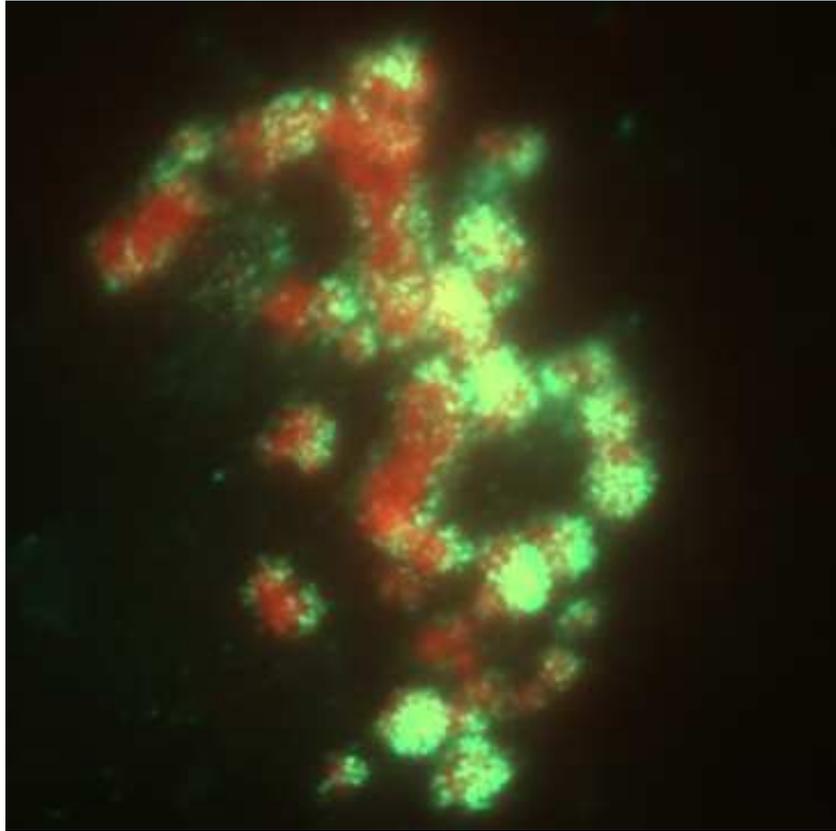


Fig. 49: FISH con sonda RepHv su piastra metafasica di *C. austriaca*.

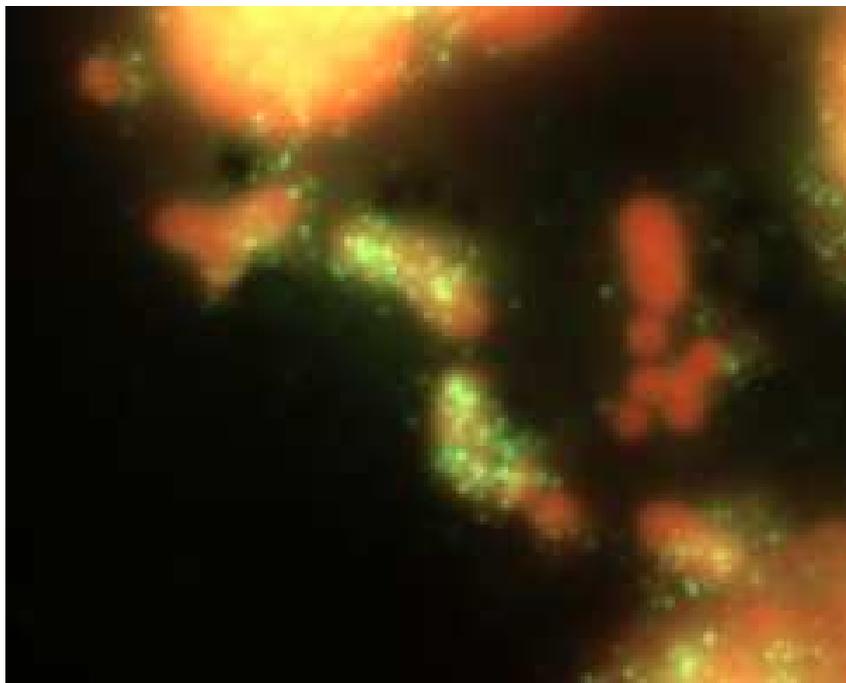


Fig. 50. FISH con sonda RepHv su piastra metafasica di *P. variabilis*.

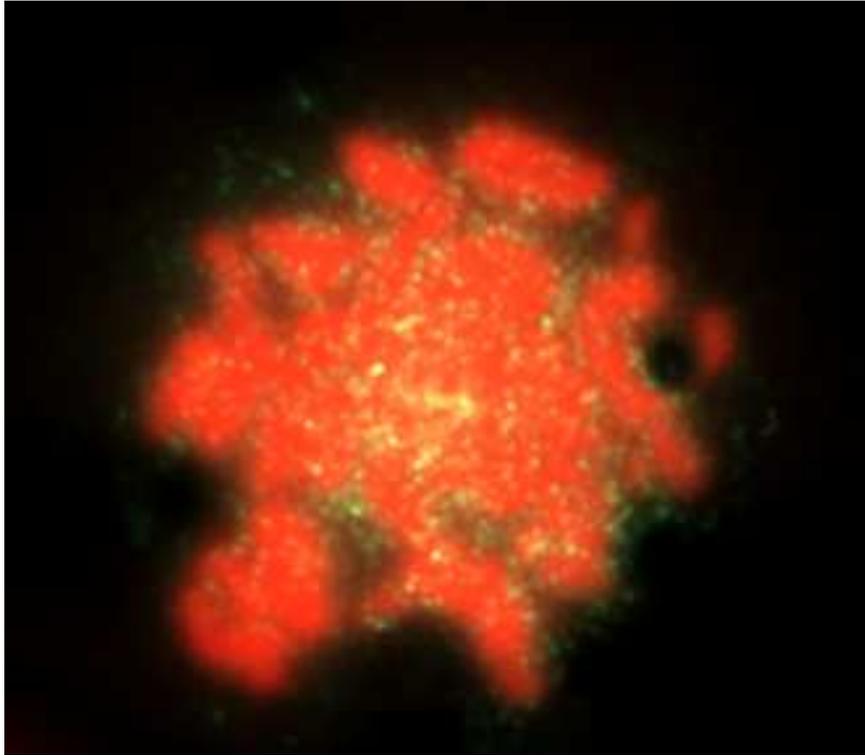


Fig. 51. FISH con sonda RepHv su piastra metafaseica di *V. aspis*.

## 4 DISCUSSIONE

### 4.1 FILOGEOGRAFIA E TASSONOMIA

I risultati ottenuti durante la realizzazione di questa ricerca hanno permesso di accumulare un ampio spettro di informazioni riguardanti il grado di diversificazione inter- ed intraspecifico esistente nelle specie studiate. L'analisi e l'interpretazione di questi dati, derivati dalla integrazione di diverse metodiche, aprono interessanti prospettive nella ricostruzione dei principali eventi che hanno caratterizzato la storia naturale delle due specie di serpenti in questione.

L'analisi molecolare ha permesso la ricostruzione di una genealogia di popolazioni e della distribuzione sul territorio dei diversi lignaggi genetici individuati. Particolarmente utile nell'individuazione di distinti cladi, di livello tassonomico e non, si è dimostrato l'utilizzo di differenti marcatori molecolari caratterizzati da una diversa velocità di evoluzione. Le prime e significative evidenze della struttura genetica esistente all'interno delle specie studiate provengono dall'analisi filogenetica condotta con il 16S, il primo e il più lento dei marcatori mitocondriali considerati, spesso adoperato in analisi di sistematica e tassonomia molecolare di livello specifico o anche di genere (vedi ad es. Odierna et al., 2002; Kapli et al., 2008; Gvoždik et al., 2010). Tale marcatore riconosce le due specie come distinti raggruppamenti monofiletici e individua all'interno del biacco due diversi cladi (E e W), contraddistinti da una differente distribuzione geografica. La distinzione di questi due cladi principali in *H. viridiflavus*, in accordo con quanto già evidenziato dai primi studi molecolari sul biacco (Nagy et al., 2002; Rato et al., 2009; Joger et al., 2010), identifica all'interno delle due specie l'esistenza di una diversa variabilità genetica. E' inoltre possibile riconoscere dalla mappa di distribuzione degli aplotipi individuati mediante l'analisi filogenetica con il 16S come la distribuzione geografica di tali aplotipi sia coerente con alcune caratteristiche geomorfologiche dell'areale di distribuzione delle due specie. In particolare *H. viridiflavus* e *H. gemonensis*, mostrano una distribuzione paraptrica, con un contatto limitato ad una ristretta zona del Carso, mentre i due principali cladi (E e W) di *H. viridiflavus*, risultano essere separati per buona parte della loro distribuzione latitudinale dalla catena appenninica (vedi Fig. 10). Ristrette aree di contatto tra questi due cladi potrebbero essere presenti nella porzione più

occidentale della pianura padana e lungo i confini regionali tra Lazio e Campania, ma attualmente non sono note zone di sovrapposizione tra queste due entità.

L'analisi filogenetica con i marcatori mitocondriali a più rapida evoluzione, Cyt-b e ND4, conferma quanto evidenziato dal 16S, suddividendo ulteriormente *H. gemonensis* e i cladi E e W di *H. viridiflavus* in una successione di aplotipi il cui differenziamento genetico appare concorde con alcune peculiari caratteristiche geografiche delle relative aree di rinvenimento (vedi di seguito).

E' importante sottolineare, inoltre, che le distanze genetiche esistenti tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* (di circa il 10% per Cyt-b e ND4), confrontate con quanto noto in letteratura per altre specie di Rettili e in particolare di altri serpenti (vedi ad es. Joger et al., 1997; Lenk et al., 2001), e con le distanze genetiche intraspecifiche riscontrate nelle due specie di studio, supportano lo status specifico di queste due entità. Questa conclusione è ulteriormente rafforzata anche dal rinvenimento di una caratteristica delezione nelle sequenze del PRLR del biacco, che appare essere una sinapomorfia di questa specie (Fig. 22).

Inoltre, la distanza genetica misurata tra i due cladi principali (E e W) di *H. viridiflavus* (di circa 4% per Cyt-b e ND4, e superiore alla variabilità genetica intraclade che risulta inferiore all'1%) indica come questi rappresentino raggruppamenti tassonomici di livello sottospecifico, tra loro geneticamente ben differenziati (Joger et al., 1997; Böhme et al., 2006). A supporto di ciò contribuisce anche la diversa risoluzione di questi due cladi derivante dalla genealogia degli aplotipi mitocondriali ricostruita mediante il metodo statistico della parsimonia (Fig. 13 e 19). Tale analisi identifica i cladi E e W del biacco come due distinte "Evolutionarily Significant Units" (ESUs) (vedi Fraser & Bernatchez, 2001).

Invece, l'attribuzione al rango di sottospecie (vedi Nagy et al., 2003; Joger et al., 2010) di alcune popolazioni meridionali (*H. v. xanthurus*) non sembra supportata dai dati molecolari raccolti nel presente studio considerando la limitata distanza genetica osservata tra queste ed altre popolazioni affini.

Il differenziamento specifico e sottospecifico sottolineato dai risultati di questo studio, e descritto da un gradiente geografico da E a W, risulta oltretutto essere condiviso con un'ampia gamma di organismi europei (Taberlet et al., 1998), comprese altre specie di Squamata (Böhme et al., 2006).

Ulteriori prove a sostegno dell'effettiva validità dei raggruppamenti tassonomici sopracitati derivano dai risultati ottenuti mediante le analisi di morfometria geometrica e quella citogenetica.

L'analisi di morfometria geometrica si è rivelata, infatti, un utile strumento nell'individuazione di un gradiente morfologico statisticamente significativo esistente tra il biacco ed il colubro dei Balcani. I risultati ottenuti dall'applicazione di tale tecnica, utilizzata per la prima volta nelle specie oggetto di studio, appaiono di particolare interesse considerando la stretta parentela esistente tra le due specie e la loro notevole somiglianza (vedi ad es. Corti et al., 2011), la quale difficilmente consentirebbe un'attendibile misurazione della diversità fenotipica esistente mediante metodologie tradizionali. L'analisi di forma relativa alla varianza dei landmarks considerati, similmente a quanto evidenziato da precedenti studi su altri serpenti europei (Llorente et al., 2012), ha fornito un'utile descrizione di differenziamento fenotipico in accordo con i risultati ottenuti dalle analisi filogenetiche molecolari (Fig. 33 e 36).

Inoltre, tale metodica ha evidenziato l'esistenza di differenze morfologiche legate ad una componente di dimorfismo sessuale in *H. viridiflavus* (Fig. 34) che non sono state invece riscontrate nel colubro dei Balcani (Fig. 35). Date le maggiori dimensioni di *H. viridiflavus* (Fig. 37), è ipotizzabile che ciò possa essere legato ad un effetto relativo alla crescita allometrica, e ulteriori analisi morfologiche sulle due specie potranno descrivere con maggiore chiarezza l'effettiva natura di tali differenze.

Un robusto supporto al valore tassonomico dei due cladi principali (E e W) identificati in *H. viridiflavus* mediante l'analisi molecolare è stato poi fornito dall'individuazione in questi ultimi di due alternativi e caratteristici citotipi, tra loro distinguibili da una differente morfologia del cromosoma sessuale W (submetacentrico nel clade E e telocentrico nel clade W) (Fig. 26 e 27). Questa diversa morfologia è probabilmente riconducibile ad un evento di riposizionamento centromerico o ad un'inversione, di cui tuttavia non è al momento possibile stabilire con certezza la polarità visto che l'unico dato cariotipico disponibile per *H. gemonensis* riguarda un singolo esemplare maschio (Matthey, 1931). Anche se l'effettivo ruolo ricoperto dai riarrangiamenti cromosomici nei processi di speciazione è attualmente ancora dibattuto (vedi ad es. White, 1978; Odierna et al., 1996; Simard et al., 2009), la differenze relative alla morfologia del W

sono, in ogni caso, considerate caratteristiche di significativo valore tassonomico negli squamati (Olmo, 1986, 2005).

L'analisi filogeografica comparata di *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* ha permesso l'identificazione di una serie di aplotipi mitocondriali che presentano una caratteristica distribuzione geografica (Fig. 21). Il colubro dei Balcani presenta un aplotipo mitocondriale ad ampia distribuzione (CG1 e MG1, vedi Risultati), rinvenibile lungo la maggior parte della costa balcanica, dal quale risultano essere derivati, spesso direttamente, gli altri aplotipi identificati nella specie (Fig. 14 e 20). Un unico altro differente aplotipo (MG5) è rinvenibile al limite settentrionale della distribuzione della specie, nell'isola di Krk, mentre la maggior parte della diversità genetica di *H. gemonensis* è stata riscontrata nella porzione più meridionale dell'areale di distribuzione della specie, dove una successione di diversi aplotipi caratterizza la Grecia settentrionale e il Peloponneso. Un ulteriore aplotipo risulta essere condiviso da esemplari dell'Eubea e dell'isola di Creta, suggerendo eventi di dispersione della specie attraverso l'Egeo (vedi paragrafo successivo). Nell'isola di Krk sono stati ritrovati due diversi aplotipi per il Cyt-b, dei quali uno condiviso anche da esemplari di vicine zone continentali e l'altro autoctono. Ciò sottolinea l'avvicinarsi di due distinti episodi di colonizzazione dell'isola.

Una situazione per alcuni aspetti analoga a quella descritta per *H. gemonensis* riguarda il clade E di *H. viridiflavus*, con un aplotipo (CE1 e ME1, vedi Risultati) ampiamente distribuito lungo tutta la costa adriatica italiana che si spinge fino a porzioni occidentali della pianura padana e in Friuli-Venezia Giulia (Fig. 21). Dall'aplotipo ME1 risultano essere derivati una serie di aplotipi affini (Fig. 13 e 19), presenti in diversi settori alpini e sub-alpini e nel meridione dove si concentra una rilevante porzione della diversità genetica della specie. Più diversificati filogeneticamente sono due distinti aplotipi meridionali, presenti rispettivamente sull'Appennino meridionale (ME10) campano e in Sicilia (ME9).

Il clade W è invece geneticamente meno diversificato, con un aplotipo ad ampia distribuzione (CW1 e MW1, vedi Risultati) e 2-3 aplotipi affini derivati e geograficamente molto localizzati.

Sia per *H. gemonensis* sia per *H. viridiflavus* gli aplotipi maggiormente distribuiti risultano quindi aplotipi parentali dai quali, probabilmente a seguito di distinti episodi di colonizzazione e successivi periodi di isolamento, si sono differenziati aplotipi

derivati, che risultano essere associati a particolari caratteristiche geomorfologiche del territorio.

#### **4.1.1 TEMPI E PROCESSI DI DIVERSIFICAZIONE**

I risultati ottenuti dall'analisi filogeografica comparata del biacco e del colubro dei Balcani permettono di avanzare un'ipotesi riguardo ai processi, e ai relativi tempi di diversificazione, che hanno caratterizzato la storia evolutiva di queste due specie.

Il Cyt-b è tra i marcatori mitocondriali più frequentemente utilizzati per approcci di orologio molecolare, e per diverse specie di Rettili è stato ad esso associato un tasso di evoluzione di circa il 2% per milione di anni (vedi ad es. Carranza et al., 2000; Paulo, 2001; Pinho et al., 2006).

Più in particolare, un buon numero di recenti studi di filogenesi molecolare su diverse specie di serpenti, hanno misurato un tasso di evoluzione per questo marcatore compreso in un intervallo che va da circa 1,5% a circa 2,5% per milione di anni (vedi ad. es. Lenk et al., 2001; Nagy et al., 2003; Guicking et al., 2006, 2009; Ursenbacher et al., 2006). Prendendo in considerazione tale intervallo, e facendo riferimento alle distanze genetiche osservate tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* (di circa 10% per Cyt-b e ND4), per i quali è quindi ipotizzabile un simile tasso di evoluzione, l'evento di speciazione tra il biacco e il colubro dei Balcani è da collocarsi tra circa 6,7 e 4 milioni di anni fa, tra la fine del Miocene (Messiniano) e l'inizio del Pliocene (Zancleano). Questa datazione inserirebbe il differenziamento specifico tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* in un complesso contesto paleobioclimatico. La transizione Messiniano-Zancleano è, infatti, caratterizzata da importanti eventi climatici e geologici il più imponente dei quali è la cosiddetta crisi di salinità del Messiniano (Hsu et al., 1973), evento di vasta portata probabilmente scaturito da una complessa combinazione di fattori glacio-eustatici e tettonici (Krijgsman et al., 1999). I drastici cambiamenti ambientali avvenuti tra Miocene e Pliocene ebbero un forte impatto sulla storia evolutiva di diversi organismi e in particolare dati paleontologici evidenziano come proprio nel Miocene sia avvenuta una importante radiazione dei Colubridae (Rage, 1987; Gasc et al., 1997).

Facendo riferimento al tasso di mutazione precedentemente stimato per Cyt-b e ND4 e alle distanze genetiche osservate per i diversi cladi individuati nelle due specie, i processi di diversificazione intraspecifici che hanno plasmato la diversità genetica

attualmente osservabile in *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* avrebbero avuto origine nel Quaternario. E' facile ipotizzare in tal senso che con l'alternanza di periodi glaciali ed interglaciali le due specie siano andate incontro a ripetute contrazioni e ri-espansioni dei rispettivi areali di distribuzione a partire da distinti rifugi glaciali (Fig. 52).

Tale ipotesi è oltretutto supportata dai dati paleontologici che testimoniano la presenza di queste specie a latitudini dove non risultano più presenti (Hebel & Assmann, 2010). In particolare, per *H. viridiflavus*, per il quale sono disponibili un maggior numero di fossili di sicura attribuzione, sono noti reperti provenienti dall'Austria, Germania, Polonia e Repubblica Ceca (Szyndlar & Böhme, 1993; Ivanov, 1997). Tali aree, furono quindi con tutta probabilità colonizzate dal biacco durante i periodi più caldi del Pleistocene, ma durante i periodi glaciali la distribuzione della specie si restrinse alla penisola italiana (Joger et al., 2010).

Durante i periodi glaciali, la presenza di distinti rifugi in Europa meridionale è nota in particolare per tre aree, la Penisola iberica, l'Italia e la penisola balcanica, ulteriormente suddivisibili in una serie di sub-rifugi tra loro variamente interconnessi (vedi ad es. Böhme et al., 2006; Hebel & Assman, 2010; Feliner, 2011).

Dato tale scenario, per *H. gemonensis* è ipotizzabile un rifugio glaciale localizzato in penisola balcanica (Fig. 52), dal quale si sarebbe successivamente espanso l'aplotipo attualmente più distribuito (MG1, vedi Risultati), ed una serie di sub-rifugi in Grecia nord-orientale e nel Peloponneso che spiegherebbero la maggiore diversità genetica riscontrata nella specie in queste regioni. Inoltre, come già in parte evidenziato da altri studi (Kyriazi et al., 2013), la colonizzazione di Creta sarebbe avvenuta nel Pleistocene medio a seguito di un fenomeno di dispersione attraverso l'Egeo.

Per quanto riguarda il biacco, i due principali cladi (E e W) si sarebbero originati in Italia a partire da due distinti rifugi glaciali, rispettivamente ad est e ad ovest della catena appenninica (Fig. 52). La maggiore diversità del clade E è da mettere in relazione all'isolamento di diverse popolazioni in una serie di sub-rifugi localizzabili in diversi settori alpini e sub-alpini, lungo l'Appennino meridionale e in Sicilia (Fig. 52). Per di più, è interessante notare come emerga una netta similitudine tra *H. gemonensis* e il clade E di *H. viridiflavus*, dato che per entrambi, una parte consistente della diversità genetica intraspecifica rilevata in questo studio appare essere in relazione a rilievi montuosi di basse e simili latitudini (rispettivamente nel Peloponneso e nell'Appennino meridionale).

D'altro canto, la bassa diversità genetica riscontrata nel clade W di *H. viridiflavus* è probabilmente correlata alla presenza di un unico rifugio glaciale e ad eventi di rapida colonizzazione di Francia meridionale e Spagna settentrionale e dell'arcipelago toscano e del blocco sardo-corso (Fig. 52).

Date le circostanze ipotizzate, risulta facile immaginare che la speciazione tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* e i successivi processi di diversificazione intraspecifica siano stati eventi allopatrici, e che l'attuale distribuzione parapatrica delle due specie (e dei cladi E e W del biacco) sia un effetto di colonizzazioni avvenute in seguito a tali eventi.



Fig. 52. Ipotesi di diversificazione di *Hierophis* sp. I cerchi rappresentano rifugi glaciali e le frecce le rotte di espansione di diversi lignaggi genetici. In arancione e rosso *H. gemonensis*, in blu e in verde rispettivamente i cladi E e W di *H. viridiflavus*.

## 4.2 SEQUENZE RIPETUTE

Durante la realizzazione di questa ricerca sono state isolate tre diverse sequenze ripetute intersperse, le quali sebbene non abbiano contribuito a fornire ulteriori informazioni sulla tassonomia e la filogeografia delle specie oggetto di studio, si sono rivelate interessanti spunti di conoscenza riguardo la genomica di questi animali e, più in generale, dei serpenti.

Due delle sequenze ripetute isolate, RL1L-240 e RL1L-360, appaiono essere tra loro correlate, condividendo un tratto 5' di circa 100 cb (chiamato CTL1L) con un elemento ripetuto trasponibile non-LTR della famiglia L1 di altre due specie di Squamata (Fig. 39), *Anolis carolinensis* (Piskurek et al., 2009) e *Lacerta agilis* (GenBank: DQ117995, dati non pubblicati) che appartengono a due diverse famiglie di Sauri, rispettivamente, Dactyloidae e Lacertidae (vedi Pyron et al., 2013). Inoltre, entrambe queste sequenze, riscontrate esclusivamente nel genere *Hierophis*, sono state localizzate sul cromosoma sessuale W di *H. viridiflavus* (Fig. 46 e 47). Queste evidenze suggeriscono che RL1L-240 e RL1L-360 possano avere avuto una comune genesi a partire da eventi di trasposizione di un elemento L1 di antica origine negli Squamata. Anche se questo elemento risulta essere attivo nei Sauri (Piskurek et al., 2009) esso è probabilmente degenerato, almeno parzialmente nei Colubridae, dando origine a sequenze di diversa natura. Gli elementi trasponibili costituiscono una importante componente del genoma eucariotico, sia quantitativamente, sia qualitativamente per la loro mobilità e capacità di amplificazione nel DNA ospite (vedi ad es. Kidwell & Lisch, 2001; Kazazian, 2004; Biemont & Vieira, 2006). In aggiunta è noto che le quantità e i livelli di attività degli elementi trasponibili sono caratteristiche che possono presentare un ampio spettro di variazione tra i Vertebrati e diverse linee evolutive sono caratterizzate da una diversa presenza e struttura di questi elementi (vedi Kordis, 2010). Nelle specie oggetto di studio la limitata quantità genomica di queste sequenze (circa lo 0,6% del genoma di *H. viridiflavus*) e la loro localizzazione sul cromosoma W suggeriscono che il trasferimento e la successiva trasposizione dell'elemento L1 originale nel genoma dei colubridi, ebbe luogo preferenzialmente in diverse regioni di tale cromosoma. In seguito, i processi di degenerazione trasformarono queste sequenze in componenti dell'eterocromatina W-associata. E' nota, infatti, l'esistenza in diversi gruppi di Vertebrati di sequenze ripetute prevalentemente o esclusivamente associate ai

cromosomi sessuali, implicate nei processi di evoluzione e differenziamento di tali elementi (Subramanian et al., 2003; Matsubara et al., 2006).

La terza sequenza, Rep-Hv, non ha mostrato significative identità con nessuna sequenza depositata in rete, configurandosi come un elemento ripetuto intersperso attualmente sconosciuto. Ciò non sorprende in quanto una elevata quantità di elementi ripetuti negli Squamata risulta ancora non classificata (Castoe et al., 2011). In contrasto con quanto evidenziato per le due sequenze descritte precedentemente, Rep-Hv risulta essere presente in diverse specie appartenenti al vasto raggruppamento tassonomico dei Colubroidea. Inoltre, la presenza di questa sequenza sembra seguire nel genoma dei Colubroidea un diverso andamento in differenti linee evolutive. Nelle specie esaminate appartenenti alla famiglia dei Colubridae Rep-Hv rappresenta circa il 2-3% del genoma (Fig. 44 e 45) e risulta essere localizzata sulla maggior parte dei cromosomi (Fig. 48 e 49). Nei Lamprophiidae, nonostante tale sequenza rappresenti una simile porzione genomica (circa 2% del genoma di *M. monspessulanus*, vedi Fig. 45) essa è stata localizzata solo su un limitato numero di cromosomi di *P. variabilis* (Fig. 50). In *V. aspis* la sequenza Rep-Hv è risultata presente sulla maggior parte dei cromosomi (Fig. 51), rappresentando però una porzione sensibilmente inferiore del genoma della specie (circa lo 0,5%, vedi Fig. 45) rispetto a quanto riscontrato nelle altre famiglie analizzate. Anche l'analisi e l'interpretazione di questi dati non sorprende in considerazione del fatto che in diverse famiglie di serpenti è stata rinvenuta una rimarcabile differenza nel contenuto genomico di sequenze ripetute trasponibili, suggerendo l'esistenza di diverse tendenze evolutive in differenti gruppi tassonomici (Castoe et al., 2011). Nonostante nella presente analisi si sia proceduto ad una prima caratterizzazione delle sequenze ripetute isolate, ulteriori e più approfonditi studi sono necessari per comprendere l'origine, la natura e le eventuali funzioni di tali elementi.

## 5 CONCLUSIONI

L'unione di dati provenienti dall'analisi molecolare e da quella di morfometria geometrica conferma la validità dello status specifico di *H. viridiflavus* e *H. gemonensis*, che risultano inoltre caratterizzate da un'elevata diversità genetica intraspecifica correlabile con la complessità geomorfologica dei rispettivi areali di distribuzione. In particolare, *H. viridiflavus* presenta due cladi principali, uno orientale (clade E) ed uno occidentale (W), separati dalla dorsale appenninica, che si configurano come dei raggruppamenti tassonomici almeno di livello sottospecifico (evidenze supportate da dati molecolari e citogenetici). Tra questi, il clade E è geneticamente più diversificato, soprattutto in prossimità di settori montani alpini e sub-alpini e lungo l'Appennino meridionale. Il colubro dei Balcani è invece una specie monotipica che tuttavia mostra una notevole diversità genetica intraspecifica, principalmente concentrata nella porzione meridionale del suo areale di distribuzione. Facendo riferimento alle datazioni della divergenza degli aplotipi, calcolate con l'orologio molecolare, e grazie alla loro correlazione con eventi geologici, paleoclimatici e biogeografici, l'evento di speciazione tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* è stato collocato tra la fine del Miocene e l'inizio del Pliocene. Successivamente, nel Quaternario, l'alternanza di periodi glaciali ed interglaciali ha provocato ripetute contrazioni e ri-espansioni dei relativi areali di distribuzione (a partire da una serie di distinti rifugi glaciali) generando l'elevata diversità intraspecifica osservata nelle specie studiate.

Quindi, la speciazione tra *H. viridiflavus* e *H. gemonensis* e i successivi processi di diversificazione intraspecifica sono stati probabilmente eventi allopatrici e l'attuale distribuzione paraptrica delle due specie (e dei cladi E e W del biacco) sono un effetto di colonizzazioni avvenute in seguito a tali eventi

Infine, durante la realizzazione di questo studio sono state isolate tre nuove sequenze ripetute intersperse di DNA. Due di queste sequenze (RL1L-240 e RL1L-360), probabilmente aventi una comune origine, sono correlate ad un elemento trasponibile non-LTR della famiglia L1 di altri squamati e sono state localizzate sul cromosoma sessuale W di *H. viridiflavus*. La terza (Rep-Hv), che non ha esibito nessuna significativa identità con alcuna sequenza nota è stata rinvenuta in diverse famiglie appartenenti al vasto raggruppamento dei Colubroidea, nelle quali mostra una diversa organizzazione.

## **Bibliografia**

- Ashton K. G., de Queiroz A. 2001. Molecular Systematics of the Western Rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with Comments on the Utility of the D-Loop in Phylogenetic Studies of Snakes. *Molecular phylogenetics and evolution* 21:176–189.
- Avise J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489–522.
- Biémont C., Vieira C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521–524.
- Böhme M.U., Fritz U., Kotenko T., Dzukic G., Ljubisavljevic K., Tzankov N., Berendonk, T.U. 2007. Phylogeography and cryptic variation within the *Lacerta viridis* complex (Lacertidae, Reptilia). *Zoologica Scripta* 36, 119–131.
- Boulenger G.A. 1913. *The Snakes of Europe*. London, Methusen & Co. Ltd.
- Brown W.M., George M.Jr., Wilson A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:1967–1971.
- Bruner E., Costantini D. 2007. Head morphological variation in *Podarcis muralis* and *Podarcis sicula*: a landmark-based approach. *Amphibia-Reptilia* 28: 566-573.
- Bruno S., Mavigli S. 1990. *Serpenti d'Italia e d'Europa*. Guide Airone, Editoriale Giorgio Mondadori, Rozzano (MI). pp. 223.
- Burbrink F.T., Lawson R., Slowinski J. B. 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* 54:2107–2118.
- Burbrink F.T., Pyron, R.A. 2008. The taming of the skew: estimating proper confidence intervals for divergence dates. *Systematic Biology* 57:317–328.

- Burbrink F.T., Yao H., Ingrasci M., Bryson R.W., Guier T.J. Ruane S. 2011. Speciation at the Mogollon Rim in the Arizona Mountain Kingsnake (*Lampropeltis pyromelana*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60:445–454.
- Cadle J.E. 1988. Phylogenetic relationships among advanced snakes: a molecular perspective. *University of California Publication in Zoology* 119: 1–70.
- Capula M., Filippi E., Luiselli L., Trujillo J.V. 1997. The ecology of the Western Whip Snake, *Coluber viridiflavus* (Lacépède, 1789), in Mediterranean Central Italy *Herpetozoa* 10.
- Capula M., Luiselli L., Rugiero L. 2008. Variazioni della dieta in relazione allo stato di conservazione dei siti in *Hierophis viridiflavus* e *Zamenis longissimus* (Reptilia: Colubridae). *Herpetologia Sardiniae* (Claudia Corti, ed.), Edizioni Belvedere, 504 pp.
- Carranza S., Arnold E.N., Mateo J.A., Lopez-Jurado L.F. 2000. Long distance colonization and radiation in gekkonid lizards, *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae) revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 637-649.
- Chakrabarty P., Chu J., Nahar L., Sparks J.S. 2010. Geometric morphometrics uncovers a new species of ponyfish (Teleostei: Leiognathidae: Equulites), with comments on the taxonomic status of *Equula berbis* Valenciennes. *Zootaxa* 2427: 15–24.
- Chapman A.D. 2009. *Numbers of Living Species in Australia and the World* (2nd ed.). Canberra: Australian Biological Resources Study. pp. 1–80.
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657–1660.
- Cook O.F. 1906. Factors of species-formation. *Science* 23: 506–507.
- Corti C., Capula M., Luiselli L., Razzetti E., Sindaco R. 2010. *Fauna d'Italia, Reptilia* Calderini, Bologna.
- Costello M., May R., Stork N. 2013. Can we name Earth's species before they go extinct?. *Science* 339:413-416.
- Coyne J.A., Orr H.A.. *Speciation*. Sinauer Associates, Inc., Publishers; Sunderland, Massachusetts: 2004.
- Darwin C.R. 1859. *On the Origin of Species*. John Murray, London.

- Darwin C.R., Wallace A.R.. 1858. On the tendency of species to form varieties; and on the perpetuation of varieties and species by natural means of selection. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London. Zoology* 3:45-50.
- De Smet W.H.O. 1978 The chromosomes of 23 species of snakes. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* 70:85-118.
- Delaguerre J.M. 2013. Going out tonight? When insular *Hierophis viridiflavus* breaks the Whip Snakes Rules. *Acta Herpetologica* 8:47-52.
- Dobzhansky T.G. 1937. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University, New York.
- Feliner G.N. 2011. Southern European glacial refugia: A tale of tales. *Taxon*, 60:365-372.
- Ferchaud A.L., Ursenbacher S., Cheylan M., Luiselli L., Jelić D., Halpern B., Major A., Kotenko T., Keyan N., Behrooz R., Crnobrnja-Isailovic J., Tomovic L., Ghira I., Ioannidis Y., Arnal V., Montgelard C. 2012. Phylogeography of the *Vipera ursinii* complex (Viperidae): mitochondrial markers reveal an east–west disjunction in the Palaearctic region. *Journal of Biogeography* 39:1836–1847.
- Filippi E., Capula M., Luiselli L. 2004. Dietary shifts in the Western Whip Snake *Coluber viridiflavus* Lacépède, 1789, of the small Mediterranean island of Ustica. *Herpetozoa* 16.
- Fornasiero S., 2008. Effects of insularità on life history traits and on chemical communication in *Hierophis viridiflavus*: a widespread European colubrid (Reptilia: Serpentes). *Tesi di Dottorato, Università di Pisa*.
- Fornasiero S., Bresciani E., Dendi F., Zuffi M.A.L. 2007. Pheromone trailing in male European whip snake, *Hierophis viridiflavus*. *Amphibia-Reptilia* 28:555-559.
- Fornasiero S., Dendi F., Bresciani E., Cecchinelli E., Zuffi M.A.L. 2011. The scent of the others: chemical recognition in two distinct populations of the European whip snake, *Hierophis viridiflavus* *Amphibia-Reptilia* 32:39-47.
- Fraser D.J., Bernatchez L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10, 2741–2752.
- Gasc J.P., Cabela A., Crnobrnja Isailovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Martinez Rica J.P., Maurin H., Oliveira M.E., Sofianidou T. S., Veith M. & Zuiderwijk A. (eds.). 1997. *Atlas of Amphibians and*

- Reptiles in Europe. Societas Europaea Herpetologica & Muséum National d'Histoire Naturelle (IEGB/SPN), Paris, 496 pp.
- Gravlund P. 2001. Radiation within the advanced snakes (Caenophidia) with special emphasis on African opisthognath colubrids, based on mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* 72:99–114.
- Green DM, Session SK, 1991: Amphibian cytogenetics and evolution. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Guicking D., Lawson R., Joger U., Wink M.. 2006. Evolution and phylogeny of the genus *Natrix* (Serpentes: Colubridae). *Biol. J. Linn. Soc.* 87: pp. 127–143.
- Guicking D., Joger U., Wink M. 2009. Cryptic diversity in a Eurasian watersnake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR-PCR fingerprinting. *Organisms, Diversity & Evolution*. 9: 201–214.
- Gvoždik V., Jandzik D., Lymberakis P., Jablonski D., Moravec, J. 2000. Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:460-472.
- Gvoždik V., Jandzik D., Cordos B., Reháč I., Kotlík, P. 2012. A mitochondrial DNA phylogeny of the endangered vipers of the *Vipera ursinii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:1019–1024.
- Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp*, 41:95-98.
- Hebel J.C., Assmann T. (Eds.). 2010. Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology. Springer, 442 pp.
- Heimes P. 1993. *Coluber viridiflavus* Lacépède, 1789- Gellbrune Zornatter. pp. 177-198. In: Böhme W. (eds.) *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*. Band 3/I Schlangen (Serpentes) I (Typhlopidae, Boidae, Colubridae 1: Colubrinae). Aula Verlag, Wiesbaden.

- Heise P.J., Maxson L.R., Dowling H.G., Hedges S.B. 1995. Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes. *Molecular Biology and Evolution* 12:259–265.
- Hickerson M.J., Carstens B.C., Cavender-Bares J., Crandall K.A., Graham C.H., Johnson J.B. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54:291–301.
- Howell W.M., Black D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Hsü K.J., Ryan W.B.F., Cita M.B. 1973. Late Miocene desiccation of the Mediterranean. *Nature* 242:240-244.
- Ivanov M. 1997. Vývoj kenozické hadí fauny evropy. (The evolution of European Cenozoic snake fauna). In: Hladilová S (ed) Dynamics of interaction between marine and continental environments. Masaryk University, Brno, pp 59–91
- Joger U., Lenk P., Baran I., Böhme W., Heidrich P., Wink M., Ziegler T. 1997. The phylogenetic position of *Vipera barani* and *V. nikolskii* within the *Vipera berus* complex. In: *Herpetologia Bonnensis* 185-194.
- Joger U., Fritz U., Guicking D., Kalyabina-Hauf S., Nagy Z.T., Wink, M. 2007. Phylogeography of western Palaearctic reptiles: Spatial and temporal speciation patterns. *Zoologischer Anzeiger* 246:293–313.
- Joger U., Fritz U., Guicking D., Kalyabina-Hauf S., Nagy Z.T., Wink, M. 2010. Relict populations and endemic clades in Palaearctic reptiles: evolutionary history and implications for conservation. In: Hebel J.C., Assmann T. (Eds.), *Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology*. Springer, pp. 119–143.
- Kazazian H.H. Jr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626–1632.
- Kaliontzopoulou A. 2011. Geometric morphometrics in herpetology: modern tools for enhancing the study of morphological variation in amphibians and reptiles. *Basic and applied Herpetology* 25:5-32.
- Kaliontzopoulou A., Carretero M.A., Llorente G.A. 2007. Multivariate and geometric morphometrics in the analysis of sexual dimorphism variation in *Podarcis* lizards. *Journal of Morphology* 268:152-165.

- Kapli P., Lymberakis P., Poulakakis N., Mantziou G., Parmakelis A., Mylonas M. 2008. Molecular phylogeny of three *Mesalina* (Reptilia: Lacertidae) species (*M. guttulata*, *M. brevirostris* and *M. bahaeldini*) from North Africa and the Middle East: Another case of paraphyly? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:102–110.
- Kidwell M.G., Lisch D.R. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55:1–24.
- King M. 1990: Animal cytogenetics. 4. Cordata. 4. Amphibia. (eds.) John, Bauer, Kayano, Levan. Gebruder Borntraeger Berlin– Stuttgart.
- King M. 1993. *Species Evolution: The Role of Chromosomal Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kirkpatrick M. 2010. How and Why Chromosome Inversions Evolve. *PLoS Biology* 8: e1000501. doi:10.1371/journal.pbio.1000501.
- Klingenberg C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11:353–357.
- Klingenberg C.P., Marugán-Lobón J. 2013. Evolutionary Covariation in Geometric Morphometric Data: Analyzing Integration, Modularity, and Allometry in a Phylogenetic Context. *Systematic Biology* doi: 10.1093/sysbio/syt025.
- Kobel H.R. 1967. Morphometrische karyotypanalyse einiger Schlangenarten. *Genetica* 38:1–13.
- Kornilios P., Thanou E., Lymberakis P., Sindaco R., Liuzzi C., Giokas S. 2013. Mitochondrial phylogeography, intraspecific diversity and phenotypic convergence in the four-lined snake (Reptilia, Squamata). *Zoologica Scripta*. doi:10.1111/zsc.12045.
- Kraus F., Brown W.M. 1998. Phylogenetic relationships of colubroid snakes based on mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society* 122, 455–487.
- Krijgsman W., Hilgen F.J., Raf I., Sierro F.J., Wilson D.S. 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400:652–655.
- Kumar S. 2005. Molecular clocks: four decades of evolution. *Nature Reviews Genetics* 6:654–62.

- Kyriazi P., Kornilios P., Nagy Z.T., Poulakakis N., Kumlutas Y., Ilgaz C., Avci A., Gocmen B., Lymberakis P. 2013. Comparative phylogeography reveals distinct colonization patterns of Cretan snakes. *Journal of Biogeography* 40:1143-1155.
- Inger R.F., Clark P.J. 1943. Partition of the genus *Coluber*. *Copeia* 3, 141-145.
- Lawson R., Slowinski J.B., Crother B.I., Burbrink F.T. 2005. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:581–601.
- Lee M.S.Y., Scanlon J.D. 2002. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and behaviour. *Biological Reviews* 77:333–401.
- Lee Y., Collier T.C., Sanford M.R., Marsden C.D., Fofana A., Cornel A.J., Lanzaro G.C. 2013. Chromosome Inversions, Genomic Differentiation and Speciation in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* 8:e57887. doi:10.1371/journal.pone.0057887
- Lenk P., Joger U., Wink M. 2001. Phylogenetic relationships among European ratsnakes of the genus *Elaphe* Fitzinger based on mitochondrial DNA sequence comparisons. *Amphibia-Reptilia* 22: 329-339.
- Lewontin R.C. 1997. Dobzhansky's Genetics and the Origin of Species: Is it still relevant? *Genetics* 147: 351–355.
- Llorente G.A., Vidal-Garcia M., Garriga N., Carranza S., Pleguezuelos J.M., Santos X. 2012. Lessons from a complex biogeographical scenario: morphological characters match mitochondrial lineages within Iberian *Coronella austriaca* (Reptilia: Colubridae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 106: 210-223.
- Loy A., Capula M., Palombi A., Capanna E. 2001. Genetic and morphometric evidence of introgression between two species of moles (Insectivora: Talpa europaea and Talpa romana) in central Italy. *Journal of Zoology* 254 (2), 229-238.
- Macgregor H.C., Sessions S.K., Arntzen J.W. 1990. An integrative analysis of phylogenetic relationships amongst newts of the genus *Triturus* (family Salamandridae) using comparative biochemistry, cytogenetics and reproductive interactions. *Journal of Evolutionary Biology* 3:329-374.
- Manier M.K. 2004. Geographic variation in the long-nosed snake, *Rhinocheilus lecontei* (Colubridae): beyond the subspecies debate. *Biological Journal of the Linnean Society* 83:65–85.

- Matsubara K., Tarui H., Toriba M., Yamada K., Nishida-Umehara C., Agata K., Matsuda Y. 2006. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103:18190–18195.
- Matthey R. 1931. Chromosomes des reptiles. Sauriens, ophidiens, cheloniens. L'évolution de la formule chromosomiale chez les sauriens. *Rev. Suisse Zool.* 38: 117-186.
- Mayr E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 797 pp.
- Moritz C. 1994. Defining "evolutionary significant units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9:373–375.
- Nagy Z.T., Joger U., Guicking D., Wink M. 2002. Phylogeography of the European whip snake, *Coluber (Hierophis) viridiflavus* Lacépède, 1789, inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene and ISSR genomic fingerprinting. *Biota* 3:109–118.
- Nagy Z.T., Joger U., Wink M., Glaw F., Vences M. 2003. Multiple colonization of Madagascar and Socotra by colubrid snakes: evidence from nuclear and mitochondrial gene phylogenies. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270:2613–2621
- Nagy Z.T., Lawson R., Joger U., Wink M.. 2004. Molecular systematics of racers, whipsnakes and relatives (Reptilia: Colubridae) using mitochondrial and nuclear markers. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 42:223-233.
- Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Odierna G., Aprea G., Arribas O.J., Capriglione T., Caputo V., Olmo E. 1996. The karyology of the Iberian rock lizards. *Herpetologica* 52: 542–550.
- Odierna G., Aprea G., Capriglione T., Puky M. 2004. Chromosomal evidence for the double origin of viviparity in the European common lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Herpetological Journal* 14:157-160.
- Odierna G., Canapa A., Andreone F., Aprea G., Barucca M., Capriglione T., Olmo E. 2002. A Phylogenetic Analysis of Cordyliformes (Reptilia: Squamata): Comparison

- of Molecular and Karyological Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23:37-42.
- Oguiura N., Ferrarezzi H., Batistic R.F. 2010. Cytogenetics and Molecular Data in Snakes: A Phylogenetic Approach. *Cytogenetic and Genome Research* 127:128–142.
- Oliverio M., Bologna, M.A., Mariottini, P. 2000. Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* Wagler, 1830 and *Teira* Gray, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *Journal of Biogeography* 27:1403-1420.
- Olmo E. 1986. Reptilia. In: B. Johm (ed.), *Animal Cytogenetics*, 4 Chordata 3. Gebrueder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, pp. IV +100.
- Olmo E. 2005. Rate of chromosome changes in reptiles. *Genetica* 125: pp.185-203.
- Ortenburger A.I. 1928: The whip snakes and racers, genera *Masticophis* and *Coluber*. *Mem. Univ. Mich. Mus.* 1, 1-247.
- Ota H., Honda M., Chen S. L., Hikida T., Panha S., Oh H. S., Matsui M.. 2002. Phylogenetic relationships, taxonomy, character evolution and biogeography of the lacertid lizards of the genus *Takydromus* (Reptilia: Squamata): a molecular perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* 76:493-509.
- Palumbi S.R. 1996. Nucleic Acids II: the polymerase chain reaction. In Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds) *Molecular Systematics*, 2nd Edition. Sunderland, USA, 205-247.
- PAST 2002. Data analysis package, version 0.94. Øyvind Hammer, DAT Harper, Oslo.
- Paulo O.S. 2001. Phylogeography of reptiles of the Iberian Peninsula. PhD Thesis. University of London.
- Pinho C., Ferrand N., Harris D.J. 2006. Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38:266–273.
- Piskurek O, Nishihara H, Okada N. 2009. The evolution of two partner LINE/SINE families and a full-length chromodomain-containing Ty3/Gypsy LTR element in the first reptilian genome of *Anolis carolinensis*. *Gene* 441:111–118.
- Pough H.F., Andrews R.M., Cadle J.E., Crump M.L., Savitsky A.H., Wells K.D., 2004. *Herpetology*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256.
- Pyron A., Burbrink F.T., Colli G.R., Nieto Montes de Oca A., Vitt L.J., Kuczynski C. A., Wiens J.J. 2011. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular phylogenetics and evolution* 58:329–342.
- Pyron R.A., Burbrink F.T., Wiens J.J. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13:93.
- Raia P., Guarino F.M., Turano M., Polese G., Rippa D., Carotenuto F., Monti D.M, Cardi M., Fulgione D. 2010. The blue lizard spandrel and the island syndrome. *BMC Evolutionary Biology* 10:289.
- Rage J.C. 1987. Fossil history. In: *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, p. 51-76. Seigel R.A., Collins J.T., Novak S.S., Eds, New York, Macmillan Publishing Company. J.T., Novak, S.S., Eds, New York, Macmillan Publishing Company.
- Rato C., Zuffi M.A.L., Corti C., Fornasiero S., Gentili A., Razzetti E., Scali S., Carretero M.A., Harris D.J.. 2009. Phylogeography of the European Whip Snake, *Hierophis viridiflavus* (Colubridae), using mtDNA and nuclear DNA sequences. *Amphibia–Reptilia* 30:283–289.
- Rieppel O. 1988. A review of the origin of snakes. *Evolutionary Biology* 22:37–130.
- Rohlf F.J. 2006. TpsDigVer 2.10.digitalized landmarks and outlines. Dept of Ecology and Evolution, State Univ of New York at Stony Brook
- Rohlf F.J., Slice D.E. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition. *Systematic Biology* 39 :40-59.
- Rohlf F.J., Marcus L.F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8:129-132.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Sahar E., Latt S.A. 1980. Energy Transfer and binding competition between Dyes used to enhance staining differentiation in metaphase chromosomes. *Chromosoma* 79:1-28.
- Saambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Lab Press, New York. 1626 pp.

- Santos X., Roca J., Pleguezuelos J.M., Donaire D., Carranza S.. 2008. Biogeography and evolution of the Smooth snake *Coronella austriaca* (Serpentes: Colubridae) in the Iberian Peninsula: evidence for Messinian refuges and Pleistocenic range expansions. *Amphibia-Reptilia* 29:35-47.
- Schatti B. 1986a. Morphological evidence for a partition of the genus *Coluber* (Reptilia: Serpentes). In: Rocek, Z. (ed.), *Studies in Herpetology*. Charles University, Prague, pp. 235-238.
- Schatti B. 1986b. Morphologie und Systematik von *Coluber algirus* und *C. hippocrepis* (Reptilia: Colubridae). *Bonner Zoologische Beiträge* 37:281-293.
- Schatti B. 1987. The phylogenetic significance of morphological characters in the Holarctic racers of the genus *Coluber*. *Amphibia-Reptilia* 8, 401-418.
- Schatti B. 1988a. Systematics and phylogenetic relationships of *Coluber florulentus* Geoffroy 1827 (Reptilia, Serpentes). *Tropical Zoology* 1:95-116.
- Schatti B. 1988b. Systematik und Evolution der Schlangengattung *Hierophis* Fitzinger, 1843. Dissertation, Zurich University, Zurich, 50 pp.
- Schatti B., Utiger U. 2001. Hemerophis, a new genus for *Zamenis socotrae* Gunther, and a contribution to the phylogeny of Old World racers, whipsnakes and related genera (Reptilia: Squamata: Colubrinae). *Revue Suisse de Zoologie* 108:919-948.
- Schätti B., Vanni S. 1986. Intraspecific variation in *Coluber viridiflavus* Lacépède, 1789, and validity of its subspecies (Reptilia, Serpentes, Colubridae). *Revue Suisse de Zoologie* 93:219-232.
- Sessions S.K., Kezer J. 1987. Cytogenetic evolution in the genus *Aneides*. *Chromosoma* 95:17-30.
- Simard F., Ayala D., Kamdem G.C., Pombi M., Etouana J., Ose K., Fotsing J.M., Fontenille D., Besansky N.J., Costantini C. 2009. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecology* 9: 17-45.
- Sokolov E.P. 2000. An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissue. *Journal of Molluscan Studies* 66:573-575.
- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517.

- Subramanian S., Mishra R.K., Singh L. 2003. Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics*. 19:681-685.
- Sumner A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304-306.
- Szyndlar Z., Böhme W. 1993. Die fossilen schlangen Deutschlands: geschichte der faunen und ihrer erforschung. *Mertensiella* 3:381–431.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson, J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7:453–464.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., FilipSKI A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tautz D., Renz M. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Analytical Biochemistry* 132:14-19.
- Tjarks H.H. 2009. Geometric Morphometric Analysis of Head Shape In *Thamnophis elegans*. Ph.D. Thesis. California State University, Chico.
- Townsend T.M., Alegre R.E., Kelley S.T., Wiens J.J., Reeder T.W. 2008. Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: An example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and evolution* 47:129-142.
- Ursenbacher S., Carlsson M., Helfer V., Tegelström H., Fumagalli L. 2006. Phylogeography and pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 15:3325–3437.
- Utiger U., Schätti B. 2004. Morphology and phylogenetic relationships of the Cyprus racer, *Hierophis cypriensis*, and the systematic status of *Coluber gemonensis gyarosensis* Mertens (Reptilia: Squamata: Colubrinae). *Revue Suisse de Zoologie* 3:225-238.
- Utiger U., Helfenberg N., Schätti B., Schmidt C., Ruf M., Ziswiler V. 2002. Molecular systematics and phylogeny of Old and New World ratsnakes *Elaphe* auct., and related genera (Reptilia, Squamata, Colubridae). *Russian Journal of Herpetology* 9:105-124.

- Valakos E.D., Pafilis P., Sotiropoulos K., Lymberakis P., Maragou P., Foufopoulos J. 2008. The amphibians and reptiles of Greece. Chimaira, Frankfurt, 463 pp.
- Vanni S., Nistri A. 2006. *Hierophis viridiflavus*. In: Sindaco R., Doria G., Razzetti E., Bernini F. 2006. Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia/Atlas of Italian Amphibians and Reptiles. Societas Herpetologica Italica. Edizioni Polistampa, Firenze. pp. 792.
- Vanni S., Nistri A., Lanza B., Bressi N. 2011. *Hierophis gemonensis* (Laurenti, 1768) pp. 505-509-. In: Corti C., Capula M., Luiselli L., Razzetti E., Sindaco R. (eds.), Fauna d'Italia vol. 45, Reptilia. Calderini Ed., Bologna.
- Vanni S., Zuffi M.A.L.. 2011. *Hierophis viridiflavus* (Laurenti, 1768) pp. 510-517. In: Corti C., Capula M., Luiselli L., Razzetti E., Sindaco R. (eds.), Fauna d'Italia vol. 45, Reptilia. Calderini Ed., Bologna.
- Vidal N., Rage J.C., Couloux A., Hedges S.B., 2009. Snakes (Serpentes). In: Hedges, S.B., Kumar, S. (Eds.), The Timetree of Life. Oxford University Press, New York, pp. 390–397.
- White M.J.D. 1978. Modes of Speciation. W. H. Freeman, San Francisco, 455 pp.

## **Ringraziamenti**

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Gaetano Odierna e il Prof. Fabio M. Guarino. Lavorare con loro è stato per me un vero privilegio e senza il loro aiuto la realizzazione di questa ricerca non sarebbe stata possibile.

Un sentito ringraziamento va poi a tutti gli specialisti dei vari settori che in diverso modo hanno dato un contributo fondamentale alla realizzazione di questo progetto: (in ordine alfabetico) Andreone Franco, Bressi Nicola, Carretero Miguel A., Cheylan Marc, Dall'Asta Andrea, Loy Anna, Lymberakis Petros, Maio Nicola, Mazzotti Stefano, Petraccioli Agnese, Picariello Orfeo L.A., Tomovic Ljiljana, Vignoli Leonardo, Zuffi Marco A.L.

Infine non posso non menzionare Antonella, Giovanni, Luigi, Maurizio e Roberta, con i quali ho condiviso questa esperienza.