

Figure S1. Complete alignment of Spit-Uni1/2 products: nine EF1- α alleles cloned from two *Philaenus italosignus* (Pi1 and Pi2) and two *P. spumarius* (Ps3 and Ps4) specimens collected during this study in Tuscany (Italy). The homologous sequences of the two alleles of *P. spumarius* PSPU_08 (GCA_018207615.1) and of the only allele of *P. italosignus* (JF309079) currently available in the Genbank database, were included for comparative purposes as PsRef1, PsRef2 and PiRef1, respectively. The exon region of the EF1- α alleles is underlined meanwhile, within the intron region, the positions of the *P. italosignus* specific qPCR assay primers, Pital_348F and Pital_465R, are highlighted in black and gray, respectively. The "*" character indicates positions that are fully conserved.

PiRef-1	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----TACT	55
Pi1-1	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----AACT	55
Pi1-2	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----AACT	55
Pi2-1	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----TACT	55
Pi2-2	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----AACT	55
PsRef-1	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----TACT	55
PsRef-2	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----TACT	55
Ps3-1	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCGAGAAGTAAGTTGACTATAGCCTACT</u>	60
Ps3-2	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTATAGCCTACT</u>	60
Ps4-1	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----TACT	55
Ps4-2	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----TACT	55
Ps4-3	<u>AAACGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGAAGCCCCAAGAAGTAAGTTGACTA</u> -----TACT	55
	*****	***
PiRef-1	AGCAGAATAAAATTTGAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATATAGG---CGTAATAT	112
Pi1-1	AGCGGAATAAAATTTGAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATATATAGG-CCTAATAT	114
Pi1-2	AGCGGAATAAAATTTGAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATATATAGG-CCTAATAT	114
Pi2-1	AGCGGAATAAAATTTGAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATATAGG---CGTAATAT	112
Pi2-2	AGCGGAATAAAATTTGAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATATATAGG-CCTAATAT	114
PsRef-1	AGCGGAATAAAATTTAAATGAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATA-----TATAATAT	108
PsRef-2	AGCGGAATAAAATTTAAATGAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATA-----TATAATAT	108
Ps3-1	AGCGGAATAAAATTTAAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATA-----TAT	108
Ps3-2	AGCGGAATAAAATTTAAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATA-----TAT	108
Ps4-1	AGCGGAATAAAATTTAAATCAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATA-----TATTATAT	108
Ps4-2	AGCGGAATAAAATTTAAATGAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATATATAGCCTATAATAT	115
Ps4-3	AGCGGAATAAAATTTAAATGAACTCCTATAAAAGCGAGTAACATATATAGCCTATAATAT	115
	*** *****	***
PiRef-1	AATAGCTGATTTACCCATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACTCGTGTAGGTTGT	172
Pi1-1	AACAGCTGATTTACCCATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	174
Pi1-2	AACAGCTGATTTACCCATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	174
Pi2-1	AATAGCTGATTTACCCATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACTCGTGTAGGTTGT	172
Pi2-2	AACAGCTGATTTACCCATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	174
PsRef-1	AATAGCTGATTTACCAATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	168
PsRef-2	AATAGCTGATTTACCAATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	168
Ps3-1	ATTAGCTGATTTACCAATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGG	168
Ps3-2	AATAGCTGATTTACCAATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGG	168
Ps4-1	AATAGCTGATTTACCAATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	168
Ps4-2	AATAGCTGATTTACCAATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	175
Ps4-3	AATAGCTGATTTACCAATCATCTGTAATACATAAAACATAGCCTAACCCGTGTAGGTTGT	175
	* *****	
PiRef-1	AGTTCGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAATTTCTTGTGAAGTAGATTTTTTTA	232
Pi1-1	AGTTCGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAATTTCTTGTGAAGTAGA-TTTTTTTA	233
Pi1-2	AGTTCGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAATTTCTTGTGAAGTAGA-TTTTTTTA	233
Pi2-1	AGTTCGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAATTTCTTGTGAAGTAGATTTTTTTA	232
Pi2-2	AGTTCGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAATTTCTTGTGAAGTAGA-TTTTTTTA	233
PsRef-1	AGTTTGGGGTTATGTTTACAACCTCA-----TTTT	198
PsRef-2	AGTTTGGGGTTATGTTTACAACCTCA-----TTTT	198
Ps3-1	AGTTAGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAAATTCTTGTAAAGTTGA--TTTTTT	226
Ps3-2	AGTTAGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAAATTCTTGTAAAGTTGA--TTTTTT	226
Ps4-1	AGTTTGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAAATTCTTGTGAAGTTGA--TTTTTT	226

Ps4-2	AGTTTGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAATTTCTTGTGAAGTTGA-TTTTTTT	234
Ps4-3	AGTTTGGGGTTATGTTTACAACCTCAATCGTTATAATTTCTTGTGAAGTTGA-TTTTTTT *****	234
PiRef-1	AAATTTGAGTTACAGAACTAATGTATGCTATAATATGACGTTATATTTGC-TTTGAGGTT	291
Pi1-1	AAATTTGAGTTACAGAACTAATGTATGCTATAATATGACGTTATATTTGC-TTTGAGGTT	292
Pi1-2	AAATTTGAGTTACAGAACTAATGTATGCTATAATATGACGTTATATTTGC-TTTGAGGTT	292
Pi2-1	AAATTTGAGTTACAGAACTAATGTATGCTATAATATGACGTTATATTTGC-TTTGAGGTT	291
Pi2-2	AAATTTGAGTTACAGAACTAATGTATGCTATAATATGACGTTATATTTGC-TTTGAGGTT	292
PsRef-1	TAATTTGAGTTAAAGAACTAATATATGCTATAATATGACGTTATATTTGCTTTTGAGGTT	258
PsRef-2	TAATTTGGGTTAAAGAACTAATATATGCTATAATATGACGTTATATTTGCTTTTGAGGTT	258
Ps3-1	TAATTTGAGTTACAGAACTAATATATGCTATAATATGACGTTATATTTGC-TTTAAGGTT	285
Ps3-2	TAATTTGAGTTACAGAACTAATATATGCTATAATATGACGTTATATTTGC-TTTAAGGTT	285
Ps4-1	TAATTTGAGTTAAAGAACTAATATATGCTATAATATGACGTTATATTTGCTTTTGAGGTT	286
Ps4-2	TAATTTGAGTTACAGAACTAATATATGCTATAATATGATGTTATATTTGC-TTTGAGGTT	293
Ps4-3	TAATTTGAGTTACAGAACTAATATATGCTATAATATGATGTTATATTTGC-TTTGAGGTT *****	293
PiRef-1	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAA-----TCA-TATATTTATTCAAATTTA	334
Pi1-1	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAA-----TCAATATATTTATTCAAATTTA	336
Pi1-2	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAA-----TCAATATATTTATTCAAATTTA	336
Pi2-1	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAA-----TCAATATATTTATTCAAATTTA	335
Pi2-2	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAA-----TCAATATATTTATTCAAATTTA	336
PsRef-1	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAAATACAACCTTTTATCATCAATATATTTATTTAAATTTA	318
PsRef-2	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAAATACAACCTTTTATCATCAATATATTTATTTAAATTTA	318
Ps3-1	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAAATACAACCTTTTATCATGAATATATTTATTTAAATTTA	345
Ps3-2	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAAATACAACCTTTTATCATGAATATATTTATTTAAATTTA	345
Ps4-1	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAAATACAACCTTTTATCGTCAATATATTTATTTAAATTTA	346
Ps4-2	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAAATACAATCTTTTATCATCAATATATTTATTTAAATTTA	353
Ps4-3	ATAAACTGTAGGCCCTATGTAAATACAATCTTTTATCATCAATATATTTATTTAAATTTA *****	353
PiRef-1	AAGA-GATCTATTCGTTTAACTTCGGAATTATTCATAGCCCTATATATTCGTAAAATAAT	393
Pi1-1	AAGA-GATCTATTCGTTTAACTTCGGAATTATTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	395
Pi1-2	AAGA-GATCTATTCGTTTAACTTCGGAATTATTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	395
Pi2-1	AAGA-GATCTATTCGTTTAACTTCGGAATTATTCATAGCCCTATATATTCGTAAAATAAT	394
Pi2-2	AAGA-GATCTATTCGTTTAACTTCGGAATTATTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	395
PsRef-1	AAGCTGATCTATTCGTTTAACTTCGGAACATTTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	378
PsRef-2	AAGCTGATCTATTCGTTTAACTTCGGAACATTTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	378
Ps3-1	AAGCTAATCTATTCGTTTAACTTCGGAACATTTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	404
Ps3-2	AAGCTAATCTATTCGTTTAACTTCGGAACATTTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	404
Ps4-1	AAGCTGATCTATTCGTTTAACTTCGGAACATTTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	406
Ps4-2	AAGCTGATCTATTCGTTTAACTTCGGAACATTTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT	413
Ps4-3	AAGCTGATCTATTCGTTTAACTTCGGAACATTTCGATAGCCCTATATCTTCGTAAAATAAT ***	413
PiRef-1	TACTATTTCAATTATTAATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG	453
Pi1-1	TAATATTTCAATTATTAATTTCTCCATTATAGAATA--ATTAATAACTTCCAAATTATTTG	453
Pi1-2	TAATATTTCAATTATTAATTTCTCCATTATAGAATA--ATTAATAACTTCCAAATTATTTG	453
Pi2-1	TACTATTTCAATTATTAATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG	454
Pi2-2	TAATATTTCAATTATTAATTTCTCCATTATAGAATA--ATTAATAACTTCCAAATTATTTG	453
PsRef-1	TAATATTTCAATTAGTCATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG	438
PsRef-2	TAATATTTCAATTAGTCATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG	438
Ps3-1	TAATATTTCAATTAGTCATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG	464
Ps3-2	TAATATTTCAATTAGTCATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTCG	464
Ps4-1	TAATATTTCAATTAGTCATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG	466
Ps4-2	TAATATTTCTTTAGTCATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG	473
Ps4-3	TAATATTTCTTTAGTCATTTCTCCATTATAGCCTAATATTAATAACTTCCAAATCATTTG **	473
PiRef-1	ATCTATCAAATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAGATAGTATTTTTATCACATAATAACC	512
Pi1-1	ATCTATCAAATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAGATAGTATTTTTATCACGTAATAACC	512
Pi1-2	ATCTATCAAATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAGATAGTATTTTTATCACGTAATAACC	512

Pi2-1	ATCTATCAAAATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAAGATAGTATTTTTATCACATAATAACC	513
Pi2-2	ATCTATCAAAATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAAGATAGTATTTTTATCACGTAATAACC	512
PsRef-1	ATCTATC--AATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAAGGTAGTATTTTTATCGCATAATAACC	495
PsRef-2	ATCTATC--AATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAAGGTAGTATTTTTATCGCATAATAACC	495
Ps3-1	ATCTATC--AATATGAAATAAAAAACAATTAAAAGATAGTATTTTTATCGCACAATAACC	522
Ps3-2	ATCTATC--AATATGAAATAAAAAACAATTAAAAGATAGTATTTTTATCGCACAATAACC	522
Ps4-1	ATCTATC--AATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAAGATAGTATTTTTATCGCATAATAACC	523
Ps4-2	ATCTATC--AATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAAGATAGTATTTTTATCGCATAATAACC	530
Ps4-3	ATCTATC--AATATGAAAT-AAAAGCAATTAAAAGGTAGTATTTTTATTGCGTAATAACC	530
	***** ***** **** ***** ***** * *****	
PiRef-1	TATGTAAATATAAAAAGTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTATTACTGTACA	572
Pi1-1	TATGTAAATATAAAAAGTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTATTACTGTACA	572
Pi1-2	TATGTAAATATAAAAAGTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTATTACTGTACA	572
Pi2-1	TATGTAAATATAAAAAGTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTATTACTGTACA	573
Pi2-2	TATGTAAATATAAAAAGTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTATTACTGTACA	572
PsRef-1	TATGTAAATATAAATGTTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTAT-----	546
PsRef-2	TATGTAAATATAAATGTTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTAT-----	546
Ps3-1	TATGTAAATATAAATGTTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTAT-----	573
Ps3-2	TATGTAAATATAAATGTTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTAT-----	573
Ps4-1	TATGTAAATATAAATGTTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTAT-----	574
Ps4-2	TATGTAAATATAAATGTTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTAT-----	581
Ps4-3	TATGTAAATATAAATGTTTCAGCAAATAGGCCTACAGTTTTATAATCGTTAT-----	581
	***** ***** ***** ***** ***** *****	
PiRef-1	CATTTATAGAGTTAAAAATCCCCGTCAGCATAGTTAGGTAGGAATAGATAAAATATTCCTT	632
Pi1-1	CATTTATAGAGTTAAAAATCCCCGTCAGCATAGTTAGGTAGGAATAGATAAAATATTCCTT	632
Pi1-2	CATTTATAGAGTTAAAAATCCCCGTCAGCATAGTTAGGTAGGAATAGATAAAATATTCCTT	632
Pi2-1	CATTTATAGAGTTAAAAATCCCCGTCAGCATAGTTAGGTAGGAATAGATAAAATATTCCTT	633
Pi2-2	CATTTATAGAGTTAAAAATCCCCGTCAGCATAGTTAGGTAGGAATAGATAAAATATTCCTT	632
PsRef-1	-----TAGAGTTAAAAATCCCTGTCGGCGTAGTTAGGTAGGCCTAGATAAAATATTCCTT	600
PsRef-2	-----TAGAGTTAAAAATCCCTGTCGGCGTAGTTAGGTAGGCCTAGATAAAATATTCCTT	600
Ps3-1	-----TAGAGTTAAAAATCCCTGTCGGCATACTTAGGTAGGCCTAGATAAAATATTCCTT	627
Ps3-2	-----TAGAGTTAAAAATCCCTGTCGTCATACTTAGGTAGGCCTAGATAAAATATTCCTT	627
Ps4-1	-----TAGAGTTAAAAATCCCTGTCGGCA-----TAGATAAAATATTCCTT	614
Ps4-2	-----TAGAGTTAAAAATCCCTGTCGGCA-----TAGATAAAATATTCCTT	614
Ps4-3	-----TAGAGTTAAAAATCCCTGTCGGCGTAGTTAGGTAGGCCTAGATAAAATATTCCTT	614
	***** *** ** *****	
PiRef-1	TAAGTTGTTTTTAAATTGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	692
Pi1-1	TAAGTTGTTTTTAAATTGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	692
Pi1-2	TAAGTTGTTTTTAAATTGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	692
Pi2-1	TAAGTTGTTTTTAAATTGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	693
Pi2-2	TAAGTTGTTTTTAAATTGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	692
PsRef-1	TAAGTTGTTTTTAAATAGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCAAATTAA	660
PsRef-2	TAAGTTGTTTTTAAATAGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCAAATTAA	660
Ps3-1	TAAGTTGTTTTTAAATAGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTAATTTGTATCTAATTAA	687
Ps3-2	TAAGTTGTTTTTAAATAGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	687
Ps4-1	TAAGTTGTTTTTAAATAGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	674
Ps4-2	TAAGTTGTTTTTAAATAGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	681
Ps4-3	TAAGTTGTTTTTAAATAGTTTGTTTTTAAATGATGTATTTCTGATTTGTATCTAATTAA	695
	***** ***** ***** *****	
PiRef-1	TCAGC	697
Pi1-1	TCAGC	697
Pi1-2	TCAGC	697
Pi2-1	TCAGC	698
Pi2-2	TCAGC	697
PsRef-1	TCAGC	665
PsRef-2	TCAGC	665
Ps3-1	TCAGC	692
Ps3-2	TCAGC	692
Ps4-1	TCAGC	679

Ps4-2	TCAGC	686
Ps4-3	TCAGC	700
