

A. CACCONI - M. COBOLLI SBORDONI - E. DE MATTHAEIS -  
V. SBORDONI

Istituto di Zoologia dell'Università di Roma

**Una datazione su base genetico-molecolare della  
divergenza tra specie cavernicole e marine di Sferomidi  
(gen. *Monolistra* e *Sphaeroma*, Crustacea, Isopoda)\***

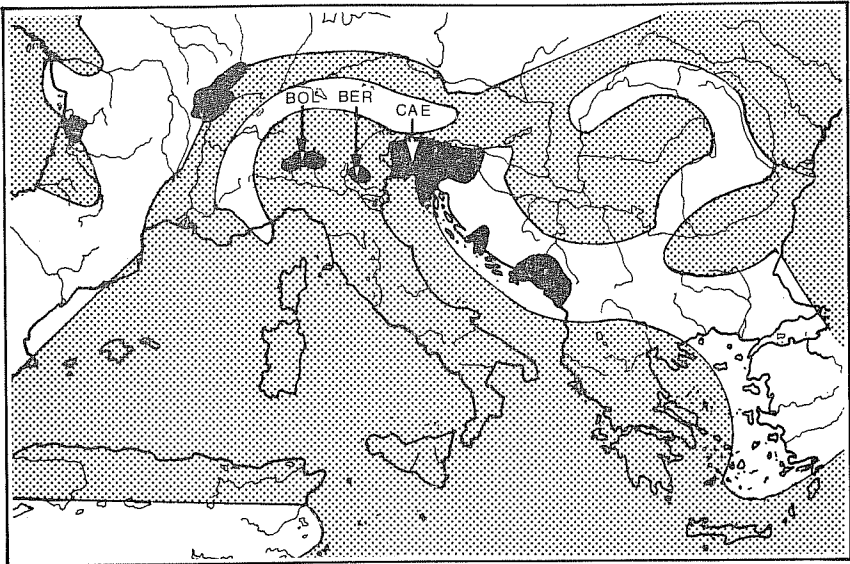
I Monolistrini sono un piccolo gruppo di Isopodi Sferomidi di origine marina, comprendente una quindicina di specie adattate all'ambiente cavernicolo appartenenti ai 2 generi *Caecosphaeroma* e *Monolistra*. La loro area di distribuzione comprende alcune località intorno all'alta valle del Rodano, ed una vasta regione che si estende dalle Prealpi Lombarde al Carso Sloveno ed Istriano fino all'Erzegovina (Sket, 1965). L'attuale geonemia del gruppo era stata correlata con la paleogeografia del Mediterraneo durante il Miocene, in relazione alla presenza di profonde ingressioni nelle aree continentali oggi occupate dai Monolistrini (Vandel, 1964) (Fig. 1). Secondo Racovitza (1910) la loro evoluzione sotterranea sarebbe iniziata nel Miocene superiore, in concomitanza con fenomeni di regressione marina, a partire da forme dapprima adattate all'ambiente salmastro e successivamente a quello dulcacquicolo epigeo. Questa ipotesi sembra più attendibile di quella formulata da Virè (1901) che supponeva una diretta filiazione delle popolazioni cavernicole da forme lucicole marine. L'ulteriore diversificazione delle specie di *Monolistra*, sempre secondo Racovitza, sarebbe databile intorno alla fine del Pliocene, o all'inizio del Pleistocene, in relazione all'erosione di valli che avrebbero favorito la frammentazione progressiva dell'areale e la formazione di isolati geografici in singole grotte o piccole aree carsiche.

Queste premesse costituivano una buona opportunità per studiare la struttura genetica delle popolazioni cavernicole rispetto a quelle epigee, e in particolare per indagare con un metodo alternativo

---

\* Lavoro eseguito con un contributo del CNR.

la validità delle datazioni proposte. E' noto che attraverso le tecniche elettroforetiche applicate allo studio di sistemi gene-enzima è possibile sia saggiare la variabilità genetica di una determinata popolazione, sia misurare il grado di divergenza genetica tra due popolazioni, nonchè fornire una stima, anche se approssimativa, del tempo di divergenza (Nei, 1975).



1 - Attuale distribuzione dei Monolistrini (zone nere) in rapporto alla paleogeografia del Mediterraneo durante il Miocene medio (ricostruzione da Hsü et al., 1977). Le zone bianche individuano le terre emerse, quelle punteggiate i mari, le frecce indicano le stazioni di raccolta delle 3 specie di *Monolistrina*.

In una precedente nota abbiamo riferito sinteticamente i risultati ottenuti studiando, su un campione di 14 loci (Sbordoni et al., 1980), 3 specie di *Monolistrina* della fascia prealpina (*M. boldorii bergomas* Arcangeli, *M. berica berica* (Fabiani), *M. caeca julia* (Ferguson)), confrontandole con 2 specie di Sferomidi marini epigei (*Sphaeroma hookeri* Leach e *S. serratum* (Fabricius)) a vasta diffusione nel bacino del Mediterraneo (Lejuez, 1966). Delle 2 specie di *Sphaeroma* la prima è legata alle acque salmastre (Kerambrun, 1970), ed è paragonabile almeno a livello adattativo ad un ipotetico antenato di *Monolistrina* la seconda ha invece una corologia esclusi-

vamente litorale marina. I risultati di questo studio hanno mostrato che la separazione di *Monolista* e *Sphaeroma* rispetto ad un loro comune antenato è databile approssimativamente al Messiniano, in corrispondenza con la crisi di salinità del Mediterraneo e che la speciazione nel gruppo di *Monolista* esaminate è grosso modo riferibile al Pliocene superiore, come aveva ipotizzato Racovitza.

In questo lavoro ci proponiamo di esplorare ulteriormente la corrispondenza tra l'ipotesi di Racovitza e le datazioni biochimiche ampliando il campione di sistemi gene-enzima studiati e riferendo in dettaglio dei risultati dell'analisi genetica delle 5 popolazioni studiate.

#### MATERIALI E METODI

Sono state saggiate 5 popolazioni, una per ogni specie di Sferomidi esaminati. Le località di raccolta sono indicate nell'elenco che segue; per le grotte sono riportati il corrispondente numero di catasto regionale e l'altitudine.

*Monolista boldorii bergomas* Arcangeli

Grotta di Val D'Adda, n. 1044 Lo, S. Omobono Imagna, Bergamo, m. 561.

*Monolista berica* (Fabiani)

Covolo della Guerra, n. 127 Ve, Lumignano, Vicenza, m. 161.

*Monolista caeca julia* (Feruglio)

Grotta Nuova di Villanova, n. 323 Fr, Tarcento, Udine, m. 661.

*Sphaeroma hookeri* Leach

La Trappola, Parco dell'Uccellina, Grosseto. Stagno retrodunale nel tombolo.

*Sphaeroma serratum* (Fabricius)

S. Marinella, Roma. Piano mediolitorale superiore sotto ciottoli.

Per ogni popolazione è stato analizzato con l'elettroforesi orizzontale su gel d'amido un campione di 50 individui.

Nella Tab. 1 sono indicati i sistemi tampone usati, le tecniche di colorazione, il numero di loci interpretati per le proteine saggiate. Le sigle per i tamponi sono le stesse utilizzate da Sbordoni et al. (1979a) e Sbordoni et al. (1979b).

TABELLA 1 - Enzimi studiati e informazioni sommarie sulle tecniche

Enzima	Tampone	Tecniche di colorazione	N. di loci interpretati
Aldeide ossidasi (AO)	B	Ayala (com. pers.)	1
Enzima malico (ME)	F	Ayala et al. (1972)	2
Esterasi (EST)	A	Ayala et al. (1972)	4
Glutamico-ossalacetico transaminasi (GOT)	B	Ayala (com. pers.)	1
Leucina-amino peptidasi (LAP)	A	Ayala et al. (1972)	1
Malico deidrogenasi (MDH)	A	Ayala et al. (1972)	1
Fosfatasi acida (ACPH)	A	Ayala et al. (1972)	2
Fosfatasi alcalina (APH)	A	Ayala et al. (1972)	2
Fosfoesosoisomerasi (PHI)	E	Brewer (1970)	1
Tetrazolio ossidasi (TO)	F	Ayala et al. (1972)	1
Xantina deidrogenasi (XDH)	A	Ayala (com. pers.)	1
Proteine non enzimatiche (Pt, 1-4-6)	A	Ayala (com. pers.)	3
Proteine non enzimatiche (Pt, 9-10)	E	Ayala (com. pers.)	2

Sono stati saggiati i seguenti enzimi: Aldeide ossidasi (AO), Esterasi (EST), Fosfatasi acida (ACPH), Fosfatasi alcalina (APH), Fosfoesosoisomerasi (PHI), Glutamico ossalacetico transaminasi (GOT), Leucina amino peptidasi (LAP), Enzima malico (ME), Malico deidrogenasi (MDH), Tetrazolio ossidasi (TO), Xantina deidrogenasi (XDH); sono stati inoltre utilizzati 2 sistemi di proteine non enzimatiche.

In base al grado di risoluzione delle bande l'interpretazione genetica è stata possibile per un totale di 22 loci. Dalle frequenze alleliche è stata calcolata la distanza genetica utilizzando la formula di Nei (1972):  $D = -\log_e I$ , dove  $I$  è l'identità genetica.

Il tempo di divergenza è stato calcolato usando la formula di Nei (1975):  $t = D/2\alpha = D/2cn_i\lambda_a$ , dove  $t$  è il tempo da quando le due specie si sono separate,  $D$  la distanza genetica,  $c$  la proporzione di sostituzioni aminoacidiche individuabili con l'elettroforesi,  $n_i$  il numero di aminoacidi per proteina e  $\lambda_a$  il tasso di sostituzioni aminoacidiche per polipeptide per anno. Sono stati utilizzati 2 diversi valori di  $\alpha$ :  $\alpha = 10^{-7}$  e  $\alpha = 1.136 \cdot 10^{-7}$ ; il primo ricavato da Nei (1975), il secondo calcolato sulla base di parametri biochimici noti dalla letteratura, per le proteine saggiate.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La Tab. 2 indica i valori delle frequenze alleliche delle popolazioni considerate. Nella Tab. 3 sono indicate le distanze genetiche tra le varie specie e la Fig. 2 mostra le relazioni filogenetiche tra gli Sferomidi studiati.

TABELLA 2 - Frequenze alleliche per 22 loci nelle 5 popolazioni di *Monolista* e *Sphaeroma* analizzate. Ogni popolazione è indicata con tre lettere: BOL (*M. boldorii*), BER (*M. berica*), CAE (*M. caeca*), HOO (*S. bookeri*), SER (*S. serratum*). N = numero di genomi saggiati per locus per popolazione, Ha = eterozigosi attesa per locus, Ho = eterozigosi osservata per locus.

Locus	Allele	BOL	BER	CAE	HOO	SER
A <sub>o</sub> -1	N	16	74	—	134	40
	Ha	.000	.328		.054	.000
	Ho	.000	.409		.053	.000
	102				.284	
	100		.973		.716	
	98		.027			
	95	1.00				1.00
A <sub>cpb</sub> -1	N	102	220	128	168	96
	Ha	.550	.498	.642	.369	.646
	Ho	.510	.336	.953	.226	.521
	104				.125	
	103	.108	.300	.211		
	102				.875	
	101			.336		
	100	.598	.641			
	98	.294	.059	.453		
	97					.313
	94					.229
90					.458	
A <sub>cpb</sub> -2	N	44	106	70	60	40
	Ha	.426	.503	.342	.325	.450
	Ho	.409	.302	.200	.400	.450
	105			.786		
	103			.214		
	102	.705	.528			
	100	.295	.472			
	90				.200	.325
	80				.800	.675

Segue Tab. 2

Locus	Allele	BOL	BER	CAE	HOO	SER
<i>Apb-1</i>	N	136	230	128	190	62
	Ha	.491	.482	.530	.456	.500
	Ho	.485	.233	.563	.274	.419
	105					.435
	103				.326	.565
	102				.663	
	101		.401		.011	
	100	.581	.599	.070		
	99	.419		.602		
	97			.328		
	<i>Apb-2</i>	N	138	240	122	—
Ha		.500	.435	.621		.657
Ho		.536	.483	.508		.611
102				.295		
100			.683	.615		
98				.139		
97						.389
96		.543				
95		.457	.317			
94						.389
90						.222
<i>Est-1</i>	N	112	246	—	192	96
	Ha	.000	.000		.000	.000
	Ho	.000	.000		.000	.000
	100	1.00	1.00		1.00	1.00
<i>Est-3</i>	N	82	224	120	74	—
	Ha	.595	.466	.587	.344	
	Ho	.707	.446	.400	.378	
	101	.402				
	100		.634	.308		
	99	.488	.366	.550		
	98			.142		
	97	.110				
<i>Est-4</i>	N	14	132	48	—	—
	Ha	.000	.000	.467		
	Ho	.000	.000	.458		
	100		1.00			
	99	1.00				
	98			.354		
	95			.646		

Segue Tab. 2

Locus	Allele	BOL	BER	CAE	HOO	SER
<i>Est-5</i>	N	80	242	128	78	64
	Ha	.000	.000	.000	.000	.000
	Ho	.000	.000	.000	.000	.000
	100		1.00	1.00	1.00	1.00
	98	1.00				
<i>Got</i>	N	56	178	66	204	78
	Ha	.000	.000	.000	.426	.629
	Ho	.000	.000	.000	.412	.538
	207					.462
	205					.372
	202					.167
	108	1.00				
	107				.132	
	105				.735	
	103				.132	
	100		1.00			
<i>Lap</i>	nulla			1.00		
	N	94	170	78	132	68
	Ha	.431	.572	.385	.420	.492
	Ho	.319	.518	.231	.318	.294
	106					.412
	105				.295	
	103				.705	.588
	102			.026		
	100	.309	.394	.218		
	99	.691	.518	.756		
	97		.088			
<i>Mdb</i>	N	70	152	106	156	96
	Ha	.577	.489	.554	.175	.618
	Ho	.457	.434	.642	.115	.563
	103			.057	.904	.146
	102	.171				
	101				.096	.458
	100	.586	.586	.434		
	98		.414	.509		.396
96	.243					
<i>Me-1</i>	N	58	126	74	116	78
	Ha	.514	.602	.462	.615	.399
	Ho	.690	.571	.486	.776	.538
	105	.017	.119			
	103			.351	.147	
	102					.269

Segue Tab. 2

Locus	Allele	BOL	BER	CAE	HOO	SER
<i>Me-2</i>	100	.414	.421	.649	.379	
	97	.569	.460			
	96				.474	
	90					.731
	N	36	152	50	96	78
	Ha	.000	.280	.429	.321	.490
	Ho	.000	.147	.200	.188	.308
	104				.198	
	103					.590
	102		.167	.300		.410
<i>Phi</i>	100		.833	.700		
	97				.802	
	90	1.00				
	N	102	220	106	176	76
	Ha	.596	.448	.564	.000	.052
	Ho	.745	.400	.528	.000	.053
	105			.066		
	100	.167	.664			
	98			.453		
	95	.549	.336	.481		
<i>To</i>	94					.974
	93				1.00	
	92					.026
	90	.284				
	N	48	192	112	82	8
	Ha	.000	.000	.069	.000	.000
	Ho	.000	.000	.071	.000	.000
	105			.964		
<i>Xdb</i>	103	1.00				
	100		1.00	.036	1.00	
	98					1.00
	N	120	210	96	206	80
	Ha	.000	.000	.000	.000	.000
<i>Pt-1</i>	Ho	.000	.000	.000	.000	.000
	102				1.00	1.00
	100	1.00	1.00	1.00		
	N	48	144	80	108	48
	Ha	.223	.000	.000	.072	.000
	Ho	.250	.000	.000	.074	.000
	100		1.00	1.00		
	96	.125			.037	
	95	.875			.963	1.00



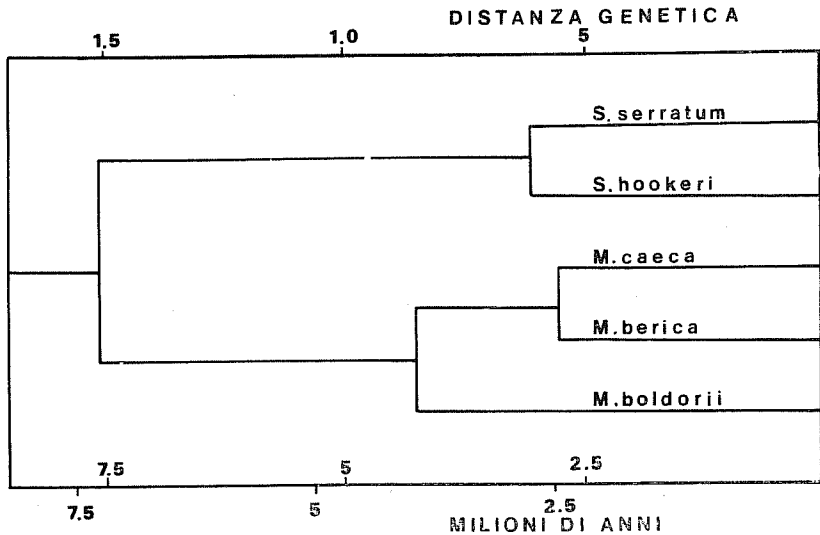
Segue Tab. 2

Locus	Allele	BOL	BER	CAE	HOO	SER
Pt-4	N	88	212	112	144	80
	Ha	.067	.124	.035	.130	.049
	Ho	.068	.113	.036	.083	.050
	102	.034	.066	.018	.069	.025
	100	.966	.934	.982	.931	.975
Pt-6	N	48	190	96	—	—
	Ha	.361	.011	.000		
	Ho	.125	.011	.000		
	102	.229				
	100	.771	.995	1.00		
Pt-9	N	96	210	78	138	80
	Ha	.418	.536	.495	.160	.240
	Ho	.333	.425	.538	.116	.225
	106				.913	.863
	105				.087	.138
	102		.100			
	100		.619	.423		
	98	.708	.281	.577		
96	.292					
Pt-10	N	40	130	28	—	—
	Ha	.000	.000	.138		
	Ho	.000	.000	.143		
	102	1.00		.929		
	100		1.00	.071		

TABELLA 3 - Misure di identità (sopra) e di distanza genetica (sotto) calcolate con il metodo di Nei tra le popolazioni di *Monolista* e *Sphaeroma*.

	<i>M. boldorii</i>	<i>M. berica</i>	<i>M. caeca</i>	<i>S. hookeri</i>
<i>M. berica</i>	0.429			
	0.847			
<i>M. caeca</i>	0.423	0.576		
	0.859	0.551		
<i>S. hookeri</i>	0.195	0.313	0.174	
	1.632	1.163	1.748	
<i>S. serratum</i>	0.267	0.219	0.181	0.542
	1.321	1.518	1.708	0.612

I risultati, che in linea generale sono sostanzialmente in accordo con quelli ottenuti su un numero inferiore di loci (Sbordoni et al. 1980), evidenziano tra le tre specie di *Monolistr*a dei valori di distanza genetica abbastanza elevati, paragonabili come ordine di grandezza a quelli tra specie ben differenziate (Ayala, 1975; Avise, 1976). Le 2 specie più orientali, *M. caeca* e *M. berica*, presentano il grado più alto di similarità. Le distanze tra *Sphaeroma* e *Monolistr*a sono sempre più alte di quelle riscontrate per specie congeneri sia di *Monolistr*a che di *Sphaeroma*.



2 - Cladogramma illustrante i rapporti di similarità genica tra specie di *Monolistr*a e *Sphaeroma*. La scala superiore è basata sui valori dell'indice di Nei. Le scale dei tempi di divergenza sono costruite su due distinti valori di  $\alpha$  (vedi testo).

In media il tempo di divergenza tra *S. hookeri* e *Monolistr*a oscilla tra  $5.8$  e  $8.7 \times 10^6$  anni, quello tra *S. serratum* e *Monolistr*a tra  $6.6$  e  $8.5 \times 10^6$ . Queste stime, pur presentando un ambito di variazione più ampio di quelle ottenute su 14 loci, riconducono nuovamente al Miocene superiore ed in particolare al periodo precedente la crisi di salinità del Mediterraneo (Hsü, 1972; Hsü et al., 1977).

Ricostruzioni paleogeografiche classiche e recenti del bacino Mediterraneo durante il Miocene documentano in effetti il perdurare ed il ripetersi di profonde ingressioni marine nelle zone oggi occu-

pate dai Monolistrini (Termier et Termier, 1952; Furon, 1958; Hsü et al., 1977). Il problema è di datare in quale periodo gli antenati delle attuali *Monolistra*, presumibilmente adattati alla vita in acque salmastre, rimasero geneticamente isolati dai loro parenti marini, adattandosi all'ambiente dulcacquicolo e cavernicolo. La crisi di salinità del Mediterraneo potrebbe offrire una risposta a questo interrogativo.

Pur essendoci un accordo sostanziale sulla datazione di questo determinante evento ecologico, per alcuni esso ha portato a un essiccamento completo del bacino (Hsü, 1972; Hsü, 1978), mentre per altri si è risolto prevalentemente in un forte aumento della salinità (Selli, 1973). Certamente si deve essere creata una situazione selettiva molto drastica, per la maggioranza delle specie marine, ben poche delle quali hanno potuto salvarsi trovando degli opportuni rifugi ecologici nelle acque salmastre. Da qui potrebbe essere iniziata da parte dei Monolistrini la colonizzazione delle acque sotterranee attraverso le acque interne di superficie.

I tempi di divergenza tra le 3 specie di *Monolistra* sono sostanzialmente in accordo con l'ipotesi di Racovitza che daterebbe intorno al Pliocene superiore l'inizio dei processi di speciazione nel sottogenere *Typhlosphaeroma*, ritenuto più antico e specializzato, a cui *M. boldorii* e *M. berica* appartengono insieme a *M. pavani*.

Più recente, ma sempre compresa nel Pliocene, sarebbe stata, secondo i nostri dati, la separazione di *M. caeca* dal gruppo *berica*, a distribuzione orientale.

Queste stime sono in notevole accordo con le evidenze paleoclimatiche e paleogeografiche della fascia prealpina della pianura padana durante questo periodo, quando fenomeni tettonici ed erosivi determinarono un definitivo isolamento delle varie grotte o di singole aree carsiche prealpine (Chardon, 1975; Nangeroni, 1969). Il livello sul mare delle grotte popolate da *Monolistra* nella zona prealpina mostra una buona corrispondenza con il livello nelle stesse zone della fascia di sedimenti pliocenici di origine marina (Carraro et al., 1969).

Ad un periodo paragonabile (circa 3 milioni di anni fa) dovrebbero essere riferiti i fenomeni di differenziamento genetico tra le 2 specie di *Sphaeroma*. La distanza relativamente bassa riscontrata tra *Monolistra* e *Sphaeroma*, pur essendo compresa nell'intervallo di valori normalmente osservati tra generi diversi (Nei, 1975; Avise,

1976) mette in rilievo l'affinità tra i 2 taxa di Sphaeromidae esaminati.

Racovitza (1910) riconosceva un collegamento dei Monolistrini con rappresentanti della sottofamiglia Campecopeinae. E' tuttavia da sottolineare il fatto che la grande maggioranza delle specie di Campecopeinae sono adattate ad acque fredde: la loro corologia è prevalentemente nordatlantica con l'unica specie mediterranea *Anoplocopea hanseni* Racovitza, presente in Corsica. L'attuale distribuzione dei Monolistrini, così come la loro eurialità (Dresco-Derouet, 1959), parlerebbero a favore di un loro antico insediamento in acque salmastre, poco profonde e generalmente calde, anche se in progressivo raffreddamento, condizioni che caratterizzarono il bacino adriatico e prealpino originatosi dalla frammentazione della Tetide nel corso del Miocene superiore e nel Pliocene inferiore (Termier et Termier, 1952).

I nostri risultati sembrano confermare questa ipotesi. Rimane aperto il problema della identificazione del più prossimo parente lucicolo marino delle *Monolistra* almeno finchè non sarà possibile studiare l'affinità a livello elettroforetico tra *Monolistra* e *Anoplocopea*.

TABELLA 4 - Stime di variabilità genetica nelle specie di Sferomidi analizzate

	$H_a$	$H_o$	A	P	N/ro loci
<i>M. boldorii</i>	0.261	0.256	1.818	0.591	22
<i>M. berica</i>	0.262	0.219	1.818	0.636	22
<i>M. caeca</i>	0.316	0.298	2.10	0.75	20
<i>S. hookeri</i>	0.214	0.186	1.944	0.722	18
<i>S. serratum</i>	0.290	0.254	1.889	0.667	18

$H_a$  = eterozigosi attesa;  $H_o$  = eterozigosi osservata; A = numero medio di alleli per locus; P = proporzione di loci polimorfici (quelli con frequenza dell'allele più raro > 0.01)

Nella Tab. 4 sono indicate alcune stime di variabilità genetica per le popolazioni studiate. L'elevato tasso di polimorfismo registrato nelle popolazioni cavernicole pone *Monolistra* tra gli organismi più variabili finora studiati con l'elettroforesi. Questo dato si allinea con le stime di alta variabilità verificate in altri organismi cavernicoli (Sbordoni, 1980). Inoltre, il grado di variabilità delle popolazioni

ipogee risulta mediamente maggiore di quello delle popolazioni epigee. La popolazione meno variabile geneticamente è quella di *S. hookeri*, adattata ad un tipo di habitat altamente stagionale. L'ipotesi di Valentine e Ayala (1978) postula in effetti negli organismi marini una correlazione positiva tra tasso di eterozigosi e grado di stabilità temporale dell'habitat e in particolare delle risorse trofiche.

Va notata tuttavia l'elevata variabilità riscontrata nella popolazione di *S. serratum* ( $H_a = 0.290$ ), che supera i livelli di eterozigosi osservati in almeno una popolazione cavernicola di *Monolistra* (*M. berica*). Questa specie è nota per l'elevato polimorfismo cromatico che caratterizza la maggior parte delle sue popolazioni (Bocquet et al., 1951; Consiglio et al., 1966), e il cui significato adattativo non è ancora del tutto chiarito anche se è presumibilmente da ricollegare, almeno in alcune situazioni, all'eterogeneità spaziale dell'habitat.

Altri dati, che risultano da ricerche recentemente effettuate su un gruppo di popolazioni e specie di Crostacei Anfipodi adattati a diverse condizioni ambientali (Sbordoni et al., 1976, 1979a, Dickson et al., 1979) e da lavori su numerosi organismi marini adattati a regimi di estrema stabilità temporale (Gooch e Schopf, 1972; Ayala et al., 1973, 1975; Battaglia et al., 1978), sembrano avallare questo modello che, in ultima analisi, attribuisce alla selezione bilanciante un ruolo predominante nel determinare la variabilità genetica di una popolazione.

E' opportuno sottolineare che l'elevata variabilità in *Monolistra* sarebbe comunque congruente con l'ipotesi neutralista che prevede una dipendenza del grado di eterozigosi dall'antichità della popolazione, in assenza di colli di bottiglia.

Le due ipotesi non sono alternative e certamente non contrastano con le stime di divergenza e l'età delle popolazioni cavernicole di *Monolistra* precedentemente discusse.

#### RINGRAZIAMENTI

Tra gli amici e colleghi che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro con suggerimenti bibliografici o con l'aiuto prestato in laboratorio e sul campo ringraziamo Roberto Argano, Giuliana Allegrucci, Cristina Angelici, Donatella Cesaroni, Rita Colognola, Gian Maria Carchini, Marco Lucarelli e Mauro Rampini. Questo studio è stato eseguito con il contributo finanziario del C.N.R..

## SUMMARY

Genetic distance and variability in proteins encoded by 22 gene loci were analyzed through electrophoretic techniques in 3 troglitic species of *Monolistra* and 2 marine species of *Sphaeroma* (Isopoda, Sphaeromidae).

Genetic distances between *Monolistra* and *Sphaeroma* range from 1.163 to 1.748, from 0.551 to 0.859 for the 3 *Monolistra* species and is 0.612 between the 2 *Sphaeroma* species.

Divergence times calculated between *Monolistra* and *Sphaeroma* using Nei's formula range from 5.5 to 8.7 Myr; these estimates fall around the Messinian and the Mediterranean salinity crisis. This dating is in close agreement both with our previous data based on 14 gene loci and with Vandel's (1964) hypothesis relating the present distribution of Monolistrini to the Mediterranean paleogeography during the Miocene.

Genetic distance data suggest that cladogenetic events leading to speciation in *Monolistra* occurred around the upper Pliocene. This dating, already hypothesized by Racovitza (1910), is in good agreement with the present geological evidences on the palaeogeography of the prealpine area during this period.

*Monolistra* populations show high levels of heterozygosity ( $\bar{H}_a = 0.280$ ) and, on the average, they are more polymorphic than *Sphaeroma* ( $\bar{H}_a = 0.252$ ). The high variability of the *Monolistra* populations also suggests an old evolutionary history in cave habitats.

## LAVORI CITATI

- AVISE J.C., 1976. Genetic differentiation during speciation. In «Molecular Evolution», F.J. Ayala ed., Sinauer Ass., Inc., Sunderland, Mass.: 106-122.
- AYALA F.J., 1975. Genetic differentiation during the speciation process. *Evolutionary biology*, **8**: 1-75.
- AYALA F.J., D. HEDGECOCK, G.S. ZUMWALT and J.W. VALENTINE, 1973. Genetic variation in *Tridacna maxima*, an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages. *Evolution*, **27**: 177-191.
- AYALA F.J., J.W. VALENTINE, D. HEDGECOCK and L.G. BARR, 1975. Deep-sea asteroids: high genetic variability in a stable environment. *Evolution*, **29**: 203-212.
- BARR jr. T.C., 1968. Cave ecology and the evolution of troglobites. *Evolutionary biology*, **2**: 35-102.
- BATTAGLIA B., P.M. BISOL and G. FAVA, 1978. Genetic variability in relation to the environment in some marine invertebrates. In «Marine organisms. Genetics, Ecology and Evolution», Battaglia B. and J.A. Beardmore eds., Nato Conference series (4) **2**: 53-70. Plenum Press, New York.
- BOCQUET C., C. LEVI et G. TESSIER, 1951. Recherches sur le polychromatisme de *Sphaeroma serratum* (F.). *Arch. Zool. exp. Gén.*, **87**: 245-297.
- BREWER G.J., 1970. An introduction to isozyme techniques. Academic press, New York and London.
- CARRARO F., R. MALARODA, G. PICCOLI, C. STURANI e S. VENZO, 1969. Note illustrative della Carta Geologica d'Italia. Foglio 48. Servizio Geologico d'Italia, Roma.
- CHARDON M., 1975. Les Prealps Lombardes et leurs bordures, vol. 1. Librairie Honoré Champion, Paris.
- CONSIGLIO C. e R. ARGANO, 1966. Polimorfismo e variabilità in *Sphaeroma serratum* (Crustacea, Isopoda). *Arch. Zool. It.*, **51**: 47-96.
- DICKSON G.W., J.C. PATTON, J.R. HOLSINGER and J.C. AVISE, 1979. Genetic variation in cave-dwelling organisms, with emphasis on *Crangonyx antennatus* (Crustacea, Amphipoda) in Virginia. *Brimleyana*, **2**: 119-130.

- DRESCO-DEROUET L., 1959. Contribution à l'étude de la biologie de deux crustacés aquatiques cavernicoles, *Caecosphaeroma burgundum* D. et *Niphargus orcinus virei* Ch. Vie et Milieu, **10**: 321-346.
- FURON R., 1958. Causes de la répartition des êtres vivants. Masson, Paris.
- GOOCH J.L. and T.J.M. SCHOPF, 1972. Genetic variability in the deep sea: relation to environmental variability. Evolution, **26**: 545-552.
- HSÜ K.J., 1972. When the Mediterranean dried up. Scientific American, **227**: 26-36.
- HSÜ K.J., 1978. When the black sea was drained. Scientific American, **238**: 52-63.
- HSÜ K.J., L. MONTADERT, D. BERNOULLI, M.B. CITA, A. ERICKSON, R.E. GARRISON, R.B. KIDD, F. MÈLIERÉS, C. MÜLLER and R. WRIGHT, 1977. History of the Mediterranean salinity crisis. Nature, **267**: 399-403.
- KERAMBRUN P., 1970. Remplacement de *Sphaeroma serratum* par *S. bookeri* dans l'Étang de Berre par suite de sa dessalure. Mar. Biol., **6**: 128-134.
- LEJUEZ R., 1966. Comparaison morphologique, biologique et génétique de quelques espèces du genre *Sphaeroma* Latreille (Isopodes Flebellifères). Arch. Zool. exp. Gén., **107** (4): 469-667.
- NANGERONI G., 1969. Note geomorfologica sui monti a occidente del Lario Comasco. Atti Soc. It., Sc. Nat., **109**: 97-184.
- NEI M., 1972. Genetic distance between populations. Amer. Natur., **106**: 283-292.
- NEI M., 1975. Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-Oxford.
- RACOVITZA E.G., 1910. Sphéromiens (I<sup>ère</sup> Serie) et revision des Monolistrini (Isopodes Spheromiens). Arch. Zool. exp. Gén., **4**: 625-758.
- SBORDONI V., 1980. Strategie adattative negli animali cavernicoli: uno studio di genetica ed ecologia di popolazione. Acc. Naz. Lincei. Contributi del Centro Linceo interdisciplinare di Scienze Matematiche e loro applicazioni. VI Seminario sulla Evoluzione Biologica, **51**: 61-100.
- SBORDONI V., G. ALLEGRUCCI, D. CESARONI e G. SAMMURI, 1979b. Sulla posizione sistematica e le affinità di *Dolichopoda «etrusca»* in base a dati elettroforetici (Orthoptera, Rhaphidophoridae). Fragm. Entomol., **15** (1): 67-78.
- SBORDONI V., A. CACCONI, E. DE MATTHAEIS and M. COBOLLI SBORDONI, 1980. Biochemical divergence between cavernicolous and marine Sphaeromidae and the Mediterranean salinity crisis. Experientia, **36**: 48-50.
- SBORDONI V., M. COBOLLI SBORDONI ed E. DE MATTHAEIS, 1979a. Divergenza genetica tra popolazioni e specie ipogee ed epigee di *Niphargus* (Crustacea, Amphipoda). Lav. Soc. It. Biogeogr., (n.s.) **6** (Perugia 1976): 329-351.
- SBORDONI V., E. DE MATTHAEIS e M. COBOLLI SBORDONI, 1976. Variabilità genetica in popolazioni cavernicole ed epigee di Anfipodi. Atti XLIV Conv. UZI Boll. Zool., **43**: 402-403.
- SELLI R., 1973. Il Mediterraneo nel Miocene superiore: un mare sovrasalato. Le Scienze, **56**: 20.
- SKET B., 1965. Östliche Gruppe der Monolistrini (Crustacea, Isopoda). Int. J. Speleol., **1**: 249-267.
- TERMIER H. et G. TERMIER, 1952. Histoire géologique de la Biosphère. Masson, Paris.
- VALENTINE J.W. and F.J. AYALA, 1974. Genetic variation in *Fricleia halli*, a deepsea brachiopod. Deep-sea Res., **22**: 37-44.
- VALENTINE J.W. and F.J. AYALA, 1978. Adaptive strategies in the sea. In «Marine organisms. Genetic, Ecology and Evolution», Battaglia B. and Beardmore J.A. eds., Nato Conferences series, (4) **2**: 323-345. Plenum Press, New York.
- VANDEL A., 1964. Biospéologie. La Biologie des Animaux cavernicoles. Gauthier-Villars, Paris.
- VIRÉ A., 1901. Les Sphaeromiens des cavernes et l'origine de la faune souterraine. C.R. Ass. Fr. Av. Sc., 29<sup>a</sup> Sess., **2**: 711-719.