

# Paleogeografia della Sardegna ed evoluzione degli *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae)

ROBERTA CIMMARUTA\*, GIUSEPPE NASCETTI\*\*,  
GIANLUCA FORTI\* -\*\*\*, BENEDETTO LANZA\*\*\*\*, LUCIANO BULLINI\*

\* *Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza",  
Via Lancisi 29, 00161 Roma - E-mail: BULLINI@AXRMA.UNIROMA1.IT.*

\*\* *Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia  
via De Lellis - 01100 Viterbo - E-mail: NASCETTI@UNITUS.IT*

\*\*\* *Museo Naturalistico del Fiore, piazza G. Fabrizio 17 - 01021 Acquapendente (VT)*

\*\*\*\* *Dipartimento di Biologia Animale e Genetica e Museo di Storia Naturale (sezione  
Zoologica "La Specola"), Università di Firenze, Via Romana 17 - 50125 Firenze*

Key words: Amphibia, *Hydromantes*, Sardinia, Genetic divergence, Geographic variation.

## SUMMARY

23 populations of the European plethodontid salamander *Hydromantes* have been studied by means of multilocus electrophoresis. The obtained results show a high level of genetic fragmentation even within species and a genetic structure frequently coincident with the orography. The role of the paleoclimatic events of Quaternary in moulding the present genetic structure of the Sardinian *Hydromantes*, and of a variety of endemic organisms as well, is demonstrated of primary importance.

## INTRODUZIONE

Dati paleoclimatici e palinologici (West, 1969; Bertolani-Marchetti, 1985; Pignatti, 1994) hanno evidenziato che nell'area mediterranea i periodi glaciali sono stati caratterizzati da clima freddo e secco mentre i periodi interglaciali da clima più mite e umido. Durante i periodi glaciali si sono determinate variazioni dei piani altitudinali della vegetazione, che hanno obbligato la vegetazione arborea e la fauna a essa associata a rifugiarsi in quei siti lungo le coste o soprattutto in aree medio-montane dove ancora si verificavano precipitazioni. Essendo gli *Hydromantes* anfibi subtroglifili che necessitano di umidità elevata e temperature relativamente basse per sopravvivere, le variazioni climatiche del Quaternario hanno sicuramente condizionato la loro sopravvivenza in diverse aree geografiche, come ad esempio ipotizzato da Lanza (1983) riguardo la loro assenza dalla Corsica, soggetta a più forti fenomeni glaciali rispetto alla Sardegna. Lo

Tab. I - Elenco e numero progressivo delle popolazioni di *Hydromantes* campionate con la località di raccolta, le loro coordinate geografiche (riferite a Greenwich) e il numero di individui analizzati.

Codice	Località di raccolta	Latitudine (N)	Longitudine (E)	N
<i>H. flavus</i>				
1	Presso Siniscola - Nuoro, Sardegna	40°32'59"	09°39'37"	25
2	Presso Lula - Nuoro, Sardegna	40°28'44"	09°13'44"	21
<i>H. supramontis</i>				
3	Presso Oliena - Nuoro, Sardegna	40°15'06"	09°22'31"	18
4	Presso Dorgali - Nuoro, Sardegna	40°17'54"	09°33'08"	17
5	Presso Baunei - Nuoro, Sardegna	40°04'18"	09°34'07"	13
<i>H. imperialis</i>				
6	Presso Sedilo - Oristano, Sardegna	40°10'03"	08°55'59"	7
7	Presso Aritzo - Nuoro, Sardegna	39°57'31"	09°12'05"	9
8	Presso Samugheo - Oristano, Sardegna	39°53'22"	09°36'12"	16
9	Presso Seui - Nuoro, Sardegna	39°53'11"	09°20'45"	10
10	Presso Gairo - Nuoro, Sardegna	39°51'09"	09°27'37"	11
11	Presso Perdasdefogu - Nuoro, Sardegna	39°41'25"	09°25'19"	8
12	Monte Castel di Quirra - Cagliari, Sardegna	39°53'22"	09°36'12"	22
13	Monte Pardu - Cagliari, Sardegna	39°29'48"	09°24'22"	11
<i>H. genei</i>				
14	Presso Fluminimaggiore - Cagliari, Sardegna	39°24'18"	08°27'37"	17
15	Presso Baraxiutta - Cagliari, Sardegna	39°22'21"	08°36'33"	10
16	Presso Domusnovas - Cagliari, Sardegna	39°20'28"	08°37'42"	17
17	Presso Corongiu de Mari - Cagliari, Sardegna	39°16'46"	08°33'55"	11
18	Monte Exi - Cagliari, Sardegna	39°13'22"	08°32'01"	6
19	Presso Barbusi - Cagliari, Sardegna	39°12'07"	08°31'16"	11
20	Presso Carbonia - Cagliari, Sardegna	39°10'38"	08°32'33"	5
21	Presso Villaperuccio - Cagliari, Sardegna	39°08'47"	08°42'32"	43
22	Presso Nuxis - Cagliari, Sardegna	39°07'34"	08°40'06"	39
23	Presso Pula - Cagliari, Sardegna	39°02'38"	08°48'55"	18

studio della struttura genetica delle specie sarde di *Hydromantes* e dei suoi rapporti con i diversi eventi paleogeografici che hanno interessato il complesso sardo-corso e con l'orografia locale, può perciò offrire una valida chiave di lettura per comprendere l'influenza che le variazioni climatiche del Quaternario hanno avuto nel determinare gli areali attuali delle specie in funzione dell'orografia regionale, e costituisce la base del presente lavoro.

## MATERIALI E METODI

Lo studio della diversità genetica è stato condotto su 365 individui campionati in 23 popolazioni sarde di *Hydromantes* (Tab. I; Fig. 1) appartenenti alle seguenti specie: *H. flavus* (popolazioni 1-2), *H. supramontis* (popolazioni 3-5), *H. imperialis* (popolazioni 6-13), *H. genei* (popolazioni 14-23).

Da ogni singolo individuo è stato estratto un omogenato di muscolo che è stato analizzato mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido. Sono stati indagati 33 loci enzimatici utilizzando cinque differenti sistemi tampone. I loci analizzati e i metodi elettroforetici sono riportati in Tab. II; per un maggior dettaglio sulle metodiche si veda Nascetti et al., 1988. Il campione dei loci analizza-

ti comprende un terzo di loci “fast evolving” e due terzi di loci “slow evolving”, *sensu* Sarich (1977) e Koehn ed Eanes (1978).

La variabilità genetica delle popolazioni è stata valutata attraverso i seguenti parametri: numero medio di alleli per locus ( $A$ ); percentuale di loci polimorfici utilizzando il criterio del 99% ( $P_{99}$ ), ovvero considerando polimorfico un locus se la percentuale dell'allele più frequente non risulta superiore al 99%; eterozigosi media attesa per locus ( $H_e$ ) (Nei, 1978). La significatività statistica dello scostamento delle frequenze dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è stata valutata attraverso il test del  $\chi^2$  e un test analogo al test esatto di Fisher (Haldane, 1954; Elston e Forthofer, 1977). La distanza genetica tra popolazioni è stata stimata partendo dalle frequenze alleliche usando la formula proposta da Nei (1972) ( $D_{Nei}$ ). Le relazioni di affinità genetica tra le popolazioni sono state rappresentate graficamente mediante un dendrogramma realizzato con il metodo UPGMA (Sokal e Sneath,

1963; Fitch e Margoliash, 1967) e attraverso una carta delle isofene delle distanze genetiche, associando le popolazioni affini per differenziamento genetico con intervalli tra le diverse isofene pari a  $D_{Nei}=0,03$ . La valutazione del flusso genico tra popolazioni appartenenti allo stesso taxon è stata effettuata con il metodo indiretto proposto da Wright (1943; 1951), modificato da Crow e Aoki (1984); tale metodo fornisce una stima di  $Nm$ , dove  $m$  è il tasso di migrazione e  $N$  la dimensione effettiva della popolazione, secondo la formula:  $Nm = [(1/F_{ST}) - 1]/4a$

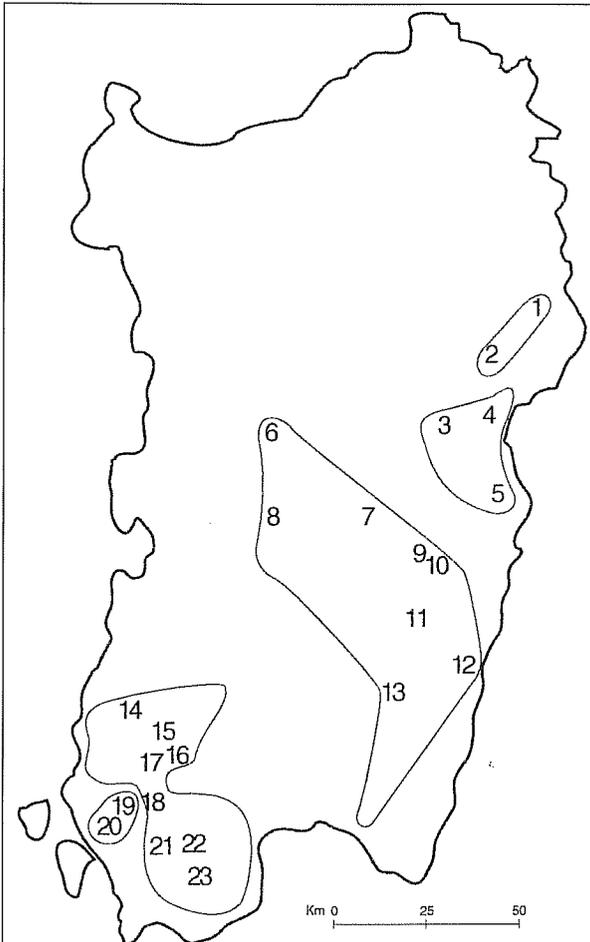


Fig. 1 - Localizzazione delle popolazioni di *Hydromantes* studiate e areali delle specie considerate: *H. flavus* (popolazioni 1-2), *H. supramontis* (popolazioni 3-5), *H. imperialis* (popolazioni 6-13), *H. genei* (popolazioni 14-23). Gli areali sono stati disegnati sulla base dei dati di Lanza et al., 1995 e altri dati non precedentemente pubblicati.

Tab. II - Enzimi saggiati con i relativi numeri di codice, loci codificati, migrazione elettroforetica, sistema tampone, intensità di campo elettrico, tempi di migrazione e relativi riferimenti bibliografici per le tecniche di colorazione utilizzate.

Enzimi	Num. cod.	Loci codificati	Migraz. <sup>^</sup>	Sistema tampone*	V/cm	Tempo (h)	Rifer. bibl.
$\alpha$ -Glicerofosfato deidrogenasi	1.1.1.8	<i><math>\alpha</math>-Gpdh</i>	+	3	8	6	d
Lattato deidrogenasi	1.1.1.27	<i>Ldh-1</i> <i>Ldh-2</i>	+ -	4	7	5	a
Idrossibutirrato deidrogenasi	1.1.1.30	<i>Hbdh</i>	+	2	7	6	b
Malato deidrogenasi	1.1.1.37	<i>Mdh-1</i> <i>Mdh-2</i>	+ +	3 +	8	6	b
Malato deidrogenasi (NADP <sup>+</sup> )	1.1.1.40	<i>Mdhp-1</i> <i>Mdhp-2</i>	+ +	5 +	7	6	d
Isocitrato deidrogenasi	1.1.1.42	<i>Idh-1</i> <i>Idh-2</i>	+ +	5 +	7	5	b
6-Fosfogluconato deidrogenasi	1.1.1.44	<i>6-Pgdh</i>	+	3	8	6	b
Gliceraldeide3fosfato deidrogenasi	1.2.1.12	<i>Gapdh</i>	+	5	7	6	d
NADH deidrogenasi	1.6.99.3	NADH-dh	+	2	8	8	a
Superossido dismutasi	1.15.1.1	<i>Sod-1</i> <i>Sod-2</i>	+ +	1 +	7	7	c
Nucleoside fosforilasi	2.4.2.1	<i>Np</i>	+	1	8	6	e
Fosfoglucomutasi	2.5.7.1	<i>Pgm-1</i> <i>Pgm-2</i>	+ +	2 +	7	6	a
Aspartato aminotransferasi	2.6.1.1	<i>Aat-1</i> <i>Aat-2</i>	+ -	3	8	5	c
Creatina chinasi	2.7.3.2	<i>Ck</i>	+	5	7	5	b
Adenilato chinasi	2.7.4.3	<i>Adk</i>	+	5	7	5	d
Esterasi	3.1.1.1	<i>Est-4</i>	+	4	8	5	d
Peptidasi (Leu-Ala)	3.4.11.	<i>Pep C</i>	+	5	7	4	f
Peptidasi (Phe-Pro)	3.4.11.	<i>Pep D</i>	+	5	7	4	f
Leucina aminopeptidasi	3.4.11.	<i>Lap</i>	+	4	7	4	d
Adenosina deaminasi	3.5.4.4	<i>Ada-1</i> <i>Ada-2</i>	+ +	5 +	7	5	e
Anidrasi carbonica	4.2.1.1	<i>Ca-3</i> <i>Ca-4</i>	+ +	1 +	7	4	e
Fumarasi	4.2.1.2	<i>Fum</i>	+	1	7	6	b
Mannosio fosfato isomerasi	5.3.1.8	<i>Mpi</i>	+	1	7	6	e
Glucosio fosfato isomerasi	5.3.1.9	<i>Gpi</i>	-	3	8	6	c

<sup>^</sup>Migrazione: + =anodica, - =catodica. \*Sistema Tampone: 1) Tris-Versene-Borato (Brewer e Sing, 1970); 2) Tris-Versene-Maleato (Brewer e Sing, 1970); 3) Fosfato-Citrato (Harris, 1966); 4) Tris-Citrato Discontinuo (Poulik, 1957); 5) Tris-Citrato Continuo (Selander et al., 1971).  
Riferimenti bibliografici: a) Brewer e Sing (1970); b) Shaw e Prasad (1970); c) Selander et al. (1971); d) Ayala et al. (1972); e) Harris e Hopkinson (1976); f) Richardson et al. (1986).

dove  $F_{ST}$  è l'indice di fissazione o varianza standardizzata delle frequenze alleliche dovuta alla suddivisione e  $\alpha=(n/n-1)^2$  con  $n$  il numero delle popolazioni analizzate per taxon. La stima dei tempi di divergenza evolutiva tra due taxa ( $t$ ), espressa in anni, è stata calcolata con il metodo proposto da Nei (1975), dove per campioni di loci neutri e rappresentati per circa un terzo da loci "fast evolving" e da due terzi da loci "slow evolving" e per valori di  $D_{Nei} < 1$ , il tempo di divergenza risulta funzione lineare della distanza genetica secondo la relazione  $t=5 \times 10^6 D_{Nei}$ .

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo studio della diversità genetica di 23 popolazioni sarde di *Hydromantes*, indagata su 33 loci enzimatici, ha confermato la presenza di un elevato differenziamento tra le popolazioni della Sardegna orientale (appartenenti a *H. imperialis*, *H. supramontis* e *H. flavus*) e quelle localizzate nell'Iglesiente, appartenenti a *H. genei*, come già riportato in Nascetti et al. (1996). I due gruppi di popolazioni hanno distanza genetica media molto elevata, pari a  $D_{Nei}=1,7$  (Fig. 3). La loro separazione, da un antenato verosimilmente più simile all'attuale *H. genei* (forma più arcaica in quanto ancora caratterizzata dall'assenza della digametia maschile; Nardi et al., 1986), è probabilmente iniziata con la rotazione della placca sardo-corsa (Alvarez, 1972; Cocozza, 1975; Bellon et al., 1977), a partire dall'Oligocene superiore, 27-30 milioni di anni fa (Lanza et al., 1995; Nascetti et al., 1996). Le oscillazioni climatiche iniziate nel Pliocene e proseguite per tutto il Quaternario hanno plasmato la struttura genetica di questi due grandi gruppi di popolazioni (orientali sarde e *H. genei*) in concomitanza con le diverse situazioni orografiche locali.

Le tre specie localizzate in Sardegna orientale hanno una distribuzione allopatrica e un differenziamento genetico comparabile (distanze genetiche comprese tra 0,46 e 0,49; Tab. III). La specie relativamente più differenziata risulta essere la più settentrionale, *H. flavus*, che presenta 6 loci discriminanti rispetto alle altre due specie più meridionali (*H. flavus* vs *H. supramontis*: *Idh-2*, *6-Pgdh*, *Gapdh*,

Tab. III - Sotto la diagonale: valori medi e intervallo delle distanze genetiche medie tra le specie di *Hydromantes* studiate, calcolate secondo Nei (1972). Sulla diagonale: intervalli di distanze genetiche di Nei nelle singole specie.

Specie	1	2	3	4
1 <i>H. flavus</i>	0,063			
2 <i>H. supramontis</i>	0,473 (0,369-0,540)	(0,066-0,069)		
3 <i>H. imperialis</i>	0,487 (0,412-0,552)	0,464 (0,362-0,601)	(0,047-0,282)	
4 <i>H. genei</i>	1,901 (1,685-2,294)	1,716 (1,548-1,972)	1,526 (1,274-1,791)	(0,012-0,304)

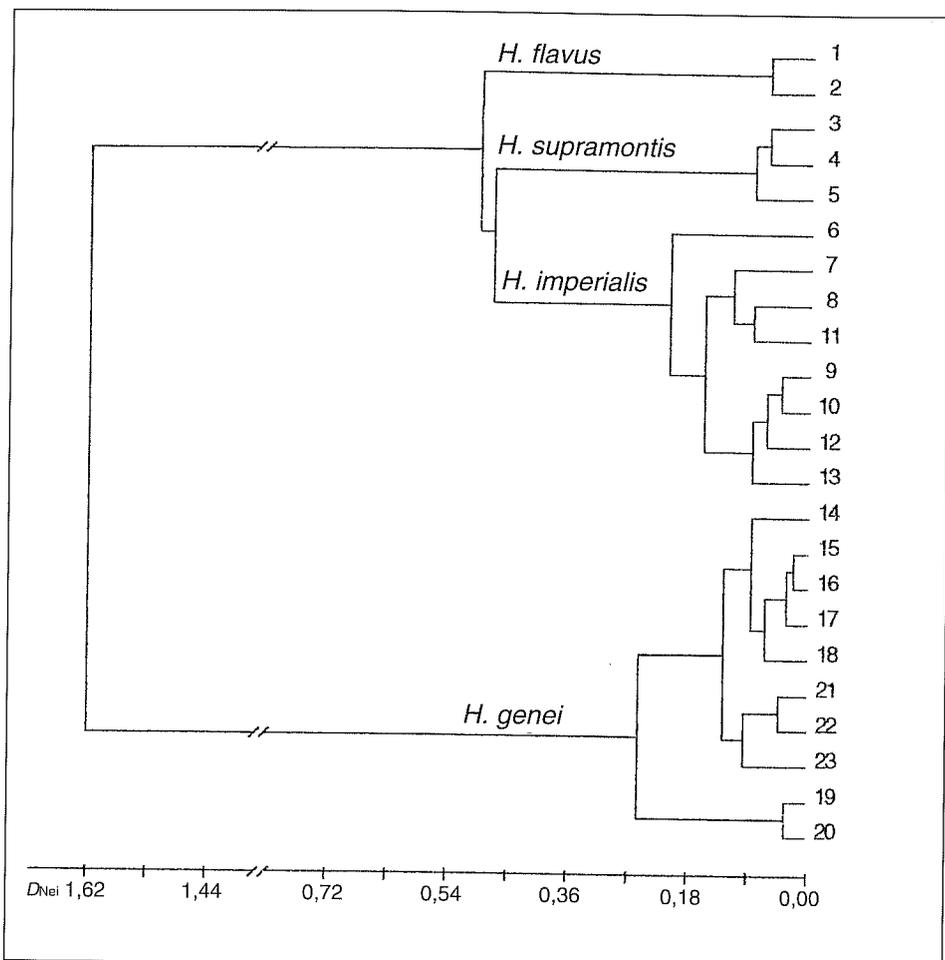


Fig. 2 - Dendrogramma UPGMA realizzato sulle distanze genetiche di Nei (1972) tra le popolazioni analizzate di *Hydromantes* (correlazione cofenetica = 0,982; deviazione standard percentuale, Fitch e Margoliash, 1967=20,723). Per il codice delle popolazioni si veda la Tab. I.

*Pep C, Ada-2, Fum*; *H. flavus* vs *H. imperialis*: *Idh-2, 6-Pgdh, Gapdh, Hbdh, Ca-4, Fum*). Il confronto tra *H. supramontis* e *H. imperialis* mostra invece una situazione più articolata, con tre soli loci completamente discriminanti (*Gapdh, Hbdh, Ada-2*) e otto loci semidiscriminanti, a spiegazione del considerevole valore di distanza genetica osservato (Tab. III, Fig. 2). Entrambe queste specie presentano una notevole frammentazione genetica intraspecifica che trova una possibile interpretazione in un progressivo differenziamento in relazione alla loro distribuzione attorno al massiccio del Gennargentu (Fig. 3). Se si analizza infatti la struttura genetica delle popolazioni di entrambe le specie lungo un ipotetico anello attorno al massiccio, si riscontra in ciascuna specie la presenza di alleli tipici dell'altra

Tab. IV - Parametri di variabilità genetica per le popolazioni di *Hydromantes* studiate: numero medio di alleli per locus ( $A$ ); percentuale di loci polimorfici ( $P_{99}$ ); eterozigosi media per locus attesa ( $H_e$ ). Tra parentesi è riportato l'errore standard (e.s.). Per i codici delle popolazioni si veda la Tab. I.

Codice popolazione	$A$ + e.s.	$P_{99}$	$H_e$ + e.s.
<i>H. flavus</i>			
1	1,4 (+ 0,1)	30,3	0,099 (+ 0,034)
2	1,2 (+ 0,1)	18,2	0,057 (+ 0,025)
Media (+ e.s.) <i>H. italicus</i>	1,3 (+ 0,1)	30,3 (+ 6,0)	0,078 (+ 0,021)
<i>H. supramontis</i>			
3	1,3 (+ 0,1)	24,2	0,062 (+ 0,023)
4	1,4 (+ 0,1)	36,4	0,125 (+ 0,037)
5	1,3 (+ 0,1)	27,3	0,109 (+ 0,035)
Media (+ e.s.) <i>H. supramontis</i>	1,3 (+ 0,0)	29,3(+ 3,7)	0,099 (+ 0,019)
<i>H. imperialis</i>			
6	1,1 (+ 0,0)	6,10	0,019 (+ 0,015)
7	1,2 (+ 0,1)	21,2	0,089 (+ 0,031)
8	1,2 (+ 0,1)	15,20	0,060 (+ 0,030)
9	1,0 (+ 0,0)	3	0,016 (+ 0,016)
10	1,3 (+ 0,1)	27,3	0,102 (+ 0,033)
11	1,4 (+ 0,1)	36,4	0,109 (+ 0,032)
12	1,0 (+ 0,0)	3,00	0,014 (+ 0,014)
13	1,2 (+ 0,1)	18,20	0,044 (+ 0,020)
Media (+ e.s.) <i>H. imperialis</i>	1,2 (+ 0,0)	16,3 (+ 4,2)	0,057 (+ 0,014)
<i>H. genei</i>			
14	1,4 (+ 0,1)	24,2	0,106 (+ 0,036)
15	1,2 (+ 0,1)	18,2	0,050 (+ 0,023)
16	1,3 (+ 0,1)	27,3	0,065 (+ 0,024)
17	1,4 (+ 0,1)	30,30	0,089 (+ 0,030)
18	1,2 (+ 0,1)	21,2	0,090 (+ 0,032)
19	1,2 (+ 0,1)	18,2	0,054 (+ 0,025)
20	1,0 (+ 0,1)	3	0,009 (+ 0,009)
21	1,2 (+ 0,1)	18,2	0,060 (+ 0,028)
22	1,3 (+ 0,1)	24,2	0,097 (+ 0,035)
23	1,1 (+ 0,1)	12,1	0,045 (+ 0,024)
Media (+ e.s.) <i>H. genei</i>	1,2 (+ 0,0)	19,7 (+ 2,5)	0,067 (+ 0,009)
Media (+ e.s.) <i>H. genei</i> A (Popolazioni n. 14-18; 21-23)	1,3 (+ 0,0)	22,0 (+ 2,0)	0,075 (+ 0,008)
Media (+ e.s.) <i>H. genei</i> B (Popolazioni n. 19-20)	1,1 (+ 0,1)	10,6 (+ 7,6)	0,032 (+ 0,023)

con frequenze digradanti secondo clini geografici con pendenze diverse ai vari loci. In *H. imperialis*, ad esempio, la popolazione 6 (Fig. 1) si trova sulla destra orografica del fiume Tirso, a una delle estremità dell'anello intorno al Gennargentu, e costituisce il limite nord-occidentale della specie, verso l'areale di *H. supramontis*. Le frequenze alleliche di questa popolazione permettono di classificarla come *H. imperialis* ( $D_{Nei}=0,22$  rispetto alle altre popolazioni di *H. imperialis*, mentre  $D_{Nei}=0,43$  rispetto a *H. supramontis*), ma con dei geni caratteristici di *H. supramontis*. Ai loci *Aat-1* e *Pep-C*, ad esempio, è l'unica popolazione di *H. imperialis* a presentare gli alleli tipici di *H. supramontis*. Inoltre ai loci *Ldh-2* e *Ca-4* presenta sempre alleli tipici di *H. supramontis* così come le popolazioni 7-8 e 11.

Infine in questa popolazione non si riscontra il tipico odore che caratterizza le popolazioni di *H. imperialis* rispetto a tutte le altre popolazioni sarde (Lanza et al., 1986, 1995). Analogamente la popolazione 5 di *H. supramontis* è quella più sud-orientale, verso l'areale di *H. imperialis*. Tra le popolazioni studiate è anche l'unica a presentare ad alta percentuale alleli tipici di *H. imperialis* a 4 dei loci discriminanti tra le due specie:  $\alpha$ -*Gpdh*, *Ldh-1*, *NADH-dh*, *Aat-1*.

La stima dei tempi di separazione  $t$  tra le tre specie della Sardegna orientale (Tab. VI) fa risalire la divergenza delle specie in allopatria ai primi eventi glaciali, a partire dal Pliocene superiore ( $t$  compresi tra 2,4 e 2,3 M.a.).

All'interno delle specie della Sardegna orientale si sono osservati livelli differenti di frammentazione genetica che possono essere correlati alle diverse orografie locali in funzione dell'ampiezza dell'areale e dell'andamento dei periodi glaciali e

interglaciali (Figg. 2 e 3). L'eterogeneità della distribuzione delle frequenze alleliche fra popolazioni conspecifiche segue infatti l'andamento orografico locale, suggerendo ripetuti episodi di contrazione e riespansione delle popolazioni, in accordo con l'alternarsi di condizioni climatiche favorevoli (periodi interglaciali) e sfavorevoli (periodi glaciali). Le contrazioni demografiche e la frammentazione geografica verificatesi durante i periodi glaciali avrebbero promosso processi di divergenza tra gruppi di popolazioni che sarebbero poi tornate in contatto in seguito alle riespansioni dovute all'avvento di favo-

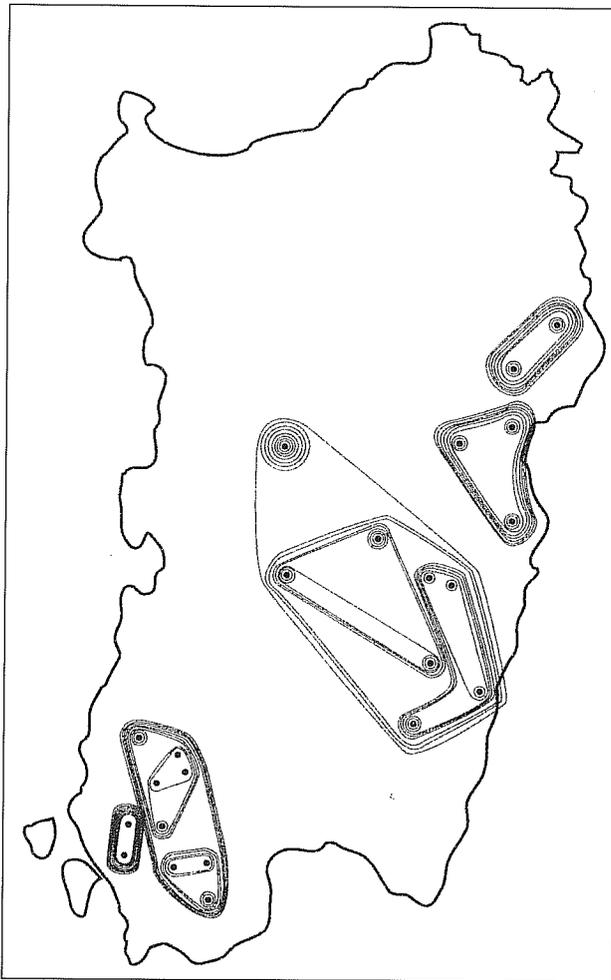


Fig. 3 - Localizzazione delle popolazioni studiate di *H. flavus*, *H. supramontis*, *H. imperialis* e *H. genei* e illustrazione delle isofene della distanza genetica di Nei (1972). L'intervallo tra i livelli è  $D_{Nei}=0,03$ .

Tab. V - Valori di flusso genico stimati con il metodo di Wright (1951) per i taxa di *Hydromantes* studiati.

Taxon	Flusso genico $Nm$
<i>H. flavus</i>	0,19
<i>H. supramontis</i>	0,30
<i>H. imperialis</i>	0,11
<i>H. genei</i>	0,10
<i>H. genei</i> A	0,25
<i>H. genei</i> B	0,38

revoli periodi interglaciali, originando delle zone di “micro-contatto” secondario. A un elevato grado di frammentazione genetica si affiancherebbe di conseguenza un innalzamento della variabilità genetica, dovuto proprio ai contatti fra gruppi di popolazioni differenziate, sia pure limitatamente. A conferma di questo quadro, i dati mostrano in tutte e tre le specie della Sardegna orientale valori di distanza genetica intraspecifica mai inferiori a 0,05 (Tab. III) e quindi piuttosto elevati, associati a livelli di flusso genico molto bassi ( $0,1 < Nm < 0,3$ , Tab. V), entrambi indici di una forte frammentazione genetica delle popolazioni. Inoltre i valori di variabilità genetica osservati sono notevolmente alti: ad esempio l'eterozigosi  $H_e$  è compresa tra 0,10 e 0,06 in *H. flavus*, tra 0,12 e 0,06 in *H. supramontis* e tra 0,11 e 0,09 tra le popolazioni di *H. imperialis* localizzate in prossimità di zone orograficamente più complesse (popolazioni 7, 8, 10, 11).

Gli *Hydromantes* dell'Iglesiente, caratterizzato da un'orografia meno complessa rispetto alla Sardegna orientale, sono suddivisibili in due taxa differenziati (*H. genei* A e *H. genei* B;  $D_{Nei}=0,25$ ) che, allo stato attuale, non sembrano presentare flusso genico. Le popolazioni geograficamente più vicine (n. 18 e 19), distano solo 7 chilometri, ma mostrano cinque loci fissati per alleli alternativi: *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Mdh-1*, *Mdhp-1*, *Est-4*). L'areale di *H. genei* B comprende popolazioni periferiche, localizzate esclusivamente nel Sulcis settentrionale, che oggi appaiono relativamente omogenee ( $D_{Nei}=0,013$ ) e poco variabili ( $H_e$  media pari a 0,03). È interessante sottolineare come la distribuzione di queste popolazioni sia coincidente

Tab. VI - Valori medi e intervallo (tra parentesi) delle distanze genetiche medie (Nei, 1972) e delle stime del tempo di divergenza (in milioni di anni) calcolata secondo Nei (1975) tra taxa di *Hydromantes* studiati.

Taxa confrontati	Tempo di divergenza $t$ (milioni di anni)
<i>H. flavus</i> vs <i>H. supramontis</i>	2.365 (1.845-2.700)
<i>H. flavus</i> vs <i>H. imperialis</i>	2.435 (2.060-2.760)
<i>H. supramontis</i> vs <i>H. imperialis</i>	2.320 (1.810-3.005)
<i>H. genei</i> A vs <i>H. genei</i> B	1.265 (1.015-1.520)

con l'areale italiano di *Buxus balearica* Lam. (Martinoli, 1950) e come entrambe queste entità siano attualmente minacciate dal forte impatto delle attività estrattive condotte nell'area di Barbusi. Tra le popolazioni di *H. genei* A, si riscontra un certo grado di differenziamento tra quelle che occupano rispettivamente i massicci settentrionale (popolazione 14-18) e meridionale (popolazioni 21-23) dell'Iglesiente, separati dalle valli dei fiumi Cixerri e Flumentepido (Figg. 2 e 3;  $D_{Nei}=0,12$ ). Tali valli hanno agito da barriera durante le transgressioni marine del Pleistocene medio, al termine delle quali i due gruppi di popolazioni hanno ristabilito un flusso genico, come indicato dall'andamento clinale delle frequenze ad alcuni loci che presentano alleli alternativi ad alta frequenza nelle popolazioni più settentrionali o meridionali (*Pgm-1*, *NADH-dh*, *Mdkp-1*, *Est-4*), frequenze digradanti nelle popolazioni intermedie e dalla presenza nel massiccio meridionale di una popolazione (n. 18) più affine geneticamente a quelle del massiccio settentrionale. Il processo di divergenza tra *H. genei* A e B e tra i due gruppi di popolazioni all'interno di *H. genei* A è probabilmente iniziato in condizioni di peripatria durante il Pleistocene medio ( $t=595.000$  anni).

## CONCLUSIONI

I due grandi gruppi di popolazioni di *Hydromantes* che abitano la Sardegna si sono probabilmente originati in seguito a una doppia colonizzazione dell'isola: la prima da parte del progenitore di *H. genei*, quando la microplacca sardo-corsa si è separata dal continente nel tardo Oligocene; la seconda durante la crisi di salinità del Messiniano da parte di una forma continentale che in seguito avrebbe originato i tre taxa della Sardegna orientale (Nascetti et al., 1996).

I forti cambiamenti climatici iniziati nel Pliocene e caratterizzanti tutto il Quaternario, agendo in concomitanza con le diverse condizioni orografiche locali, hanno plasmato la struttura genetica attuale di questi due gruppi di popolazioni. Così l'isolamento presso il Monte Albo ha determinato la nascita di *H. flavus*; l'isolamento presso i monti di Oliena-Orgosolo-Urzulei, le montagne costiere tra Dorgali e Baunei e sugli altopiani isolati che caratterizzano i Tacchi d'Ogliastra e tutta la Barbagia attorno al massiccio del Gennargentu, il Gerrei e il Sarcidano hanno invece dato vita, con i successivi contatti secondari intercorsi nel Quaternario, a quella che sembra essere una distribuzione ad anello attorno al massiccio del Gennargentu di forme intermedie tra *H. supramontis* e *H. imperialis*, il cui relativo status tassonomico rimane quindi da approfondire. Riguardo a *H. genei*, nell'Iglesiente osserviamo differenti forme in aree montuose diverse e contigue, tra le quali il flusso genico ricostituitosi più volte ha impedito l'insorgere di un differenziamento cospicuo. Un processo di divergenza sembra invece essersi attuato in un nucleo di popolazioni ai margini dell'areale, probabilmente in situazioni di collo di bottiglia, identificate come *H. genei* B.

Il meccanismo di speciazione mediante il quale si sono originati gli attuali taxa di *Hydromantes* è probabilmente di tipo allopatrico, come più volte visto nei Pletodontidi (Brown, 1974; Arnold, 1977; Highton e Webster, 1976; Larson e Highton, 1978; Larson et al., 1984; Larson e Chippindale, 1993; Arnold et al., 1993). Un processo di speciazione per accumulo di divergenza in allopatria a causa di barriere estrinseche sembra lo scenario più probabile. In particolare, dalla letteratura esistente risulta che in Sardegna, a differenza della Corsica, dal tardo Pliocene a oggi non si sono mai formate rilevanti coperture glaciali permanenti, né sono mai stati segnalati depositi di origine strettamente glaciale. Le barriere estrinseche che hanno causato l'isolamento sono da ricercarsi quindi nelle variazioni climatiche che, agendo su un'articolata orografia, hanno relegato gli *Hydromantes* in isole ecologiche con condizioni idonee di umidità e temperatura, tali da consentirne la sopravvivenza. A favore di tale ipotesi stanno la struttura genetica estremamente frammentata e strutturata geograficamente, i bassi livelli di flusso genico, la corrispondenza tra le stime dei tempi di divergenza tra i taxa esaminati e quegli eventi paleogeografici e paleoclimatici che possono aver determinato l'insorgenza di barriere estrinseche (in particolar modo l'alternanza di periodi glaciali e interglaciali e le forti oscillazioni climatiche plio-pleistoceniche), l'elevata variabilità genetica dovuta ai "micro-contatti" secondari verificatisi dopo la divergenza in allopatria. Inoltre le aree geografiche di rifugio in cui si è verificata la divergenza dei taxa studiati, sono coincidenti con centri di endemismo per altri organismi molto diversi tra loro, e per i quali viene ipotizzata una divergenza dovuta ai fenomeni glaciali (AA.VV., 1983; La Greca, 1984; Pignatti, 1994). In particolar modo risultano assolutamente coincidenti sia la distribuzione dei taxa orientali di *Hydromantes* con gli areali di alcune piante montane endemiche del sottosectore floristico dei monti calcarei della Sardegna centro-orientale attorno al massiccio del Gennargentu (Arrigoni, 1983), sia la distribuzione di *H. genei* A e B con gli areali del bosso delle Baleari (Martinoli, 1950) o altre piante del sottosectore delle montagne silicee del distretto sulcitano, distribuite nei due massicci meridionale e settentrionale dell'Iglesiente (Arrigoni, 1983).

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano le seguenti persone e gruppi speleologici che ci hanno aiutato nei campionamenti del materiale sul campo: P. Agnelli, P. Barca, G. Bartolo, G. Boe, S. Burranca, G. e G. Calia, B. Campolmi, P. Caredda, F. Cioni, F. Congiu, O. Corona, M. Corsi, S. Cossu, L. Cuccu, R. Curreli, P. Fabiani, E. Fanni, C. Grippa, F. Innocenti, M. Lanza, P.G. Lanza, L. Lanzarini, A. Lecis Bartolo, P. Leo, P. Lospalluto, C. Littarru, P. Magrini, P. Melanotti, A. Melis, G. Milanese, A. Mochi Lanza, A. Morisi, A. Nistri Vanni, L. Ninu, A. e M. Papini, A. Pennisi,

P. Pippere, A. e P. Piras, G. Porcu, R. Puxeddu, I. Sanalidro, N. Sanfilippo, A. Sias, R. Simoni, G. Sulis, F. Tarducci, S. Vanni, M. Villani, Gruppo Ricerche Speleologiche "E.A. Martel" di Carbonia (Cagliari), Gruppo Speleologico Santadese di Santadi (Cagliari), Gruppo Speleologico Sassarese di Sassari, Speleo Club Cagliari, Speleo Club Domusnovas (Cagliari). Si ringrazia inoltre particolarmente P. Fabiani per la realizzazione delle figure. Le ricerche sono state condotte grazie a contributi dell'Accademia Nazionale dei Lincei, Commissione Musei Naturalistici, del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) e del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST, 40%).

## BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. 1983 - Il popolamento animale e vegetale della Sardegna. Lav. Soc. Ital. Biogeogr. (n.s.), VIII (1980), Tipografia Valbonesi, Forlì.
- ALVAREZ W. 1972 - Rotation of the Corsica-Sardinia microplate. *Nature*, 235: 103-105.
- ARNOLD S.J. 1977 - The evolution of courtship behavior in New World salamanders with some comments on Old World salamandrids, pp 141-183. In: D.H. Taylor, S.I. Guttman (Eds.), *The reproductive biology of amphibians*. Plenum, New York.
- ARNOLD S.J., REAGAN N.L., VERREL P.A. 1993 - Reproductive isolation and speciation in plethodontid salamanders. *Herpetologica*, 49: 216-228.
- ARRIGONI P.V. 1983 - Aspetti corologici della flora sarda. Lav. Soc. Ital. Biogeogr.(n.s.), VIII (1980): 83-110.
- AYALA F.J., POWELL J.R., TRACEY M, MOURAO C.A., PEREZ-SALAS S., 1972 - Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 70: 113-139.
- BELLON H., COULON C., EDEL J.B. 1977 - Le déplacement de la Sardaigne. Synthèse des données géochronologiques, magmatiques et paléomagnétique. *Bull. Soc. Geol. France*, XIX: 825-831.
- BERTOLANI-MARCHETTI D. 1985 - Pollen paleoclimatology in the Mediterranean since the Messinian time. In: D.J. Stanley, F.C. Wezel (eds.), *Geological evolution of the Mediterranean Basin*, pp. 525-543. Springer-Verlag, New York.
- BREWER G.J., SING C.F., 1970 - *An Introduction to Isozyme Techniques*. Academic Press, New York and London.
- BROWN C.W. 1974 - Hybridization among the subspecies of the plethodontid salamander *Ensatina eschscholtzi*. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 98: 1-64.
- COCUZZA T. 1975 - Structural pattern of Sardinia. In: *Structural model of Italy*. Quaderni del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), pp. 183-201.
- CROW J.F., AOKI K. 1984 - Group selection for a polygenic behavior altrait: estimating the degree of a population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6073-6077.
- ELSTON R.C., FORTHOFFER R., 1977 - Testing for Hardy-Weimberg equilibrium in small samples. *Biometrika*, 33: 536-542.
- FITCH W.M. e MARGOLIASH E. 1967 - Construction of phylogenetic trees. *Science*, 155: 279-284.
- HALDANE J.B.S. 1954 - An exact test for randomness of mating. *J. Hered.*, 80: 631-635.
- HARRIS H. 1966 - Enzyme polymorphism in man. *Proc. Roy. Soc. London*, ser. B, 164: 298-310.
- HARRIS H. e HOPKINSON D.A. 1976 - *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland publishing Company Inc., New York.
- HIGHTON R., WEBSTER T.P. 1976 - Geographic protein variation and divergence in populations of the salamander *Plethodon cinereus*. *Evolution*, 30: 33-45.
- HOWARD J.H., SEEB L.W., WALLACE R. 1993 - Genetic variation and population divergence in the *Plethodon vandykei* group (Caudata: Plethodontidae). *Herpetologica*, 49: 238-247.
- KOEHN R.K., EANES W.F. 1978 - Molecular structure and protein variation within and among populations. *Evol. Biol.*, 11: 39-100.
- LA GRECA M. 1984 - L'origine della fauna italiana. *Le Scienze*, 32: 219-237.
- LANZA B. 1983 - Ipotesi sulle origini del popolamento erpetologico della Sardegna. Lav. Soc. Ital. Biogeogr. (n.s.), VIII (1980): 723-744.
- LANZA B., NASCETTI G., BULLINI L. 1986 - A new species of *Hydromantes* from eastern Sardinia and its genetic relationship with the other Sardinian plethodontids (Amphibia, Urodela). *Boll. Mus. Reg. Sc. Nat. (Torino)*, 4: 261-289.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G., BULLINI L. 1995 - Morphologic and genetic studies on the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*). Museo Regionale di Scienze Naturali, Monografie XVI, Torino, pp. 366.

- LARSON A., HIGTON R. 1978 - Geographic protein variation and divergence in the salamanders of the *Plethodon welleri* group (Amphibia: Plethodontidae). *Syst. Zool.*, 27: 431-438.
- LARSON A., WAKE D.B., YANEV K.P. 1984 - Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, 108: 293-308.
- LARSON A., CHIPPINDALE P. 1993 - Molecular approaches to the evolutionary biology of plethodontid salamanders. *Herpetologica*, 49: 204-215.
- MARTINOLI G. 1950 - *N. Giorn. Bot. Ital.*, 56: 557-575.
- MAYR E. 1954 - Changes of genetic environment and evolution. In: J. Huxley, A.C. Hardy, B. Ford (eds.), *Evolution as a process*. Allen & Unwin, London: 157-180.
- MAYR E. 1982 - Process of speciation in animals. In: C. Barigozzi (ed.), *Mechanism of speciation*. Liss, New York.
- NARDI I., ANDRONICO F. DE LUCCHINI S., BATTISTONI R. 1986. Cytogenetics of the European plethodontid salamanders of the genus *Hydromantes* (Amphibia, Urodela). *Chromosoma*, 94: 377-388.
- NASCETTI G., ANDREONE F., CAPULA M., BULLINI L. 1988. A new Salamandra species from southwestern Alps. *Boll. Mus. Reg. Sc. Nat. (Torino)*, 6: 617-638.
- NASCETTI G., CIMMARUTA R., LANZA B., BULLINI L. 1996 - Molecular taxonomy of european Plethodontid Salamanders (Genus *Hydromantes*). *J. of Herpetology*, 30 (2): 161-183.
- NEI M. 1972 - Genetic distance between populations. *Amer. Nat.*, 106: 283-292.
- NEI M. 1975 - *Molecular population genetics and evolution*. Am. Elsevier, New York.
- NEI M. 1978 - Estimations of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- PIGNATTI S. 1994 - *Ecologia del paesaggio*. Utet, Torino
- POULIK M.D. 1957 - Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180: 1477.
- RICHARDSON R.H., BAVERSTOCK P.R., ADAMS M. 1986 - Allozyme Electrophoresis. *A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. Academic Press, New York.
- SARICH V.M. 1977 - Rates, sample sizes and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. *Nature*, 263: 24-28.
- SELANDER R.K., SMITH M.H., YANG S.Y., JOHNSON W.E., GENTRY J.B. 1971 - Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I; Variation in the old-field mouse *Peromyscus polionotus*. In: *Studies in Genetics*, VI. Univ. Tex. Publ. 7013, 6: 49-90.
- SHAW C.R., PRASAD R. 1970 - Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4: 297-320.
- SLATKIN M. 1987 - Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236: 787-792.
- SOKAL R.R., SNEATH P.H. 1963 - *Principles of numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- WEST R.G. 1969 - *Pleistocene geology and biology*. Longmans, Green and Co., LTD, London.
- WRIGHT S. 1943 - Isolation by distances. *Genetics*, 16: 97-159.
- WRIGHT S. 1951 - The genetical structure of population. *Ann. Eugen.*, 15: 323-354.