

Glaciazioni del Quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae)

GIANLUCA FORTI* - ***, ROBERTA CIMMARUTA*,
GIUSEPPE NASCETTI**, 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*, Glaciations, Genetic divergence, Geographic variation.

SUMMARY

32 populations of *Hydromantes* plethodontid salamander have been studied from the mainland part of the genus range. The obtained results have shown a remarkable discontinuity between geographically subdivided groups of populations, related to different local orographies. Their genetic variation has been investigated by means of allozyme electrophoresis at 34 enzyme loci. The collected data suggest both an influence of the Quaternary glaciations on the present population genetic structure and a geographic divergence model of speciation.

INTRODUZIONE

Gli *Hydromantes* sono anfibi subtroglofilo che necessitano di umidità elevata e temperature relativamente basse e della presenza di rifugi che garantiscano tali condizioni anche durante la stagione secca. Le variazioni climatiche del Quaternario hanno sicuramente condizionato la sopravvivenza di tali animali in diverse aree geografiche.

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 e quelli interglaciali da clima più mite e umido. Le variazioni dei piani altitudinali della vegetazione determinatesi durante i periodi glaciali hanno obbligato la vegetazione arborea a rifugiarsi in quei siti lungo le coste e più ancora in aree medio-montane, dove ancora si verificavano

Tab. I – Elenco e numero progressivo delle popolazioni di *Hydromantes* campionate, con le 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. italicus</i>				
1	Valle del fiume Salinello – Teramo, Abruzzo	42°45'08"	13°37'30"	6
2	Presso Genga – Ancona, Marche	43°23'56"	12°56'22"	8
3	Presso Gubbio – Perugia, Umbria	43°21'23"	12°34'46"	5
4	Presso S. Marino - Repubblica di S. Marino	43°40'05"	12°22'23"	10
5	Presso Fulignano – Firenze, Toscana	43°54'39"	11°15'25"	35
6	Monti della Calvana – Firenze, Toscana	43°56'03"	11°09'59"	12
7	Presso Piteccio – Pistoia, Toscana	43°59'52"	10°53'25"	15
8	Presso Porretta Terme – Bologna, Emilia Romagna	44°07'57"	10°56'13"	7
9	Presso Carpineti – Reggio Emilia, Emilia Romagna	44°27'24"	10°34'31"	5
10	Presso Sillano – Lucca, Toscana	44°13'34"	10°20'35"	5
<i>H. ambrosii</i>				
11	Presso Forno - Massa Carrara, Toscana	44°05'36"	10°11'03"	22
12	Presso Bedizzano - Massa Carrara, Toscana	44°04'50"	10°07'23"	22
13	Presso Pulica - Massa Carrara, Toscana	44°08'08"	10°03'05"	20
14	Presso La Spezia – La Spezia, Liguria	44°06'01"	09°47'29"	23
15	Presso Pignone – La Spezia, Liguria	44°10'22"	09°43'26"	14
16	Presso Borghetto di Vara – La Spezia, Liguria	44°12'16"	09°42'09"	13
17	Presso Cassana – La Spezia, Liguria	44°12'37"	09°51'27"	34
18	Monte S. Nicolao – La Spezia, Liguria	44°15'07"	09°30'43"	26
<i>H. strinati</i>				
19	Monte Pietra di Vasca - Genova, Liguria	44°15'35"	09°30'43"	36
20	Presso Codolo - Massa Carrara, Toscana	44°22'05"	09°50'26"	11
21	Presso Bardi – Parma, Emilia Romagna	44°42'28"	09°41'52"	7
22	Presso Rapallo - Genova, Liguria	44°20'52"	09°12'25"	14
23	Presso Bargagli - Genova, Liguria	44°26'06"	09°03'27"	18
24	Presso Corega Ligure – Alessandria, Piemonte	44°41'30"	09°20'15"	10
25	Presso Isoverde - Genova, Liguria	44°31'56"	08°51'59"	24
26	Presso Millesimo – Savona, Liguria	44°21'22"	08°12'52"	5
27	Presso Bardineto – Savona, Liguria	44°11'36"	08°08'52"	5
28	Presso Finale Ligure – Savona, Liguria	44°12'57"	08°21'46"	30
29	Presso Toirano – Savona, Liguria	44°08'16"	08°10'09"	27
30	Presso Roburent – Cuneo, Piemonte	44°17'41"	07°53'25"	10
31	Presso Roaschia – Cuneo, Piemonte	44°17'23"	07°25'49"	5
32	Colle S. Bartolomeo – Imperia, Liguria	44°00'04"	07°56'13"	21
33	Presso Cavaronica – Imperia, Liguria	44°00'12"	07°56'46"	14
34	Presso Rocchetta Nervina – Imperia, Liguria	43°53'30"	07°35'07"	6
35	Presso Tenda - Francia	44°15'42"	07°45'18"	10
36	Presso Luceram - Francia	43°52'31"	07°14'50"	4
37	Presso Peille - Francia	43°48'25"	07°15'10"	13
38	Presso Aspremont - Francia	43°46'48"	07°14'31"	15

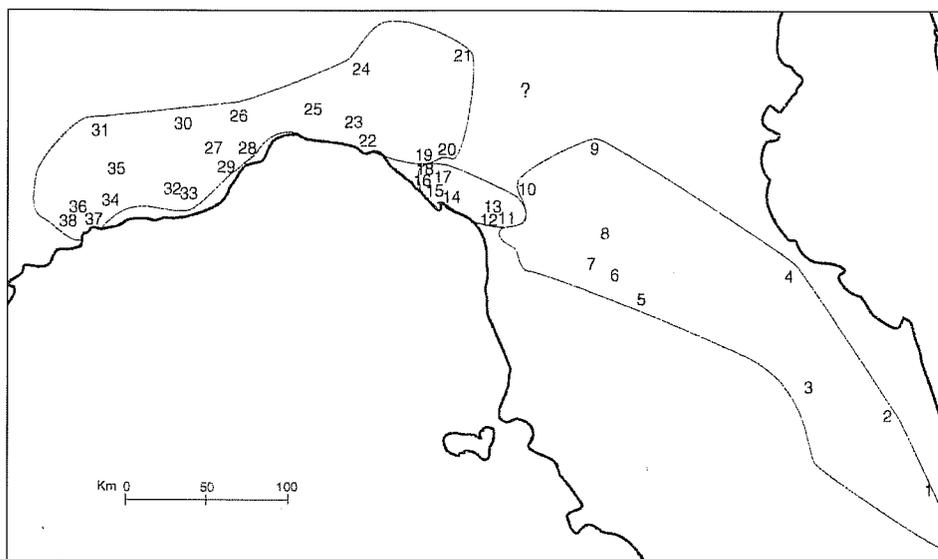


Fig. 1 - Localizzazione delle popolazioni di *Hydromantes* studiate e degli areali delle specie considerate: *H. italicus* (popolazioni 1-10); *H. ambrosii* (popolazioni 11-18); *H. strinatii* (popolazioni 14-38). Gli areali sono stati disegnati sulla base dei dati di Lanza et al., 1995 e altri dati non pubblicati.

precipitazioni piovose. Le attuali conoscenze sull'ecologia degli *Hydromantes* (Salvidio et al., 1994; Lanza et al., 1995; Forti et al., 1997) ci inducono a pensare che i periodi glaciali abbiano determinato, da una parte, l'isolamento delle popolazioni di questo genere in quei siti dove i boschi chiusi fossero in grado di fornire copertura e un adeguato grado di umidità, e dall'altra l'estinzione di popolazioni intrappolate in aree a clima continentale-freddo. I periodi interglaciali invece hanno favorito processi di espansione e ricolonizzazione a opera delle popolazioni superstiti che hanno seguito l'innalzamento dei piani vegetazionali.

Questi fenomeni di ripetute espansioni e riduzioni delle popolazioni sono stati spesso individuati come la causa che ha modellato gli areali e la struttura genetica di molte specie animali e vegetali, dando loro delle caratteristiche peculiari in funzione dell'orografia locale.

Di sicuro interesse risulta quindi lo studio dei processi microevolutivi innescati dalle glaciazioni in organismi quali gli *Hydromantes*, che sono caratterizzati da una bassa vagilità e da un'evoluzione molecolare svincolata dal differenziamento morfologico (Lanza et al., 1995; Nascetti et al., 1996).

MATERIALI E METODI

Lo studio della diversità genetica è stato condotto su 567 individui campionati in 38 popolazioni continentali di *Hydromantes* (Tab. I; Fig. 1) appartenenti alle seguenti specie: *H. italicus* (popolazioni 1-10), *H. ambrosii* (popolazioni

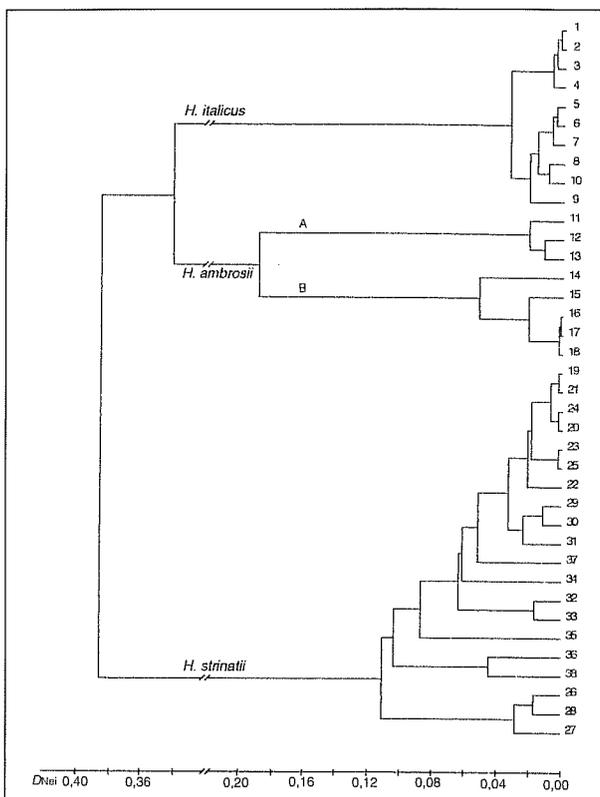


Fig. 2 - Dendrogramma UPGMA realizzato sulle distanze genetiche di Nei (1972) tra le popolazioni analizzate di *Hydromantes* (correlazione cofenetica=0,955; deviazione standard percentuale, Fitch e Margoliash, 1967=23,083). Per il codice delle popolazioni si veda la Tab. I.

11-18), *H. strinatii* (popolazioni 19-38).

Da ogni singolo individuo è stato estratto un omogeneato di muscolo che è stato analizzato mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido. Sono stati indagati 34 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 analizzati comprende circa un terzo di loci "fast evolving" e due

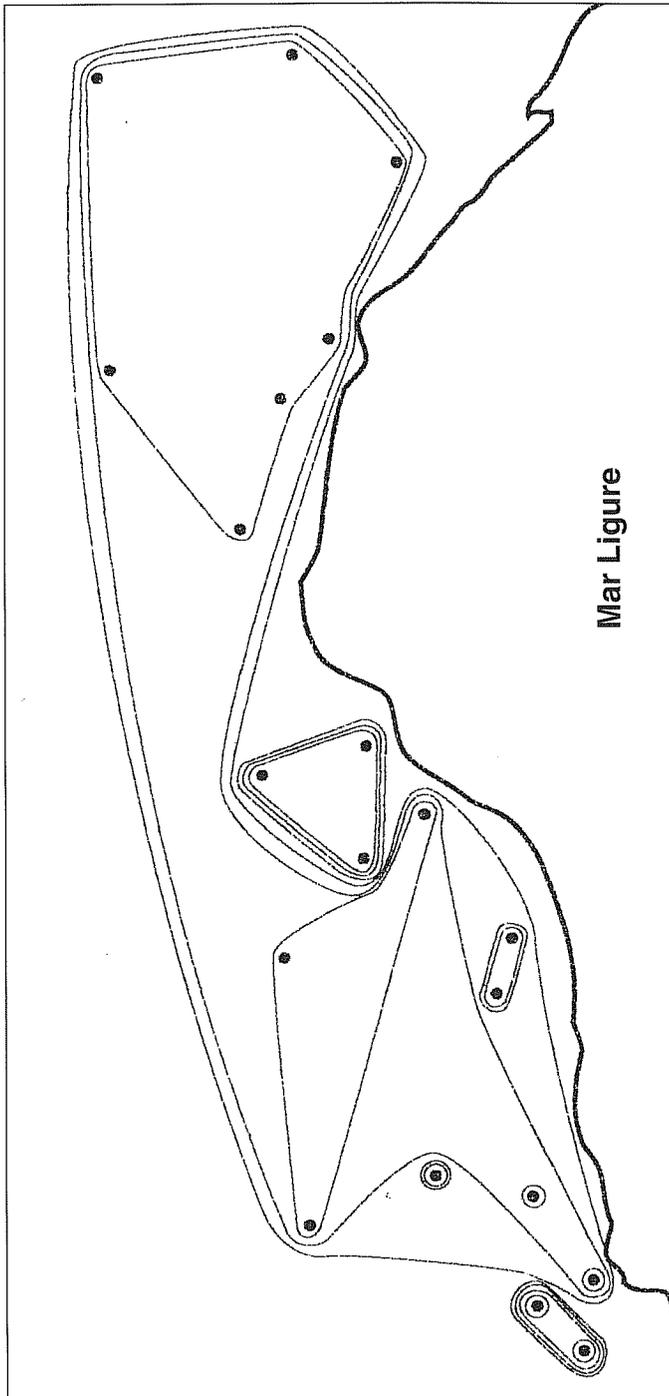
terzi di loci "slow evolving", sensu Sarich (1977) e Koehn ed Eanes (1978).

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 osservata (H_o) e attesa (H_e) per locus (Nei, 1978). La significatività statistica dello scostamento delle frequenze dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è stata valutata attraverso il test del χ^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

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	Migratz. [^]	Sistema tampone*	V/cm	Tempo (h)	Rifer. bibl.
α -Glicerofosfato deidrogenasi	1.1.1.8	<i>α-Gpdh</i>	+	3	8	6	d
Lattato deidrogenasi	1.1.1.27	<i>Ldb-1</i> <i>Ldb-2</i>	+ -	4	7	5	a
Idrossibutirrato deidrogenasi	1.1.1.30	<i>Hbdb</i>	+	2	7	6	b
Malato deidrogenasi	1.1.1.37	<i>Mdb-1</i> <i>Mdb-2</i>	+ +	3	8	6	b
Malato deidrogenasi (NADP+)	1.1.1.40	<i>Mdbp-1</i> <i>Mdbp-2</i>	+ +	5	7	6	d
Isocitrato deidrogenasi	1.1.1.42	<i>Idb-1</i> <i>Idb-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	<i>NADH-db</i>	+	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
Anidrase carbonica	4.2.1.1	<i>Ca-2</i> <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

[^] 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).



Mar Ligure

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

Tab. III - Sotto la diagonale: valori medi e intervallo (tra parentesi) delle distanze genetiche medie fra le specie di *Hydromantes* studiate, calcolate secondo Nei (1972). Sulla diagonale: intervallo di distanze genetiche di Nei nelle singole specie. Sopra la diagonale: tempi di divergenza tra le specie (in milioni di anni), stimati secondo Nei, 1975.

Specie	1	2	3
1 <i>H. italicus</i>	(0.002-0.046) (1.400-2.010)	1.705 (1.650-2.690)	2.075
2 <i>H. ambrosii</i>	0.341 (0.280-0.402)	(0.001-0.218)	1.710 (1.155-2.440)
3 <i>H. strinatii</i>	0.415 (0.330-0.538)	0.342 (0.231-0.488)	(0.001-0.169)

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 immigrazione in una popolazione e N la dimensione effettiva della popolazione, secondo la formula: $Nm = [(1/F_{ST}) - 1]/4\alpha$ 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 sulla diversità genetica in 38 popolazioni continentali di *Hydromantes*, indagata su 34 loci enzimatici, ha mostrato discontinuità notevoli tra grandi gruppi geografici di popolazioni. Le popolazioni studiate infatti risultano appartenere a tre distinte specie: *H. italicus*, *H. ambrosii* e *H. strinatii*. Queste specie presentano tra loro un livello di differenziamento comparabile (D_{Nei} comprese tra 0,34 e 0,41; Tab. III), dovuto al fissarsi di varianti alleliche alternative a 9-10 loci differenti per ogni coppia di specie considerata.

Come già riscontrato in altri Pletodontidi (Tilley et al., 1990; Arnold et al., 1993), a un differenziamento analogo corrispondono diversi gradi di isolamento riproduttivo, come evidenziato dallo studio di due zone di contatto (Cimmaruta, 1993; Cimmaruta et al., 1989; 1991; 1992; 1995; Nascetti et al., 1996; Forti et al., 1997). Tra *H. ambrosii* e *H. strinatii* è stata individuata in Liguria orientale una zona di parapatria, con le popolazioni eterospecifiche più vicine (popolazioni n. 18 e 19; Fig. 1; Tab. I) distanti meno di un chilometro e con dieci loci fissati per alleli alternativi (*Mdb-2*, *Mdbp-2*, *Idh-2*, *6-Pgdh*,

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 osservata (H_o) e 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}	$H_o + e.s.$	$H_e + e.s.$
<i>H. italicus</i>				
1	1,0 (+ 0,0)	0,0	0,000 (+ 0,000)	0,000 (+ 0,000)
2	1,1 (+ 0,1)	11,8	0,041 (+ 0,022)	0,036 (+ 0,019)
3	1,1 (+ 0,1)	11,8	0,039 (+ 0,019)	0,037 (+ 0,018)
4	1,1 (+ 0,0)	5,9	0,015 (+ 0,011)	0,019 (+ 0,015)
5	1,3 (+ 0,1)	26,5	0,044 (+ 0,018)	0,044 (+ 0,018)
6	1,2 (+ 0,1)	14,7	0,054 (+ 0,025)	0,054 (+ 0,025)
7	1,2 (+ 0,1)	17,6	0,042 (+ 0,017)	0,043 (+ 0,017)
8	1,2 (+ 0,1)	20,6	0,082 (+ 0,031)	0,078 (+ 0,030)
9	1,1 (+ 0,1)	14,7	0,071 (+ 0,031)	0,067 (+ 0,029)
10	1,3 (+ 0,1)	23,5	0,075 (+ 0,028)	0,070 (+ 0,026)
Media (+ e.s.) <i>H. italicus</i>	1,16 (+ 0,03)	14,71 (+ 2,52)	0,046 (+ 0,01)	0,045 (+ 0,01)
<i>H. ambrosii</i>				
11	1,3 (+ 0,1)	23,5	0,072 (+ 0,029)	0,076 (+ 0,030)
12	1,3 (+ 0,1)	23,5	0,058 (+ 0,025)	0,071 (+ 0,027)
13	1,2 (+ 0,1)	17,6	0,042 (+ 0,021)	0,059 (+ 0,026)
14	1,2 (+ 0,1)	20,6	0,037 (+ 0,017)	0,049 (+ 0,019)
15	1,1 (+ 0,1)	11,8	0,039 (+ 0,020)	0,046 (+ 0,023)
16	1,1 (+ 0,0)	5,9	0,008 (+ 0,006)	0,007 (+ 0,005)
17	1,1 (+ 0,1)	8,8	0,017 (+ 0,011)	0,019 (+ 0,012)
18	1,1 (+ 0,0)	5,9	0,017 (+ 0,012)	0,015 (+ 0,011)
Media (+ e.s.) <i>H. ambrosii</i>	1,18 (+ 0,03)	14,70 (+ 2,66)	0,036 (+ 0,01)	0,043 (+ 0,01)
Media (+ e.s.) <i>H. ambrosii</i> A (Popolazioni n. 11-13)				
	1,27 (+ 0,03)	21,53 (+ 1,97)	0,057 (+ 0,01)	0,069 (+ 0,01)
Media (+ e.s.) <i>H. ambrosii</i> B (Popolazioni n. 14-18)				
	1,12 (+ 0,02)	10,60 (+ 2,73)	0,024 (+ 0,01)	0,027 (+ 0,01)
<i>H. strinatii</i>				
19	1,2 (+ 0,1)	14,7	0,014 (+ 0,007)	0,025 (+ 0,013)
20	1,1 (+ 0,1)	8,8	0,020 (+ 0,012)	0,025 (+ 0,016)
21	1,1 (+ 0,0)	5,9	0,017 (+ 0,013)	0,015 (+ 0,011)
22	1,1 (+ 0,0)	8,8	0,030 (+ 0,017)	0,036 (+ 0,021)
23	1,1 (+ 0,1)	11,8	0,039 (+ 0,021)	0,043 (+ 0,022)
24	1,1 (+ 0,1)	11,8	0,042 (+ 0,023)	0,039 (+ 0,020)
25	1,1 (+ 0,1)	11,8	0,034 (+ 0,018)	0,037 (+ 0,019)
26	1,1 (+ 0,1)	11,8	0,050 (+ 0,025)	0,047 (+ 0,024)
27	1,3 (+ 0,1)	23,5	0,086 (+ 0,030)	0,091 (+ 0,031)
28	1,2 (+ 0,1)	20,6	0,064 (+ 0,028)	0,068 (+ 0,027)
29	1,4 (+ 0,1)	35,3	0,086 (+ 0,028)	0,091 (+ 0,030)
30	1,1 (+ 0,1)	14,7	0,054 (+ 0,025)	0,057 (+ 0,026)
31	1,0 (+ 0,0)	2,9	0,006 (+ 0,006)	0,006 (+ 0,006)
32	1,5 (+ 0,1)	38,2	0,108 (+ 0,030)	0,140 (+ 0,038)
33	1,4 (+ 0,1)	29,4	0,106 (+ 0,033)	0,107 (+ 0,033)
34	1,3 (+ 0,1)	23,5	0,090 (+ 0,030)	0,093 (+ 0,031)
35	1,3 (+ 0,1)	26,5	0,094 (+ 0,031)	0,088 (+ 0,029)
36	1,2 (+ 0,1)	20,6	0,086 (+ 0,032)	0,080 (+ 0,029)
37	1,3 (+ 0,1)	23,5	0,050 (+ 0,020)	0,071 (+ 0,026)
38	1,3 (+ 0,1)	29,4	0,081 (+ 0,026)	0,093 (+ 0,030)
Media (+ e.s.) <i>H. strinatii</i>	1,21 (+ 0,03)	18,68 (+ 2,21)	0,058 (+ 0,01)	0,063 (+ 0,01)
Media (+ e.s.) <i>H. strinatii</i> Pop. appenniniche (n. 19-25)				
	1,11 (+ 0,01)	10,51 (+ 1,09)	0,028 (+ 0,00)	0,031 (+ 0,00)
Media (+ e.s.) <i>H. strinatii</i> Pop. nord-occidentali (n. 26-38)				
	1,26 (+ 0,04)	23,07 (+ 2,64)	0,074 (+ 0,01)	0,079 (+ 0,01)

NADH-dh, *Sod-1*, *Est-4*, *Pep-C*, *Pep-D*, *Ca-2*) (Cimmaruta, 1993; Cimmaruta et al., 1992; 1995; Nascetti et al., 1996). L'analisi genetica di questa zona indica una completa assenza di flusso genico e permette di considerare *H. ambrosii* e *H. strinatii* due buone specie biologiche. Tra *H. italicus* e *H. ambrosii* invece è stata individuata sulle Alpi Apuane una zona ibrida con un'ampiezza di circa 15 Km (Cimmaruta et al., 1989; 1991; Cimmaruta, 1993). In quest'area le due specie presentano introgressione differenziale ai nove loci discriminanti (α -*Gpdh*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Mdh-2*, *NADH-dh*, *Ck*, *Est-4*, *Pep*, *Pgm-2*, *Ca-3*) e gli alleli tipici di *H. italicus* penetrano nel pool genico di *H. ambrosii* per non più di 15 Km (popolazioni n. 11 e 12), mentre ad alcuni loci come *Mdh-2* e *Ca-3* gli alleli caratteristici di *H. ambrosii* arrivano fino a 90 Km dalla zona ibrida (popolazioni n. 5-10). Quanto osservato indica l'esistenza di una barriera parziale al flusso genico che consente di considerare i due taxa come semispecie (Nascetti et al., 1996). *H. italicus* e *H. strinatii* risultano completamente differenziate per nove loci: α -*Gpdh*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Mdh-2*, *NADH-dh*, *Ck*, *Ada-1*, *Ca-2*, *Ca-3*, hanno una struttura genetica che non lascia ipotizzare flusso genico tra di loro e quindi sono da considerarsi specie allopatriche, con le popolazioni note più vicine (popolazioni 10 e 20) distanti circa 40 Km.

All'interno delle singole specie si sono riscontrati livelli differenti di frammentazione genetica che possono essere correlati alle diverse orografie locali in funzione dell'andamento e del susseguirsi di periodi glaciali e interglaciali (Figg. 2 e 3).

In *H. italicus* si osserva una struttura genetica omogenea; si rileva solo un piccolo differenziamento tra le popolazioni più meridionali (popolazioni 1-4) e quelle settentrionali (popolazioni 5-6), che sono come già detto interessate dall'introggressione di alleli caratteristici di *H. ambrosii*, con D_{Nei} non superiori a 0,04 (Fig. 2). Per questa specie l'Appennino non ha costituito una barriera ma un continuum ecologico nelle fasi di espansione degli areali. A conferma di ciò nell'ambito di questa specie si riscontra il livello di flusso genico relativamente più alto ($Nm=0,43$) rispetto alle altre specie che risultano più eterogenee al loro interno. In *H. italicus* la variabilità genetica risulta tendenzialmente bassa rispetto alle altre specie e si presenta più alta in prossimità della zona ibrida delle Alpi Apuane (popolazioni 5-10), proprio in conseguenza dell'ibridazione e introgressione con *H. ambrosii*, mentre risulta molto bassa soprattutto ai limiti meridionali dell'areale (popolazione 1; Tab. IV).

In *H. ambrosii* osserviamo due forme ben differenziate ($D_{Nei}=0,19$) localizzate in aree geografiche ben distinte: *H. ambrosii* A, della Provincia di La Spezia e *H. ambrosii* B, della provincia di Massa Carrara fino al versante occidentale delle Alpi Apuane. Queste due forme sono caratterizzate da quattro loci discriminanti (*Pgm-2*, *NADH-dh*, *Sod-1*, *Ada-1*); attualmente non presentano flusso genico e risultano separate da una barriera estrinseca che è la valle del fiume Magra. Per questi due taxa può essere ipotizzata una divergenza in allopatria

databile al Pleistocene inferiore ($D_{Nei}=0,188$; $t=0,94$ M.a.). Le aree rifugio nel periodo in cui è stimata la divergenza possono essere individuate per i due taxa nelle Alpi Apuane e nella porzione meridionale dell'Appennino Ligure rispettivamente, come evidenziato anche per altri organismi (La Greca, 1970; Mariotti, 1984). Anche le stime indirette di flusso genico presentano per questa specie valori bassissimi, prossimi al limite di risoluzione del metodo ($Nm=0,09$) che tornano a essere più elevati se si considerano le due forme differenziate separatamente. *H. ambrosii* A presenta un valore di Nm relativamente elevato per questi animali ($Nm=0,68$), come pure alti valori di variabilità genetica, sicuramente dovuti alla vicina zona ibrida delle Alpi Apuane (Tab. IV). *H. ambrosii* B se considerato singolarmente, presenta un lieve incremento nel valore di Nm che rimane tuttavia sempre molto basso ($Nm=0,15$), probabilmente a causa di un maggiore differenziamento delle popolazioni della zona di parapatria (popolazioni 16-19) rispetto a quelle presenti nel territorio spezzino (popolazioni 14-15; Fig. 2). Questo taxon inoltre presenta valori più bassi di variabilità genetica (Tab. IV) a causa del maggior grado di fissazione delle popolazioni parapatriche.

In *H. strinati* si osserva una situazione di più elevata eterogeneità, con il grado di diversità genetica non correlabile con le distanze geografiche; in tale specie si evidenzia un gruppo di popolazioni appenniniche con una struttura genetica molto omogenea, valori di flusso genico relativamente alti ($Nm=0,70$) e bassa variabilità genetica, e un gruppo del settore nord-occidentale delle Alpi Liguri e Francesi dove si riscontrano alti valori di variabilità (Tab. IV), bassi valori di flusso genico ($Nm=0,28$) e un maggior differenziamento tra popolazioni (con D_{Nei} fino a 0,15) associato a un notevole grado di frammentazione genetica (Fig. 2; Tab. III) correlabile con l'orografia locale (Fig. 3). La struttura genetica di questo gruppo di popolazioni nord-occidentali permette di riconoscere più nuclei differenziati tra loro, con forme di intergradazione, originatisi probabilmente in seguito alle notevoli riduzioni numeriche delle popolazioni e successive riespansioni con conseguenti microcontatti secondari, causati dalle oscillazioni climatiche del Pleistocene medio e superiore. Nell'ambito di tali popolazioni sono riconoscibili fondamentalmente due nuclei più differenziati (Figg. 2 e 3): il primo, occidentale, localizzato nell'area delle Basses Alpes e Alpi Marittime francesi (popolazioni 36 e 38); il secondo, orientale, localizzato nelle Alpi Liguri nell'area del Finalese e della Val Bormida (popolazioni 26-28). I due nuclei presentano tra loro una distanza genetica media pari a 0,09, corrispondente a un tempo di divergenza stimabile a 450.000 anni fa. L'articolata orografia dell'area ha favorito il sorgere durante le glaciazioni di efficaci barriere estrinseche che hanno portato le popolazioni a divergere in corrispondenza degli stessi bacini idrografici a causa dei frequenti cicli di estinzione e ricolonizzazione. Le tracce dei vari microcontatti secondari si riscontrano nei notevoli livelli di variabilità genetica presentati dalle popolazioni intermedie ai due nuclei più differenziati,

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

Taxon	Flusso genico <i>Nm</i>
<i>H. italicus</i>	0,43
<i>H. ambrosii</i>	0,09
<i>H. ambrosii</i> A	0,68
<i>H. ambrosii</i> B	0,15
<i>H. strinatii</i>	0,21
<i>H. strinatii</i> A (popolazioni appenniniche)	0,70
<i>H. strinatii</i> B (popolaz. nord-occidentali)	0,28

con H_0 compresi tra 0,09 e 0,11 (popolazioni 29, 32-35; Tab. IV). Gli eventi stocastici legati a questi cicli hanno favorito l'affermarsi a livello locale di varianti elettroforetiche, determinando un mosaico nella distribuzione delle frequenze che caratterizza geneticamente le popolazioni di ogni singolo bacino idrografico. Ad esempio tutte le popolazioni delle Alpi Liguri e Francesi hanno delle varianti alleliche tipiche al locus *Ada-2*, le popolazioni del nucleo occidentale ai loci α -*Gpdh* e *Aat-1*, le popolazioni del nucleo orientale ai loci *Pgm-2* e *Mdhp-2*. Inoltre ad altri loci si riscontrano alleli che contribuiscono a offrire un quadro di frammentazione e variabilità a livello delle frequenze alleliche (*6-Pgdh*, *Est-4*, *Mdhp-1*, *Ldh-1*, *Mdh-1*, *Pep D*), in altri si ritrova la presenza di alleli privati, presenti cioè in singole popolazioni, anche con frequenze elevate (*Hbdh*, *Ada-1*, *Ca-3*, *Gpi*, *Got-1*, *Ada-2*) e in altri ancora si ripresentano alleli caratteristici di *H. italicus* (*Ck*, *Ca-2*, *Mdh-2*, *6-Pgdh*). Quest'ultimo caso può essere interpretato come variabilità relitta derivata da un antenato comune e rimasta presente in quest'area per fenomeni stocastici.

In sintesi il quadro della struttura genetica offerto da *H. strinatii* è di un nucleo appenninico di popolazioni omogenee che si estende per oltre 200 Km, spingendosi fino alle Alpi Marittime e che ha ricolonizzato a ogni Interglaciale, in assenza di barriere, i versanti padani, affacciandosi sui versanti tirrenici lungo la valle del Tanaro e incuneandosi verso il mare (Fig. 3). A questo nucleo si contrappongono i due gruppi di popolazioni nord-occidentali già descritti, con una intergradazione di forme intermedie caratterizzate da una struttura genetica peculiare. Tali nuclei sono coincidenti con centri di endemismo individuati per altri organismi, e per i quali viene ipotizzata, come per gli *Hydromantes*, una divergenza dovuta ai fenomeni glaciali (Mariotti, 1984; Martini, 1984; Pignatti, 1994). Come già evidenziato in precedenti lavori, non è riscontrabile una corrispondenza tra il differenziamento genetico osservato e le sottospecie descritte su base morfologica, nell'ambito di *H. strinatii* (Lanza et al., 1995; Nascetti et al., 1996).

Per quanto riguarda la divergenza tra le tre specie studiate, la stima dei tempi di divergenza *t* fa risalire la loro separazione ai primi eventi glaciali del Pleistocene inferiore (*t* compresi tra 2,1 e 1,7 M.a.). Le stime indirette di flusso genico effet-

tuate per le tre specie di *Hydromantes* (Tab. V) evidenziano Nm compresi tra 0,43 e valori prossimi al limite di risoluzione del metodo ($Nm=0,10$; Wright, 1951). Questi valori testimoniano dei livelli di flusso genico molto bassi, come già frequentemente visto per la maggior parte dei Pletodontidi (Larson et al., 1984; Slatkin, 1987; Howard et al., 1993), che indicano la deriva genetica come forza evolutiva prevalente rispetto al flusso genico nel plasmare la struttura genetica, in funzione di una ricorrente frammentazione e riduzione numerica delle popolazioni. Anche i differenti livelli di variabilità genetica riscontrati nelle popolazioni dei diversi taxa (Tab. IV) suggeriscono il ruolo prevalente di eventi stocastici e della deriva nella strutturazione genetica delle popolazioni.

La divergenza tra le tre specie riconosciute sembra aver avuto inizio con i primi fenomeni glaciali del Pleistocene inferiore, in aree geografiche probabilmente identificabili con l'Appennino centrale, le Alpi Apuane e le Alpi e Appennino Ligure, zone che risultano essere state centri di endemismo anche per altri organismi animali e vegetali (Ferrarini, 1970, 1984; La Greca, 1970, 1984; Mariotti, 1984; Pignatti, 1994).

CONCLUSIONI

Lo studio sulla diversità genetica in 38 popolazioni continentali di *Hydromantes*, indagata su 34 loci enzimatici, ha mostrato la presenza di almeno tre buone specie biologiche e, all'interno di queste, di differenti livelli di frammentazione genetica correlabili alle diverse orografie locali.

Il meccanismo di speciazione mediante il quale si sono originate le tre specie è probabilmente di tipo allopatrico, come più volte documentato 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). A favore di tale ipotesi stanno infatti la struttura genetica osservata, 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. Il tipo di distribuzione geografica e la struttura genetica attuale delle tre specie si sono originati a partire dal Pleistocene inferiore. La loro separazione è infatti databile a quest'epoca, mentre la divergenza tra le popolazioni conspecifiche maggiormente differenziate è stimabile al medio Pleistocene. In entrambi i casi l'alternanza di periodi glaciali e interglaciali e le forti oscillazioni climatiche, verificatesi anche nel giro di pochi secoli, hanno agito di concerto con l'orografia nel creare barriere estrinseche a valenza temporale transitoria e nel favorire processi di isolamento, di riduzione della dimensione delle popolazioni, di estinzione locale e di successiva espansione e ricolonizzazione. Un tale scenario, con popolazioni frazionate in nuclei di piccole

dimensioni da fenomeni quali colli di bottiglia o effetto del fondatore, si adatta al modello di speciazione peripatrico proposto da Mayr (1954, 1982). L'alternanza provoca una divergenza in allopatria dovuta a fattori stocastici e successivi contatti secondari che possono determinare "micro-zone ibride" con conseguente aumento della variabilità genetica, come registrato nelle popolazioni nord-occidentali di *H. strinatii*. Alla luce di quanto detto, le zone di contatto evidenziate tra le specie considerate di *Hydromantes* possono essere interpretate come contatti secondari tra taxa che si sono differenziati in allopatria.

È da sottolineare inoltre come le aree geografiche di rifugio individuate come siti in cui ha avuto inizio la divergenza dei taxa individuati (l'Appennino centrale, le Alpi Apuane, l'Appennino Ligure, il Finalese, le Alpi Marittime) siano coincidenti con centri di origine di endemismi per altri organismi, per i quali viene ipotizzata una divergenza dovuta ai fenomeni glaciali (AA.VV., 1970; AA.VV. 1971; AA.VV., 1984; La Greca, 1984; Pignatti, 1994) e di come tali fenomeni geologici abbiano plasmato analogamente organismi molto diversi tra loro. In particolar modo risulta sorprendente l'analogia tra la distribuzione di alcune piante endemiche delle Alpi e dell'Appennino Ligure (Mariotti, 1984) e la distribuzione di alcune forme o taxa di *Hydromantes* delle stesse aree.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano le seguenti persone e gruppi speleologici che ci hanno aiutato nei campionamenti del materiale sul campo: M. Ansaldo, A. Ansini, P. Agnelli, P. Barca, G. Bartolo, G. Bertuccelli, R. Biagi, B. Bianchi, M. Bianchi, T. Bianchi, G. Boe, M. Bologna, M. e E. Bozzano, S. Burranca, G. e G. Calia, B. Campolmi, M. Caporioni, R. Castiglia, G. Catullo, R. e G. Cecchi, F. Cioni, F. Congiu, M. Corsi, L. Cuccu, R. Curreli, C. Di Camillo, A. Di Cicco, P. Fabiani, E. Fanni, C. Grippa, I. Guy, M. Iaconelli, F. Innocenti, M. Lanza, P.G. Lanza, L. Lanzarini, A. Lecis Bartolo, P. Lospalluto, C. Littarru, P. Magrini, P. Melanotti, A. Melis, G. Milanese, A. Mochi Lanza, M. Masi, A. Morisi, A. Nistri Vanni, A. e M. Papini, A. Pennisi, P. Pippere, S. Ricci, M. Rocco, L. Rovelli, I. Sanalidro, N. Sanfilippo, R. Simoni, F. Tarducci, S. Vanni, M. Villani, L. Vitale, S. Zoia, Gruppo Speleologico di Castelnuovo Garfagnano (Lucca), Gruppo Speleologico Emiliano del C.A.I. di Modena, Gruppo Speleologico Fiorentino del CAI di Firenze, Gruppo Speleologico Imperiese del CAI di Imperia, Speleo Club Chieti. 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. 1970 - Il popolamento animale e vegetale delle Alpi Apuane. Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.) I, Tipografia Valbonesi, Forlì.
- AA.VV. 1971 - Il popolamento animale e vegetale dell'Appennino Centrale. Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.) II, Tipografia Valbonesi, Forlì.
- AA.VV. 1984 - Il popolamento delle Alpi Marittime e suoi rapporti con l'Appennino settentrionale. Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.) IX (1982), Tipografia Valbonesi, Forlì.
- 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.
- 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 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.
- 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.
- CIMMARUTA R. 1993 - Ricerche di ecologia genetica ed evolutiva in plethodontidi del genere *Speleomantes* (Amphibia: Plethodontidae). Tesi di Dottorato di Ricerca, Università degli studi "La Sapienza", Roma.
- CIMMARUTA R., NASCETTI G., BULLINI L. 1989 - A hybrid zone between the plethodontid salamanders *Hydromantes italicus* and *H. ambrosii*. Proc. II Congr. E.S.E.B., Roma: 17.
- CIMMARUTA R., NASCETTI G., BULLINI L. 1991 - Genetic structure and microevolution of some European plethodontid salamanders. Proc. 3rd Congr. E.S.E.B., Debrecen, September 1-5: 210.
- CIMMARUTA R., FORTI G., NASCETTI G., BULLINI L. 1992 - Struttura genetica e isolamento riproduttivo ed ecologico in *Speleomantes* della Liguria. V Congr. Naz. S. IT. E., Milano, 21-25 settembre 1992. Università agli studi di Milano.
- CIMMARUTA R., FORTI G., NASCETTI G., BULLINI L. 1995 - Reproductive isolation and parapatric habitat displacement between the sibling species *Hydromantes ambrosii* and *H. strinatii* (Amphibia, Plethodontidae). Fifth Congress of the E.S.E.B., Edinburgh, Scotland, 4-8 september 1995. Abstracts. University of Edinburgh.
- CROW J.F., AOKI K. 1984 - Group selection for a polygenic behavioral trait: 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. *Biometrica*, 33: 536-542.
- FERRARINI E. 1970 - Considerazioni sull'origine della flora e sulle oscillazioni dei piani di vegetazione delle Alpi Apuane. Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.), I: 68-87.
- FERRARINI E. 1984 - Note fitogeografiche sull'Appennino settentrionale nei suoi rapporti con leAlpi Marittime. Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.), IX (1982): 211-2226.
- FITCH W.M., MARGOLASH E. 1967 - Construction of phylogenetic trees. *Science*, 155: 279-284.
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G. e BULLINI L. 1997 - Parapatric e competizione in plethodontidi del genere *Hydromantes*. S.It.E. Atti, 18: 121-124.
- 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. 1970 - Punti di vista sulla storia e sul popolamento animale e vegetale delle Alpi Apuane, emersi in occasione del XVI Congresso della S.B.I. Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.), I: 741-754.
- LA GRECA M. 1984 - L'origine della fauna italiana. *Le Scienze*, 32: 219-237.
- 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.
- MARIOTTI M. 1984 - Flora endemica ligustica del piano basale: rapporti tra settore alpico e appenninico. *Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.)*, IX (1982): 175-210.
- MARTINI E. 1984 - Lineamenti geobotanici delle Alpi Liguri e Marittime: endemismi e fitocenosi. *Lav. Soc. Ital. Biogeog. (n.s.)*, IX (1982): 51-134.
- 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.
- 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.
- SALVIDIO S., LATTES A., TAVANO M., MELODIA F., PASTORINO M.V. 1994 - Ecology of a *Speleomantes ambrosii* population inhabiting an artificial tunnel. *Amphibia-Reptilia*, 15: 35-45.
- 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.
- TILLEY S. G., VERRILL P.A., ARNOLD S.J. 1990 - Correspondence between sexual isolation and allozyme differentiation: a test in the salamanders *Desmognatus ochrophaeus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2715-2719.
- 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.