

VALERIO SBORDONI, MARINA COBOLLI SBORDONI
e ELVIRA DE MATTHAEIS
Istituto di Zoologia dell'Università di Roma

Divergenza genetica tra popolazioni e specie ipogee ed epigee di *Niphargus* (Crustacea, Amphipoda) *

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio la biologia di popolazioni ha ricevuto un notevole impulso dall'utilizzazione della tecnica elettroforetica, che, opportunamente diretta allo studio della mobilità di singole varianti enzimatiche, ha precisato e in gran parte rivoluzionato le nostre conoscenze sulla variabilità genetica delle popolazioni animali e vegetali.

L'elettroforesi permette di riconoscere differenze tra individui negli enzimi e in altre proteine dovute alla loro mobilità in un campo elettrico. Le differenze di carica elettrostatica che condizionano la mobilità sono il risultato di sostituzioni, delezioni o aggiunte nelle sequenze aminoacidiche dei polipeptidi, costituenti le proteine, che a loro volta sono l'effetto di mutazioni nelle sequenze nucleotidiche del gene strutturale.

Prima dell'introduzione di questa tecnica da parte di Harris (1966) e Hubby e Lewontin (1966), lo studio della variazione genetica di popolazioni naturali era insoddisfacente per diverse ragioni. Per la maggior parte dipendeva soprattutto dalla identificazione di rari mutanti recessivi che si manifestavano soltanto allo stadio omozigote o di polimorfismi morfologici e cromosomici che privilegiavano determinati organismi rispetto ad altri come *Drosophila*, varie specie di Lepidotteri e Culicidi, *Cepaea* etc. (v. Ford, 1975). Oggi grazie a queste tecniche è possibile individuare, studiare e misurare differenze genetiche a livello molecolare tra individui, popolazioni e specie nei più svariati gruppi animali e vegetali.

* Lavoro eseguito con un contributo del C.N.R.

Molti problemi della biologia evoluzionistica sono stati recentemente affrontati con queste tecniche con risultati di rilievo. In questa relazione ci interessa sottolineare il ruolo che un loro adeguato uso può svolgere nella comprensione di alcuni problemi biogeografici.

Attraverso lo studio elettroforetico di un campione discreto di individui, di popolazioni e di specie diverse, basato su uno o su numerosi sistemi gene-enzima è possibile infatti affrontare problemi come: differenziamento tra popolazioni e speciazione, valutazione del tasso di introgressione, datazione approssimativa dei tempi di divergenza tra taxa di diverso rango, misura del grado di variabilità genetica, in situazioni clinali, in popolazioni marginali, in popolazioni relitte etc. E' possibile, almeno in alcuni casi, studiare il ruolo del flusso genico, della selezione e della deriva genetica nel mantenimento della variabilità (per recenti rassegne vedi Ayala, 1976; Lewontin, 1974; Nei, 1975). E' inoltre possibile riconoscere l'origine geografica di popolazioni naturalmente o artificialmente introdotte in aree precedentemente non occupate. Quest'ultimo punto è di particolare rilevanza per il biogeografo come mostrano alcuni recenti lavori sui ratti delle Galapagos (Patton et al., 1975) e sulle *Cepaea nemoralis* americane (Brussard, 1975).

I dati che qui presentiamo in via preliminare si riferiscono ad alcuni dei risultati di uno studio sulla variazione genetica indagata a livello elettroforetico su 10 popolazioni cavernicole, freatiche ed epigee di *Niphargus longicaudatus* (Costa) e 1 popolazione epigea dell'affine *Niphargus pasquinii* Vigna Taglianti.

Lo studio era inizialmente diretto:

- 1) a misurare il grado di differenziamento genetico tra popolazioni cavernicole, freatiche, epigee ed insulari della specie *N. longicaudatus*, e verificare o meno l'esistenza attuale di flusso genico e quindi l'eventuale ruolo di barriere geografiche e/o ecologiche;

- 2) confrontare la divergenza genetica interpopolazione, con quella interspecifica paragonando questi risultati con quelli ottenuti dai tassonomi su base morfologica; ricordiamo che a questo proposito i *Niphargus* costituiscono un gruppo «difficile», soggetto a periodiche rivoluzioni sistematiche (Ruffo, com. per.; Vigna Taglianti, 1975);

3) datare approssimativamente la divergenza tra popolazioni su base mutazionale (accumulo di sostituzioni alleliche): una utile, anche se ovviamente approssimativa indicazione da confrontare, ad esempio, con le datazioni su base storica e paleogeografica;

4) studiare eventuali correlazioni tra tasso di variabilità e livelli di stabilità ambientale. Le popolazioni da noi complessivamente studiate si possono infatti allineare lungo uno spettro di condizioni ambientali, dalle grotte e falde freatiche, stagionalmente stabili, alle acque epigee, sorgenti e ruscelli maggiormente variabili nel corso dell'anno. Quest'ultimo punto sarà sviluppato in un successivo lavoro ove viene studiata la variabilità genetica anche di popolazioni di altre specie di *Niphargus* e di *Gammarus* epigei adattati ad ambienti largamente stagionali (acque salmastre).

MATERIALE E METODI

Le popolazioni di *Niphargus longicaudatus* sono state scelte in modo da disporre di un campione rappresentativo sia geograficamente (sono considerate popolazioni insulari e continentali con distanze reciproche variabili da 250 Km circa a 300 m, e distribuite a quote variabili dal livello del mare a oltre 1000 m), sia ecologicamente, tenendo conto dell'ampia valenza ecologica della specie (Fig. 1).

Le località di provenienza del materiale studiato sono riportate qui di seguito, accanto alla sigla in tre lettere della popolazione, n. di catasto (per le grotte), comune, provincia e quota s.l.d.m. e una schematica indicazione sul tipo di habitat. N indica il campione medio di individui della popolazione saggiato per ciascun locus.

Niphargus longicaudatus (Costa)

- 1) Grotta di Stiffe, STI, 17 A, S. Demetrio dei Vestini, L'Aquila, m. 695. Torrente ipogeo in risorgenza carsica. N=27
- 2) Grotta di Beatrice Cenci, CEN, 2A, Verrecchie, L'Aquila, m 1080. Pozze di stillicidio in caverna carsica. N=166
- 3) Ovido di Verrecchie, VER, 3 A, Verrecchie, L'Aquila, m 1025. Inghiottitioio periodico, pozze residue in periodo di secca. N=22
- 4) Grotta dell'Arco (o di Bellegra), BEL, 5 La, Bellegra, Roma, m 410. Ruscello ipogeo in risorgenza carsica. N=22

- 5) Ouso di Pozzo Comune, PCO, 274 La, Carpineto, Roma, m 850. Pozze di stillicidio in inghiottitoio attivo. N=20
 6) Ruderì di Villa Chigi, FOR, Formello, Roma, m 220. Corso d'acqua perenne in cavità artificiale nel tufo. N=67

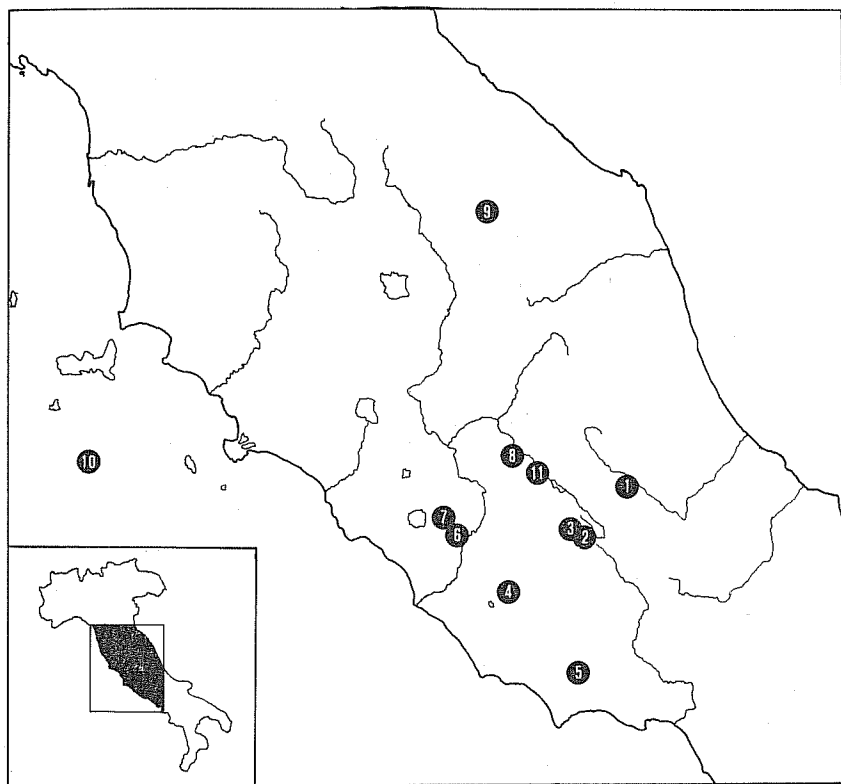


FIG. 1 - Posizione geografica delle popolazioni di *Nipargus longicaudatus* e di *N. pasquinii* utilizzate nel presente studio. Per la numerazione delle località vedi testo.

- 7) Valle del Baccano, BAC, Campagnano, Roma, m 218. Fontanile: falda affiorante. N=74
 8) Pozza di Puzzaro, PUZ, Campo Loniano, Villa Reatina, Rieti, m 450. Falda affiorante. N=16
 9) Scheggia, SCH, Perugia, m 570. Fontanile. N=47
 10) Isola di Montecristo, MON, Arcipelago Toscano, Livorno, m 10. Sorgenti e corsi d'acqua superficiali. N=13

Niphargus pasquinii Vigna Taglianti

11) Sorgenti di S. Vittorino, VIT, Rieti, m 460. Sorgente reocrenica.
N=19

Per ogni popolazione ciascun individuo è stato saggiato per un lotto di enzimi tramite elettroforesi orizzontale su gel, impiegando amido della «Connaught Laboratories, Toronto».

Sono stati adoperati 4 sistemi di tamponi: (A) gel buffer: Tris 76 mM, acido citrico 5 mM, pH 8.65; bridge buffer: acido borico 300 mM, NaOH 60 mM, pH 8.1 (tampone discontinuo di Poulik, Ayala et al., 1972). (B) gel e bridge buffer: Tris 87 mM, acido borico 8.7 mM, EDTA 1 mM, NADP⁺ 21 mM, pH 9.0 (Ayala et al., 1972). (C) gel buffer: Tris 9 mM, acido citrico 3 mM, pH 8.4; bridge buffer: Tris 135 mM, acido citrico 45 mM, pH 8.4 (modificato da Ayala et al., 1972). (D) gel buffer = bridge buffer diluito 1:10; bridge buffer: Tris 100 mM, acido maleico 100 mM, EDTA 10 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.4 (Brewer, 1970). (v. Tab. 1).

Sono stati saggiati i seguenti enzimi. Tra le ossidoreduttasi: Aldeide ossidasi (AO), Tetrazolio ossidasi (TO), Glucoso-6-fosfato deidrogenasi; tra le transferasi: Fosfoglucomutasi (PGM), Glutamico-ossalacetico transaminasi (GOT); tra le idrolasi: Esterasi (EST), Fosfatasi alcalina (APH) Leucina-amino peptidasi (LAP); tra le isomerasi: Fosfoesosoisomerasi (PHI).

Gli zimogrammi presentano un massimo di 18 zone di attività, con variazione indipendente, che in base alla nostra interpretazione riflettono il controllo da parte di un numero corrispondente di loci genici.

Seguendo un costume ormai largamente in uso presso la maggior parte degli autori, i vari loci codificanti per un dato enzima sono stati designati con la sigla dello stesso seguita da un numero progressivo, che sta ad indicare le varie zone di attività enzimatica identificabili nelle piastre, a partire da quella più vicina all'anodo. I vari alleli, a ciascun locus, sono stati indicati con una numerazione che tiene conto della mobilità elettroforetica relativa, espressa in mm, dei rispettivi prodotti enzimatici e riferita all'allozima più frequente indicato come 100.

Tab. 1 - Enzimi studiati e informazioni sommarie sulle tecniche.

Enzima	Sigla	N. di codice	Tampone	Tecniche di colorazione	N. di loci interpretati
Aldeide ossidasi	AO	1.2.3.1	B	Ayala (com. pers.)	2
Esterasi	EST	3.1.1.1	A	Ayala et al. (1972)	4
Fosfatasi alcalina	APH	3.1.3.1	A	Ayala et al. (1972)	3
Glutamico-ossalacetico transaminasi	GOT	2.6.1.1	A	Ayala (com. pers.)	2
Glucoso-6-fosfato deidrogenasi	G ₆ PD	1.1.1.49	B	Ayala (com. pers.)	1
Leucina-amino peptidasi	LAP	3.4.11.1	A	Ayala et al. (1972)	3
Fosfoglucomutasi	PGM	2.7.5.1	D	Brewer (1970)	1
Fosfoisosomerasi	PHI	5.3.1.9	C	Brewer (1970)	1
Tetrazolio ossidasi	TO	1.9.3.1	B	Brewer (1970)	1

Le stime di similarità e di distanza genetica sono state calcolate sulla base di un valore mediano di 15 loci, utilizzando il metodo di Nei ⁽¹⁾.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Una notevole frazione di loci saggiati è risultata polimorfa con un numero medio di alleli per locus variabile a seconda delle popolazioni da 1.86 a 2.44 (questa stima include anche i loci considerati monomorfici, cioè quelli in cui la frequenza dell'allele più comune è maggiore o uguale a 0.99). Per i loci polimorfici sono state ricavate le frequenze genotipiche e quelle alleliche. Le frequenze genotipiche rilevate non si discostano significativamente, salvo rare eccezioni, da quelle attese secondo la formula di Hardy-Weinberg e riflettono una normale segregazione mendeliana con 2 o più alleli codominanti per ciascun locus. La tab. 2 riporta le frequenze alleliche per locus e per popolazione. Sono anche indicati il numero di geni saggiati per popolazione e i valori della eterozigosi attesa e osservata per locus.

Un primo risultato di rilievo è che le frequenze alleliche variano considerevolmente non solo tra le due specie saggiate, ma anche tra le varie popolazioni di *N. longicaudatus*. Indicativo è il paragone per la PHI tra la popolazione della grotta Beatrice Cenci e quella dell'Ovido di Verrecchie, distante non più di 300 metri (Fig. 2).

Differenze comparabili sono state osservate negli altri loci polimorfici. Solo per pochi sistemi gene-enzima, come ad es. APH-1, APH-2, EST-1, un determinato allele mantiene una frequenza alta o è fissato in tutte le popolazioni saggiate.

(1) La similarità genetica media è calcolata secondo la formula di Nei (1972).
Similarità genetica al locus K:

$$J_k = \sum x_i y_i / (\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{1/2}$$

dove x_i e y_i sono le frequenze dell'allele i esimo nelle popolazioni x e y .
Similarità genetica:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

dove J_{xy} , J_x , J_y sono le medie aritmetiche calcolate su tutti i loci di $\sum x_i y_i$, $\sum x_i^2$ e $\sum y_i^2$.

Distanza genetica:

$$D = -\log_e I$$

Con una certa approssimazione D può essere interpretato come il numero medio di sostituzioni aminoacidiche per locus che le due popolazioni hanno accumulato da quando costituivano una unica popolazione ancestrale.

[illegible]

Segue.

GOT-2	N	50	98	30	—	28	60	152	16	88	30	20
	Ha	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	Ho	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	nillo											
LAP-1	N	52	470	50	42	52	194	96	—	94	18	20
	Ha	.075	.481	.216	.251	.000	.000	.257		.042	.523	.000
	Ho	.077	—	—	.286	.000	.000	.250		.043	—	.000
	105				.857			.854				1.00
	104							.125				
	103				.143							
	102							.021				
	100	.962	.600	.880		1.00				.979	.556	
	99	.038								.021		
	nillo		.400	.120			1.00				.444	
LAP-2	N	54	402	50	48	48	194	148	—	—	14	46
	Ha	.660	.095	.490	.121	.082	.482	.474			.439	.488
	Ho	.667	.100	.480	.125	.083	.454	.365			—	.391
	104						.670	.689		.714		
	103	.278					.072	.209				
	102	.444		.600	.042	.042	.258	.101				.065
	100	.278	.950	.400	.938	.958						.696
	98											.174
	97											.065
	95		.050		.021							
	nillo										.286	
LAP-3	N	34	274	36	46	16	90	60	20	108	12	40
	Ha	.000	.184	.510	.043	.000	.044	.345	.268	.654	.000	.000
	Ho	.000	.146	.333	.043	.000	.044	.300	.300	.444	.000	.000

Segue

Questo modello di variazione geografica è piuttosto inconsueto per popolazioni di una stessa specie. Casi analoghi di elevata divergenza, noti dalla letteratura, si riferiscono prevalentemente a popolazioni insulari (Stone et al., 1968; Johnson, 1971), dove il ruolo delle barriere geografiche risulta particolarmente evidente, o a specie fossorie dove la struttura di popolazione è fortemente condizionata dall'isolamento ecologico (Penney et al., 1976). Nei pochi esempi studiati di popolazioni cavernicole le differenze sono dello stesso ordine di grandezza soltanto nel coleottero *Ptomaphagus hirtus* (Laing et al., 1976), mentre appaiono assai più ridotte nei pesci del gen. *Astyanax* (Avise e Selander, 1972) e nell'ortottero *Ceuthophilus gracilipes* (Cockley et al., 1977).

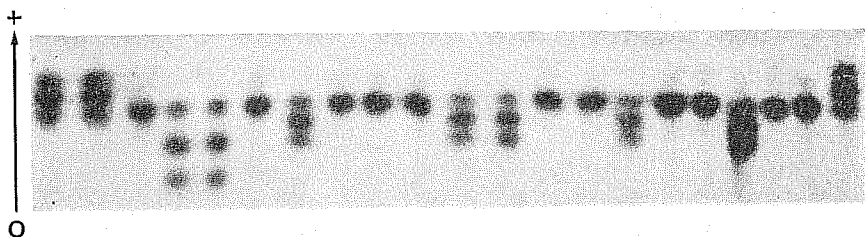


Fig. 2 - Variazione genetica per la PHI in due popolazioni geograficamente vicine di *N. longicaudatus*. La numerazione degli individui è progressiva da sinistra verso destra. 1-10: grotta Beatrice Cenci, 11-20: Ovido di Verrecchie; l'individuo 1 è ripetuto in posizione 21 (controllo). Sono rappresentati complessivamente 4 distinti fenotipi, uno omozigote, PHI^{100}/PHI^{100} (3, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 19, 20) e tre eterozigoti: PHI^{100}/PHI^{95} (7, 11, 12, 15, 18), PHI^{100}/PHI^{90} (4, 5) e PHI^{105}/PHI^{100} (1, 2, 21). Gli ultimi due fenotipi sono presenti soltanto nella popolazione di Gr. Beatrice Cenci.

Per una valutazione sintetica di questi dati sono stati calcolati gli indici di similarità e distanza genetica tra tutte le coppie possibili di popolazioni e specie studiate (tab. 3). Complessivamente risulta una buona correlazione ($r = 0.478$, 53 GL, $P < 0.01$) fra distanza genetica e distanza geografica (fig. 3). In base alla matrice delle distanze genetiche è stato costruito il dendrogramma in fig. 4, con il metodo «non pesato» (UPGMC, v. Sokal e Sneath, 1963). Alcune popolazioni di *N. longicaudatus* divergono l'una dall'altra in misura considerevole, ad un livello paragonabile a quello di buone specie in altri gruppi di animali studiati sotto questo aspetto (Avise, 1976; Nei, 1975). In particolare le popolazioni di Bellegra e Montecristo

TAB. 3 - Misure di identità (sopra) e di distanza genetica (sotto) calcolate con il metodo di Nei tra tutte le possibili coppie di popolazioni di *Niphargus longicaudatus* e *N. pasquini*.

	STI	CEN	VER	BEL	PCO	FOR	BAC	PUZ	SCH	MON
CEN	.880 .128									
VER	.883 .124	.882 .125								
BEL	.553 .592	.753 .283	.580 .544							
PCO	.906 .098	.946 .055	.820 .199	.708 .345						
FOR	.801 .222	.850 .162	.772 .260	.619 .480	.765 .267					
BAC	.762 .272	.783 .245	.754 .282	.662 .413	.783 .245	.812 .209				
PUZ	.828 .188	.895 .111	.846 .167	.745 .295	.865 .145	.919 .085	.826 .191			
SCH	.728 .317	.773 .257	.790 .236	.484 .725	.686 .377	.633 .458	.655 .423	.710 .343		
MON	.601 .509	.669 .402	.586 .535	.544 .609	.629 .464	.722 .326	.585 .537	.761 .272	.590 .528	
VIT	.581 .543	.724 .323	.643 .442	.763 .270	.655 .423	.656 .421	.683 .381	.781 .247	.630 .461	.676 .391

risultano notevolmente diverse da tutte le altre, differendone almeno quanto *N. pasquini*, già considerato specie distinta su base morfologica e originariamente descritto come razza di *N. elegans* (Vigna Taglianti, 1966). Successivamente Pesce e Vigna Taglianti (1975) considerano *N. pasquini* buona specie sottolineandone le affinità con *N. longicaudatus*. In base alle nostre stime *N. pasquini* si trova in un cluster assieme a *N. longicaudatus* della grotta di Bellegra, anche se la loro distanza genetica è in valore assoluto piuttosto alta (0.270) pari ad esempio a quella che separa specie diverse di *Dolichopoda* (Sbordoni et al., in prep.). La distanza notevole della popolazione di Montecristo dalle altre è spiegabile o in termini di aumento della divergenza per effetto del fondatore in una popo-

lazione insulare, presumibilmente piccola all'atto della colonizzazione, o in termini di effetto combinato del collo di bottiglia e dell'antichità dell'isolamento genico se si preferisce ammettere una condizione autoctona originaria di questa popolazione nell'isola.

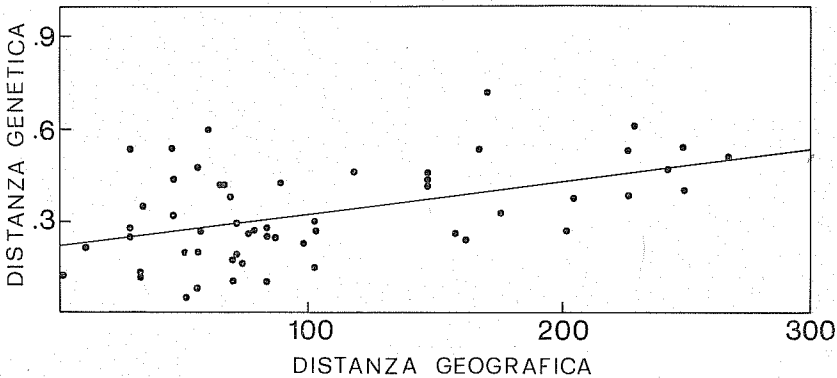


FIG. 3 - Relazione tra distanza genetica e distanza geografica per tutti i confronti tra coppie di popolazioni di *N. longicaudatus* e *N. pasquinii*.

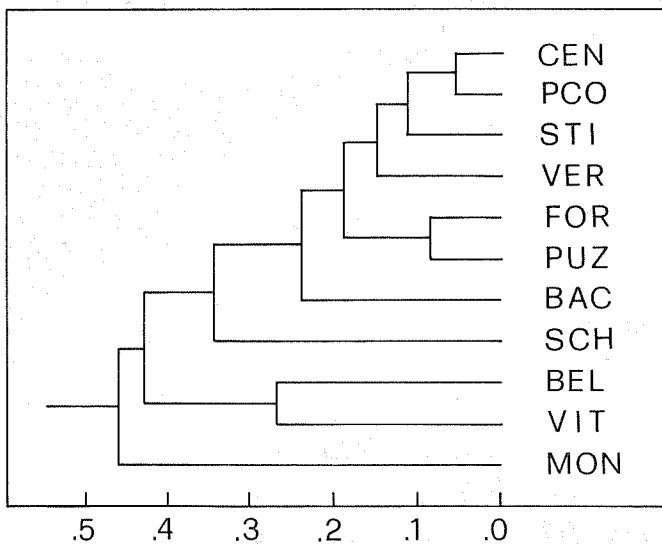


FIG. 4 - Dendrogramma illustrante i rapporti di similarità genetica tra dieci popolazioni di *N. longicaudatus* e una di *N. pasquinii*.

Quest'ultima ipotesi sembra più probabile anche alla luce delle misure di datazione discusse più avanti.

Anche tra le popolazioni continentali un elevato grado di divergenza genetica dovrebbe implicare ridotte o nulle possibilità di flusso genico. Questo fatto era ragionevolmente prevedibile riferendosi a popolazioni di massicci carsici lontani con sistemi idrografici ipogei e superficiali largamente indipendenti come ad esempio quella della Grotta Beatrice Cenci (Monti Simbruini) e quella dell'Ouso del Pozzo Comune (Monti Lepini).

Sorprende invece che ciò si verifichi, almeno in un caso, tra popolazioni che occupano cavità nella stessa area e assai prossime tra loro. In effetti il flusso genico tra le 2 popolazioni di *N. longicaudatus* della Grotta Beatrice Cenci e dell'Ovido di Verrecchie è trascurabile. Secondo una appropriata stima la frazione di individui che per generazione migrano (portando geni) da una popolazione all'altra è compresa tra $15 \cdot 10^{-6}$ e $15 \cdot 10^{-7}$ (2). Questa conclusione è rafforzata dall'esame della tab. 3 ove non solo le frequenze di molti alleli differiscono significativamente, ma esistono anche, in bassa frequenza, alleli alternativi a vari loci.

Apparentemente le due cavità appartengono a sistemi idrici isolati come alcune prove preliminari di colorazione sembrano indicare (Agostini, com. pers.). E' da osservare che l'habitat delle due popolazioni e forse le pressioni selettive che vi operano sono assai diversi. La prima popolazione vive in vaschette incrostanti e in piccoli bacini di raccolta di acque di stillicidio, la seconda in un inghiottitoio attivo sottoposto a periodiche e cospicue inondazioni da parte del corso d'acqua epigeo con notevole apporto di materiali organici. Alcune osservazioni preliminari indicano che esiste qualche differenza nelle risposte adattative. La taglia media degli individui dell'Ovido di Verrecchie è maggiore che in Beatrice Cenci e la prima popolazione appare più soggetta dell'altra a cospicue fluttuazioni

(2) La relazione tra identità genetica e migrazione è la seguente (Nei, 1975):

$$I = (m_1 + m_2) / (m_1 + m_2 + 2v)$$

dove m_1 = tasso di migrazione da A a B, m_2 = tasso di migrazione da B ad A, e v = tasso di mutazione per locus per generazione, con $2v < m_1 + m_2 < 1$

$$m_1 + m_2 = 2vI/1-I$$

Ad esempio se $v = 10^{-7}$ e l'identità genetica è $I = 0.8821$ (B. Cenci - Verrecchie) risulterebbe che: $m_1 + m_2 = 14.9 \cdot 10^{-7}$

Il modello è valido in assenza di selezione.

numeriche (Di Rao, com. pers.). Questi fatti pongono il problema del possibile differenziamento specifico tra almeno alcune delle popolazioni studiate. Sarebbe probabilmente arbitrario assegnare un determinato rango tassonomico a popolazioni differenziate soltanto sulla base della misura di distanza genetica. Anche se i livelli di divergenza sono in genere agevolmente raggruppabili in classi distinte corrispondenti a confronti tra popolazioni di una stessa specie, tra specie gemelle, tra semispecie o tra specie (Avice, 1974; Ayala, 1975; Nei, 1975) esistono tuttavia notevoli eccezioni (v. Kornfield e Koehn, 1975). Così ad esempio varie popolazioni cavernicole e allopatriche di artropodi terrestri come *Ptomaphagus* (Laing et al., 1976) e *Dolichopoda* (Sbordoni et al., in prep.) pur raggiungendo tassi di divergenza dell'ordine di 0.35 possono facilmente ibridarsi in laboratorio o, sperimentalmente, in natura indicando perlomeno una strettissima parentela. Tuttavia anche l'ibridazione in natura tra popolazioni allopatriche, accidentale (dovuta a dispersione) o indotta sperimentalmente, non consente di trarre immediate conclusioni sulla conspecificità. In caso di controselezione sugli ibridi (effetto Wallace) ci si potrebbe attendere nel giro di non molte generazioni l'insorgere o il perfezionarsi di meccanismi d'isolamento riproduttivo non altrimenti (in condizione di totale isolamento geografico) stimolati dalla selezione.

In base a queste considerazioni non riteniamo almeno per il momento di pronunciarsi sullo status tassonomico delle popolazioni saggiate di *Niphargus longicaudatus*, anche se i risultati di questa ricerca danno indicazioni piuttosto chiare a favore di un elevato differenziamento genetico tra alcune popolazioni.

La discussione fin qui condotta suggerisce una domanda: quanto rappresentativa è una popolazione di *Niphargus longicaudatus* della diversità genetica dell'intera specie? Questo aspetto è stato studiato seguendo il metodo di Lewontin (1972). Con la formula di Shannon-Weaver, tratta dalla teoria dell'informazione, sono stati calcolati per ciascun locus i valori di $H = - \sum p_i \log p_i$, dove p_i è la frequenza media dell'allele i esimo a un dato locus. Sono state ottenute così stime per l'intera specie (H_{sp}), considerando la costellazione di popolazioni studiate sufficientemente rappresentativa della stessa, e stime medie per popolazioni ($\bar{H}_{pop}$).

La diversità totale della specie risulta composta di una quota che spetta alla popolazione $\bar{H}_{pop}/H_{sp}$, e di una quota dovuta alle di-

TAB. 4 - Significatività della differenza nelle frequenze alleliche a livello dei loci polimorfici, tra due popolazioni geograficamente vicine di *Nipbargus longicaudatus* (Grotta Beatrice Cenci e Ovido di Verrecchie). I dati del confronto sono stati calcolati in base alla dimensione del campione dalla Tab. 2, sommando tra loro gli alleli meno frequenti.

Locus	χ^2	GL	Probabilità	Distanza genetica
AO-1	9.752	1	$P < 0.005$	0.189
AO-3	57.177	2	$P < 0.005$	0.716
APH-3	170.795	2	$P < 0.005$	1.023
EST-1	0.980	1	$0.5 > P > 0.1$	0.002
EST-2	43.697	2	$P < 0.005$	0.130
EST-3	15.694	2	$P < 0.005$	0.073
EST-4	1.445	1	$0.5 > P > 0.1$	0.199
LAP-1	15.148	1	$P < 0.005$	0.106
LAP-2	136.854	1	$P < 0.005$	0.591
LAP-3	18.587	1	$P < 0.005$	0.060
PGM	8.539	2	$0.025 > P > 0.01$	0.051
PHI	20.183	1	$P < 0.005$	0.176
totali	498.851	17	$P < 0.005$	

TAB. 5 - Diversità genetica media di una popolazione ($\bar{H}_{pop}$) e della specie *Nipbargus longicaudatus* ($\bar{H}_{sp}$) calcolate in base all'indice di Shannon-Weaver. $\bar{H}_{pop}/\bar{H}_{sp}$ rappresenta la quota della diversità genetica della specie espressa da una singola popolazione.

Locus	Diversità genetica		
	$\bar{H}_{pop}$	$\bar{H}_{sp}$	$\bar{H}_{pop}/\bar{H}_{sp}$
AO-1	0.258	0.335	0.770
AO-3	0.435	0.593	0.734
APH-1	0.012	0.018	0.667
APH-3	0.376	0.713	0.527
EST-1	0.090	0.217	0.415
EST-2	0.285	0.451	0.632
EST-3	0.295	0.449	0.657
EST-4	0.291	0.547	0.532
GOT-1	0.057	0.112	0.509
LAP-1	0.139	0.499	0.279
LAP-2	0.251	0.596	0.421
LAP-3	0.146	0.270	0.541
PGM	0.300	0.533	0.563
PHI	0.291	0.495	0.588
Totali e media	3.226	5.828	0.560

versità interpopolazione $H_{sp} - \bar{H}_{pop} / H_{sp}$. I risultati del test sono riportati nella tabella 5.

L'informazione che una popolazione di *N. longicaudatus* può fornire della diversità genetica dell'intera specie varia da locus a locus ed è in media del 56%. La restante parte spetta alla variabilità interpopolazione. Tale valore è molto basso se confrontato con i pochi organismi studiati sotto questo aspetto. Così nella specie umana la quota della diversità totale espressa da una singola popolazione è in media 86% (Lewontin, 1972) e nella pianta *Phlox drummondii* è pari a 77% (Levin, 1977). Questo risultato offre importanti indicazioni metodologiche: è chiaro che in situazioni analoghe a *Niphargus* non è attendibile una stima della distanza genetica tra due specie basata sul confronto di soltanto due popolazioni; è necessario al contrario disporre di un certo numero di popolazioni per poter avere una misura ponderata della divergenza interspecifica.

I valori della distanza genetica consentono una stima dell'epoca di divergenza tra le popolazioni se, facendo una notevole approssimazione, la divergenza viene considerata come un processo continuo nel tempo, risultante dall'accumulo di mutazioni neutre ⁽³⁾.

Pur essendo questo assunto non realistico, in quanto i fattori selettivi possono accelerare notevolmente i processi di sostituzione allelica, è verosimile che una grossa frazione di geni evolva continuamente in maniera più o meno neutrale.

Con queste riserve abbiamo stimato alcuni tempi di divergenza: circa 630.000 anni tra le popolazioni di B. Cenci e di Verrecchie; circa 1.400.000 anni tra le popolazioni di B. Cenci e Bellegra. Queste stime si riferiscono al tempo intercorso da quando le due popolazioni costituivano un unico pool genico.

La popolazione di Montecristo, infine, sarebbe isolata dal resto delle popolazioni continentali da almeno 2.200.000 anni. Su tempi

(3) Le stime di divergenza sono state effettuate tramite la formula (Nei, 1975):

$$t = D/2 c n \lambda$$

dove t = tempo da quando le due popolazioni si sono isolate ed hanno cominciato ad evolvere ciascuna per proprio conto, c = proporzione di sostituzioni aminoacidiche evidenziabili elettroforeticamente, n = N° medio di aminoacidi per proteina, λ = tasso di sostituzione aminoacidica, in un determinato sito, per anno.

Per i dati genetici correntemente ricavati dall'elettroforesi una misura approssimativa di $c n \lambda$ è data da $\alpha = 10^{-7}$ che indica il tasso di sostituzione genica per locus per anno.

così lunghi possiamo considerare poco rilevante o trascurabile l'aumento di divergenza eventualmente determinato nelle fasi iniziali dell'isolamento per effetto del fondatore (Chakraborty e Nei, 1977) e quindi la stima non dovrebbe risultare influenzata da questo effetto⁽⁴⁾. Per interpretare con maggior dettaglio il problema del popolamento di *Niphargus* di Montecristo occorrerà tuttavia esaminarne, con lo stesso metodo, le relazioni filetiche con i *Niphargus* continentali del gruppo *speziae-romuleus*, diffusi in altre isole dell'Arcipelago Toscano (Vigna Taglianti, 1975), e soprattutto con le popolazioni corse di *N. longicaudatus*, attribuite da Schellenberg (1951) a una razza distinta (v. anche Stock, 1972).

Un importante risultato del nostro studio consiste nella scoperta di elevati livelli di variabilità in popolazioni cavernicole o comunque ipogee. Le implicazioni verranno discusse in altra sede. Qui è sufficiente sottolineare che elevati livelli di eterozigosi e alta divergenza genica parlano a favore di un lungo isolamento tra le popolazioni. Questa conclusione contrasta con l'ipotesi di Ruffo e Vigna che hanno interpretato la vasta diffusione di *N. longicaudatus* come il risultato di una dispersione recente, ma potrebbe essere spiegata almeno in parte ammettendo un importante ruolo della selezione nella regolazione del polimorfismo e nel differenziamento genico tra le popolazioni.

* * *

A conclusione di questa relazione ci auguriamo di aver mostrato alcune applicazioni delle tecniche elettroforetiche a problemi di biogeografia o a problemi di genetica di popolazioni e di sistematica che sono preliminari alla biogeografia.

Molto promettenti sono alcuni obiettivi di diretta pertinenza biogeografica, come ad esempio la stima della divergenza genetica tra popolazioni di specie proprie dell'Italia centrale e della penisola balcanica e ritenute transadriatiche e periadriatiche dagli zoogeografi sulla base della loro corologia. Un altro problema che può essere

(4) Recentemente è stato rilevato (Sarich, Nature **265**: 24-28, 1977) che, calibrando i valori di D con la distanza immunologica della albumina (AID), si ottengono tempi di divergenza generalmente maggiori e quindi i nostri valori di t potrebbero risultare sottostimati.

validamente affrontato con questo approccio riguarda l'origine di popolazioni di mammiferi in particolari zone, a seguito di episodi di colonizzazione attiva o passiva avvenuti in tempi relativamente recenti (per es. origine della Capra di Montecristo). Non va infine trascurata la possibilità di ottenere una datazione, su base molecolare, della divergenza tra specie cavernicole e di confrontarla con le datazioni ricavabili dalla geologia e dalla paleogeografia; un buon esempio è rappresentato dagli isopodi Sferomidi di origine marina del genere *Monolistra*, la cui storia evolutiva in relazione alle vicende paleoclimatiche e paleogeografiche è stata accuratamente delineata da Racovitza.

RINGRAZIAMENTI

Numerose sono le persone che in diversa misura hanno contribuito alla realizzazione del presente lavoro, sia con la raccolta di materiale (Roberto Argano, Massimo Di Rao, Lucio Pesce, Mauro Rampini), sia con l'aiuto prestato in laboratorio (Eugenio Benvenuto, Renata Campagnol, Massimo Di Rao, Gianna Scarpelli, Giuliana Allegrucci, Rita Colognola, Donatella Cesaroni, Gisella Caccione, Cristina Angelici). A tutti questi amici: colleghi, collaboratori o allievi, rivolgiamo la nostra gratitudine. Ringraziamo inoltre Sandro Ruffo per aver letto criticamente una precedente stesura di questo lavoro e Augusto Vigna Taglianti per le determinazioni e le indicazioni bibliografiche relative ai *Niphargus* studiati.

SUMMARY

Allozymic variation in proteins encoded by a maximum of 18 loci was analyzed in approximately 500 individuals from 10 populations of *Niphargus longicaudatus* and one population of *Niphargus pasquinii*. Material examined included cave, phreatic and spring populations from continental Central Italy and the island of Montecristo. Most of the loci assayed were polymorphic in one or more populations, with a mean number of alleles per locus ranging from 1.86 to 2.44. Additionally the average heterozygosity per locus is 28.3 percent (range 21.6 to 34.7 percent); these figures put *Niphargus longicaudatus* among the most genetically variable organisms studied through electrophoresis. The degree of genetic divergence between populations is very high, resembling patterns observed in other species with disjunct distributions. Surprisingly, however, in *Niphargus* the high divergence values are not associated with low levels of genetic variability, in spite of the small size of most population studied. Some form of balancing selection augmented by a long term isolation seems to be responsible for this outcome. An overall highly significant

correlation between genetic and geographic distance was detected. The apportionment of the whole species genetic diversity to single populations of *N. longicaudatus* is much lower than other organisms studied under this aspect: only 56 percent of the genetic diversity resides within populations while 44 percent is due to «among populations» variation. The Montecristo population was found to have the highest values of genetic distance. According to our estimates, under the assumption of the neutral evolution of protein polymorphisms, the time of its separation from the continental population can be dated back to 2.2 millions of years. Even geographically close populations may show high divergence rates. The genetic distance between Beatrice Cenci and Verrecchie cave populations is 0.12, indicating an almost complete absence of migration, in spite of the closeness of the two caves. These results arise the question whether some of the populations studied can be regarded as true species. Finally the use of electrophoretic data in biogeographical studies is emphasized.

BIBLIOGRAFIA

- AVISE J. C., 1974 - Systematic value of electrophoretic data. *Systematic Zoology*, **23**: 465-481.
- AVISE J. C., 1976 - Genetic differentiation during speciation. In «Molecular Evolution», F. J. Ayala ed., Sinauer Ass., Inc., Sunderland, Mass.: 106-122.
- AVISE J. C., R. K. SELANDER, 1972 - Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution*, **26**: 1-19.
- AYALA F. J., 1975 - Genetic differentiation during the speciation process. *Evolutionary biology*, **8**: 1-75.
- AYALA F. J., 1976 - «Molecular evolution». Sinauer Ass., Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.
- AYALA F. J., J. R. POWELL, M. L. TRACEY, C. A. MOURAO, S. PEREZ-SALAS, 1972 - Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, **70**: 113-139.
- BREWER G. J., 1970 - An introduction to isozyme techniques. Academic Press, New York and London.
- BRUSSARD P. F., 1975 - Geographic variation in North American colonies of *Cepaea nemoralis*. *Evolution*, **29**: 402-410.
- CHAKRABORTY R., M. NEI, 1977 - Bottleneck Effects on Average Heterozygosity and Genetic Distance with the Stepwise Mutation Model. *Evolution*, **31**: 347-356.
- COCKLEY D. E., J. L. GOOCH, D. P. WESTON, 1977 - Genetic Diversity in Cave Dwelling Crickets (*Ceuthophilus gracilipes*). *Evolution*, **31**: 313-318.
- FORD E. B., 1975 - Ecological Genetics. IV Ed., Chapman and Hall, London.
- HARRIS H., 1966 - Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Royal Society B*, **164**: 298-310.
- HUBBY J. L., R. C. LEWONTIN, 1966 - A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **54**: 577-594.
- JOHNSON F. M., 1971 - Isozyme polymorphisms in *Drosophila ananassae*. Genetic diversity among island populations of the South Pacific. *Genetics*, **68**: 77-95.
- KORNEFIELD I. L., R. K. KOEHN, 1975 - Genetic Variation and Speciation in New World Cichlids. *Evolution*, **29**: 427-437.
- LAING C., G. R. CARMODY, S. B. PECK, 1976 - Population genetics and evolutionary biology of the cave beetle *Ptomaphagus hirtus*. *Evolution*, **30**: 484-498.
- LEVIN D. A., 1977 - The organization of genetic variability in *Phlox drummondii*. *Evolution*, **31**: 477-494.

- LEWONTIN R. C., 1972 - The apportionment of human diversity. *Evolutionary biology* **6**: 381-398.
- LEWONTIN R. C., 1974 - The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York and London.
- 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.
- PATTON J. L., S. Y. YANG, P. MYERS, 1975 - Genetic and morphologic divergence among introduced rat populations (*Rattus rattus*) of the Galàpagos archipelago, Ecuador. *Syst. Zool.*, **24**: 296-310.
- PENNEY D. F., E. G. ZIMMERMAN, 1976 - Genic divergence and local population differentiation by random drift in the pocket gopher genus *Geomys*. *Evolution*, **30**: 473-483.
- PESCE G. L., A. VIGNA-TAGLIANTI, 1975 - I *Niphargus* dell'Appennino Centrale (Amphipoda, Gammaridae). *Quaderni Mus. Speleol. «V. Rivera»*, **2**: 109-120.
- POULIK M. D., 1957 - Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, **180**: 1477-1479.
- SBORDONI V., M. COBOLLI SBORDONI, E. DE MATTHAEIS, 1978 - Ricerche sulla variabilità genetica di popolazioni cavernicole indagata con elettroforesi di sistemi enzimatici. *Atti 12° Congr. Naz. Speleol. 1974, Memorie, Rass. Speleol. It.*, **12**: 268-271.
- SBORDONI V., E. DE MATTHAEIS, M. COBOLLI SBORDONI, 1976 - Variabilità genetica in popolazioni cavernicole ed epigee di Anfipodi. *Boll. Zool.*, **43**: 401-402.
- SCHELLENBERG A., 1951 - Subterrane Amphipoden korsikanischer biotope. *Arch. Hydrobiologie*, **44**: 325-332.
- SOKAL R. R., P. H. A. SNEATH, 1963 - Principles of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- STOCK J. H., 1972 - Les Gammaridae (Crustacés Amphipodés) des eaux douces et saumâtres de Corse. *Bull. Zool. Mus. Univ. Amsterdam*, **2**: 197-220.
- STONE W. S., M. R. WHEELER, F. M. JOHNSON, K. KOJIMA, 1968 - Genetic variation in natural island populations of members of the *Drosophila nasuta* and *Drosophila ananassae* subgroups. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **59**: 102-109.
- VIGNA-TAGLIANTI A., 1966 - Sulla presenza di *Niphargus* del gruppo *elegans* nell'Italia appenninica (Amphipoda, Gammarida). *Arch. Zool. It.*, **51**: 863-876.
- VIGNA-TAGLIANTI A., 1975 - Gli anfipodi sotterranei dell'Arcipelago Toscano. *Lav. Soc. It. Biogeografia*, (n. s.), **5**: 3-11.