

L. BULLINI, P. ARDUINO, R. CIANCHI (*)

L'ELETTROFORESI MULTILOCUS NELLO STUDIO DELLA VARIABILITÀ E DELLA DIVERGENZA GENETICA NELLE PIANTE

Riassunto — Vengono riportati i principali risultati dell'analisi della struttura genetica di popolazioni vegetali, condotta mediante elettroforesi multilocus. I dati sono confrontati con quelli attualmente disponibili in vari gruppi animali, assai più estesamente indagati rispetto alle piante.

Vengono in particolare esaminati i seguenti punti:

- 1) correlazioni esistenti tra variabilità genetica dei loci enzimatici e la struttura e funzione degli enzimi codificati;
- 2) parametri statistici utilizzabili per quantificare la variabilità genetica di popolazioni conspecifiche ed eterospecifiche;
- 3) correlazioni tra dati di variabilità genetica e vari parametri ecologici e biologici;
- 4) metodi statistici per la stima dell'entità della divergenza genetica tra popolazioni (o taxa);
- 5) contributo dei vari loci enzimatici alla distanza genetica e loro tasso evolutivo;
- 6) livelli di divergenza genetica tra popolazioni locali, varietà, sottospecie, microspecie, specie gemelle e specie morfologicamente differenziate;
- 7) utilizzazione dei sistemi gene-enzima per stime indirette del flusso genico tra popolazioni naturali;
- 8) marcatori biochimici nello studio dell'ibridazione naturale e dell'introgresione;
- 9) ruolo di tali fenomeni nell'evoluzione di popolazioni e specie, con particolare riguardo alle zone ibride;
- 10) uso dei dati elettroforetici nello studio dei meccanismi di speciazione per ibridazione (specie allodiploidi e allopoliploidi);
- 11) inferenze tassonomiche e filogenetiche da dati elettroforetici.

Viene mostrato come l'elettroforesi multilocus rappresenti un approccio molto promettente nello studio dei processi microevolutivi. C'è da attendersi che un uso più esteso di tale metodo nelle piante darà importanti contributi alla tassonomia, rendendola maggiormente in accordo con le relazioni genetiche ed evolutive, almeno tra i taxa inferiori (specie congeneriche, generi affini).

Abstract — *Multilocus electrophoresis in the study of genetic variability and divergence in plants*

Data on the genetic structure of plant populations by means of multilocus elec-

(*) Dipartimento di Genetica e Biologia molecolare, Università di Roma «La Sapienza», Via Lancisi, 29, 00161 Roma.

trophoresis are reviewed, and compared with those available on different animal groups. The main topics examined are the following:

- 1) correlations existing between genetic variability of loci and structure and function of their encoded enzymes;
- 2) statistical methods available for evaluating the degree of genetic variability of natural populations;
- 3) correlations between genetic variability and ecological/biological parameters;
- 4) indices for quantifying genetic divergence between populations (or taxa);
- 5) contribution of enzyme loci to genetic divergence and their rate of evolution;
- 6) levels of genetic divergence between local populations, varieties, subspecies, microspecies, sibling species, and morphologically differentiated species;
- 7) use of gene-enzyme systems for estimating gene flow between natural populations;
- 8) study by biochemical markers of natural hybridization and introgression, and their role in microevolutionary processes, with particular emphasis on hybrid zones;
- 9) allozyme evidence for speciation by hybridization (allodiploid and allopolyploid species);
- 10) taxonomic and phylogenetic inferences from electrophoretic data.

Multilocus electrophoresis is shown to represent a promising approach to the study of microevolutionary processes. A more widespread use of this method in plants is expected to allow a taxonomic ranking more consistent with genetic and evolutionary relationships, at least at the lower taxa level (congeneric species, related genera).

Key words — Multilocus electrophoresis - gene-enzyme systems - biochemical markers - genetic variability - genetic divergence - gene flow - reproductive isolation - natural hybridization - introgression - microevolution - speciation - autopolyploids - hybrid species - biochemical taxonomy.

INTRODUZIONE

Alcuni dei progressi più significativi realizzati negli ultimi venti anni in biologia evolutiva sono venuti da ricerche sulla struttura genetica di popolazioni animali e vegetali condotte mediante analisi elettroforetica di un numero elevato di sistemi gene-enzima («multilocus electrophoresis»). Queste ricerche hanno anzitutto dimostrato che nelle popolazioni animali e vegetali la frequenza di loci polimorfici (di loci, cioè, in cui siano presenti nella popolazione almeno due alleli, il più comune dei quali abbia una frequenza $\leq 0,99$) è di gran lunga più elevata di quanto ritenuto fino agli anni '60. È stato inoltre messo in evidenza che i polimorfismi genetici implicano spesso un numero molto elevato di alleli (anche più di dieci) in confronto ai due (eccezionalmente tre o quattro) che era possibile individuare prima. Va infine notato che grazie all'elettroforesi tali stime vengono oggi condotte su campioni di geni strutturali scelti con un criterio indipendente dalla loro variabilità, mentre prima un gene poteva

essere studiato solo attraverso la scoperta di due suoi alleli.

Questi risultati hanno reso necessario un riesame del problema dell'importanza relativa della selezione e della deriva nel mantenimento di polimorfismi genetici; hanno permesso di confrontare la variabilità genetica di popolazioni conspecifiche e non e di correlarla con il loro modo di riproduzione, le loro caratteristiche ecologiche, il grado di integrità dell'ecosistema di cui fanno parte, la loro storia evolutiva (inclusi i processi di domesticazione e selezione artificiale), ecc.; hanno consentito di quantificare il differenziamento genetico esistente tra popolazioni locali, sottospecie, semispecie, specie gemelle e specie affini, morfologicamente differenziate, nei più diversi gruppi di organismi, gettando le basi per una tassonomia biochimica, da confrontare con quella morfologica.

L'elettroforesi multilocus ha inoltre permesso di studiare sperimentalmente numerosi altri fenomeni, quali la distribuzione non casuale dei genotipi nelle diverse tessere ambientali («habitat choice»); il flusso genico tra popolazioni conspecifiche; la presenza in natura di barriere estrinseche o intrinseche (cioè ereditabili) di isolamento riproduttivo; l'evidenziazione all'interno di una specie morfologica di specie gemelle, separate da barriere riproduttive intrinseche; l'ibridazione naturale e le sue possibili conseguenze evolutive, quali l'introggressione, la speciazione, ecc.

ANALISI ELETTROFORETICA DI SISTEMI GENE-ENZIMA

L'elettroforesi è una tecnica tanto nota e così largamente impiegata che non risulta qui necessario illustrarla in dettaglio. Basterà dire che essa consiste essenzialmente nel porre omogenati ottenuti da una porzione di un determinato tessuto in un substrato omogeneo, rappresentato in genere da gel d'amido o di poliacrilamide, e di sottoporli per qualche tempo (in genere poche ore) a un campo elettrico (fig. 1). Gli enzimi e le altre proteine migrano nel gel con una velocità che è funzione della loro carica elettrica e della loro dimensione. Interrotta la corrente, il gel viene trattato con una soluzione che colora per un enzima specifico, codificato da un singolo locus, o per proteine con funzioni enzimatiche simili, ma codificate da loci distinti (*isozimi*). Diviene così visibile nel gel la posizione in cui sono migrati i varianti dell'enzima in esame. Quando l'enzima è codificato da un singolo locus, i suoi varianti sono detti *allozimi*.

Sottoponendo ad elettroforesi omogenati ottenuti da individui

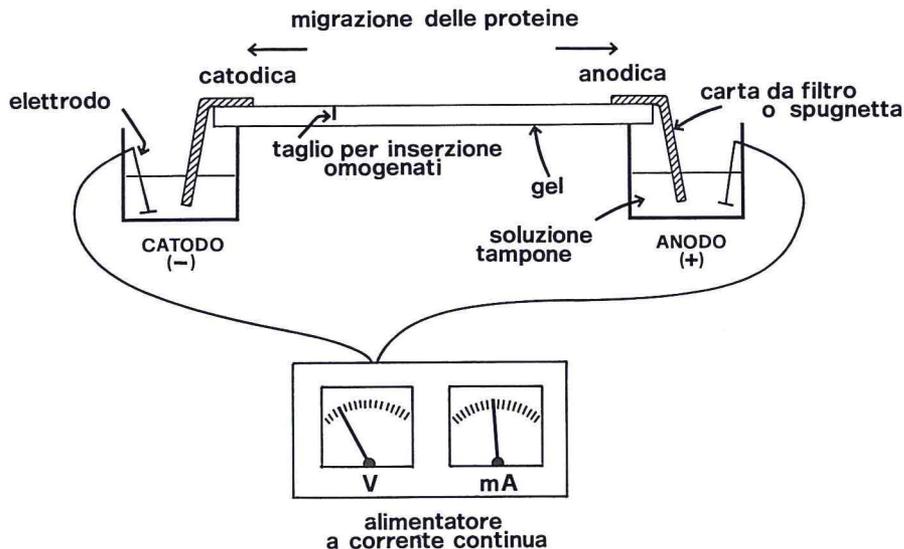
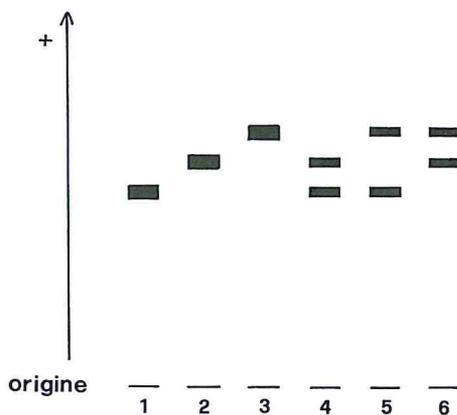


Fig. 1 - Schema di apparato per elettroforesi.

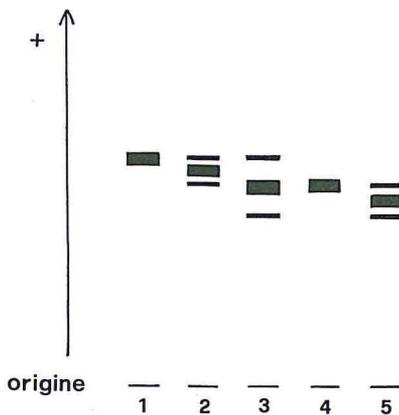
conspecifici di una data popolazione e analizzandoli per un dato enzima polimorfico con la metodica descritta, si osservano patterns del tipo di quelli illustrati in fig. 2. Come si vede il riconoscimento degli eterozigoti risulta agevole, essendovi di regola codominanza, cioè espressione di entrambi gli alleli. L'interpretazione genetica dei vari patterns elettroforetici va confermata con metodi quali: 1) lo studio della progenie ottenuta incrociando individui con patterns elettroforetici noti; 2) un'analisi popolazionistica che verifichi se la frequenza fenotipiche osservate sono in accordo con quelle attese in base alla legge di Hardy-Weinberg; 3) il confronto di tessuti (o cellule) diploidi e aploidi.

Quando gli individui saggiati per un dato enzima mostrano un medesimo pattern elettroforetico, si assume che il genotipo che determina tale pattern sia lo stesso. Questa assunzione non corrisponde tuttavia sempre a realtà; è stata, infatti, dimostrata la presenza di alleli isoelettroforetici (cioè alleli distinti, con uguale mobilità elettroforetica). Gli alleli isoelettroforetici possono essere differenziati con tecniche diverse, quali il grado di termostabilità dell'alozima codificato, la valutazione quantitativa delle attività enzimatiche, l'elettroforesi bidimensionale, ecc.

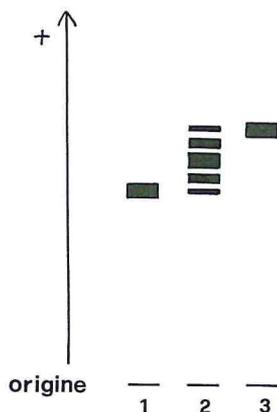
L'elettroforesi mette perciò in evidenza solo una porzione della variabilità genetica; tale porzione, come si è visto, è tuttavia di gran



a



b



c

Fig. 2 - Patterns elettroforetici di enzimi con diversa struttura quaternaria. a) Monomero: 1-3 = fenotipi omozigoti, rispettivamente AA, BB, CC; 4-6 = fenotipi eterozigoti, AB, AC, BC; b) dimero: 1, 4 = fenotipi omozigoti, CC e BB; 2, 3, 5 = eterozigoti, BC, AC, AB; c) tetramero: 1, 3 = fenotipi omozigoti, AA e BB; 2 = eterozigote, AB.

lunga maggiore rispetto a quella che poteva essere studiata prima dell'avvento di questa metodica. Va, inoltre, tenuto presente che l'elettroforesi non permette di studiare nè i geni regolatori, né i geni strutturali che codificano per proteine non solubili, ma solamente una parte dei geni strutturali. Poichè i geni regolatori hanno certamente un ruolo molto importante nei processi di evoluzione, questa limitazione non deve essere sottovalutata. Un'altra limitazione delle tecniche elettroforetiche è legata al fatto che la diversa mobilità elettroforetica di due varianti enzimatici ci dice che essi hanno sequenze aminoacidiche diverse, ma non ci dice per quante sostituzioni aminoacidiche differiscano. Non deve perciò stupire che specie filogeneticamente vicine (per esempio appartenenti a generi diversi di una stessa famiglia) possano differire elettroforeticamente per tutti gli alleli di tutti i loci studiati. Ciò rappresenta un limite per lo studio mediante elettroforesi delle relazioni evolutive tra entità che abbiano superato un certo livello di divergenza genetica.

VARIABILITÀ GENETICA DEI LOCI ENZIMATICI IN RAPPORTO ALLA STRUTTURA E ALLA FUNZIONE DEGLI ENZIMI CODIFICATI

È stata osservata una correlazione significativa tra la variabilità genetica di un locus e la struttura quaternaria dell'enzima codificato. I monomeri risultano in media più variabili degli oligomeri (ZOUROS, 1976; HARRIS *et al.*, 1977; WARD, 1977; KOHEN e EANES, 1978). La variabilità genetica dei loci enzimatici risulta anche correlata con il peso molecolare delle subunità proteiche codificate; essa, infatti, aumenta con l'aumentare del loro peso molecolare (EANES e KOHEN, 1978).

Vari autori hanno tentato di correlare la variabilità dei loci enzimatici con la funzione metabolica degli enzimi da essi codificati. È stato ad esempio dimostrato che la variabilità degli enzimi che metabolizzano il glucosio è in media inferiore rispetto a quelli che non lo metabolizzano (GILLESPIE e KOJIMA, 1968). Del pari, gli enzimi che agiscono su un singolo substrato sono in media meno variabili di quelli a substrato multiplo (KOJIMA *et al.*, 1970). JOHNSON (1974) ha distinto tre classi di enzimi, in ordine di variabilità decrescente: enzimi a substrato variabile (per esempio esterasi, peptidasi, fosfatasi, ecc.); regolatori, cioè che regolano il flusso di metaboliti in una data via metabolica (per esempio alcool deidrogenasi, xantina deidrogenasi, enzima malico, fosfoesosoisomerasi, esochinasi, aldeide

ossidasi, fosfoglucomutasi, adenilatochinasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi, ecc.); e non regolatori (per esempio malato deidrogenasi, lattato deidrogenasi, 6-fosfogluconato deidrogenasi, isocitrico deidrogenasi, aldolasi, glutammico ossalacetico transaminasi, fumarasi, amilasi, triosofosfato isomerasi, sorbitolo deidrogenasi, α -glicerofosfato deidrogenasi, ecc.). POWELL (1975), confrontando i dati ottenuti in vari gruppi animali, non ha confermato l'esistenza di differenze significative nel grado di variabilità tra le prime due classi di enzimi sensu Johnson; entrambe queste classi risultano, tuttavia, assai più variabili rispetto a quella degli enzimi non regolatori.

VARIABILITÀ GENETICA DELLE POPOLAZIONI

I principali parametri utilizzati per stimare l'entità della variabilità genetica in una popolazione sono i seguenti:

- 1) proporzione di loci polimorfici (P = numero di loci polimorfici / numero totale di loci);
- 2) numero medio di alleli per locus (A = numero totale di alleli / numero totale di loci);
- 3) eterozigosi media osservata (H_o = numero di individui eterozigoti ad un dato locus / numero totale di individui, mediato su tutti i loci);
- 4) eterozigosi media attesa per locus (H_e = proporzione media di genotipi eterozigoti attesi in una popolazione sulla base dell'equilibrio di Hardy-Weinberg; per ogni locus sarà $h_e = 1 - \sum x_i^2$, dove x_i è la frequenza dell'allele i -esimo nella popolazione e la sommatoria è estesa a tutti gli alleli del locus; H_e è la media dei valori di h_e su tutti i loci).

Da quanto detto nel paragrafo precedente, risulta chiaro che il campione di loci enzimatici utilizzato per stime di variabilità genetica a livello popolazionale deve non solo essere relativamente numeroso (20-30 loci), ma anche rappresentativo delle varie classi strutturali e funzionali di enzimi. In ogni caso le stime ottenute debbono tener conto della composizione del campione di loci enzimatici saggiati.

Sono attualmente disponibili dati sulla variabilità genetica, analizzata mediante elettroforesi multilocus, di vari organismi sia animali che vegetali (POWELL, 1975; NEVO, 1978; NEVO *et al.*, 1984; HAMRICK *et al.*, 1979; GOTTLIEB, 1981; CRAWFORD, 1983; LOVELESS e HAM-

RICK, 1984). Differenze significative sono state trovate tra vertebrati, invertebrati e piante. I primi mostrano livelli di variabilità significativamente minori (H_e media circa 0,05) sia rispetto agli invertebrati (H_e media circa 0,10) che alle piante (H_e media circa 0,12). Va notato, tuttavia, che le piante sono state molto meno studiate (complessivamente circa 50 specie contro alcune centinaia negli animali). La minore variabilità genetica dei vertebrati è stata correlata con il loro più elevato controllo omeostatico, sia fisiologico che comportamentale (SELANDER e KAUFMAN, 1973; GILLESPIE, 1974).

Correlazioni significative sono state trovate tra livello di variabilità genetica e vari parametri: ecologici (per esempio ampiezza dell'areale, tipo di habitat, regione climatica); demografici (struttura di popolazione, flusso genico, ecc.); caratteristiche biologiche (longevità, tempo di generazione, fecondità, modalità riproduttive, complessità del ciclo biologico, ecc.).

Nelle piante la variabilità genetica delle popolazioni risulta in genere maggiore nelle specie a più ampia distribuzione, caratteristiche di stadi successionali tardivi, a riproduzione sessuata con prevalente esoincrocio, con impollinazione anemofila, perenni con tempo di generazione lungo (HAMRICK *et al.*, 1979; NEVO *et al.*, 1984). Ad esempio popolazioni di conifere (come *Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Pseudotsuga*) sono geneticamente molto più variabili di piante erbacee autogame annuali o biennali, come *Avena* e *Tragopogon*. I valori di variabilità genetica osservati in queste e varie altre specie vegetali sono riportati in Tab. I; nella Tab. II sono riassunti i valori medi osservati in specie esclusivamente o prevalentemente allogame e rispettivamente in specie autogame: queste ultime mostrano valori significativamente minori. I vari gruppi tassonomici non sono tuttavia egualmente rappresentati; infatti la maggior parte degli studi è stata condotta su specie di regioni temperate, soprattutto annuali o perenni con tempo di generazione breve (talora lungo, per esempio conifere). Sono state relativamente poco studiate le piante erbacee perenni con tempo di generazione lungo, angiosperme arboree e monocotiledoni (tranne le graminacee); infine vi sono pochi dati sulle specie tropicali e alpine.

Varie caratteristiche ecologiche e biologiche influenzano anche la distribuzione della variabilità genetica, confrontata rispettivamente entro e tra popolazioni di una medesima specie; tale distribuzione viene quantificata mediante le formule di diversità totale (H_T , data dalla media su tutti i loci dei valori $1 - \sum x_i^2$, dove x_i è la fre-

TAB. I - Stime di variabilità genetica in specie vegetali. P=proporzione di loci polimorfici; A=numero medio di alleli per locus; H_e =eterozigosi media attesa; N=numero di loci saggiati elettroforeticamente; m.s.=mating system (out=allogamo; self=autogamo; mix=misto); m.r.=modalità riproduttive (sex=sessuale; asex=asessuale; mix=entrambe); i.=tipo di impollinazione (ane=anemofila; zoo=zoofila; auto=autofecundazione).

	P	A	H_e	N	m.s.	m.r.	i.	Autori
ANGIOSPERME								
Monocotiledoni								
<i>Agrostis stolonifera</i>			0,152	12	out	mix	ane	Wu, 1976
<i>Avena barbata</i>	0,26	1,30	0,040	17	self	sex	auto	Clegg & Allard, 1972
<i>Avena canariensis</i>	0,39	1,69		23	self	sex	auto	Craig <i>et al.</i> , 1974
<i>Avena fatua</i>	0,32		0,138	11	self	sex	auto	Jain & Ray, 1974
<i>Avena hirtula</i>			0,011	28	self	sex	auto	Singh & Jain, 1971
<i>Gymnadenia conopsea</i>	0,56		0,17	11				Scacchi & Lanzara, 1989
<i>Hordeum spontaneum</i>	0,71	3,40	0,098	28	self	sex	auto	Nevo <i>et al.</i> , 1979
<i>Lolium multiflorum</i>	0,95	3,55	0,331	15	out	sex	ane	Coleman, 1977
<i>Typha domingensis</i>	0,00	1,00	0,000	28	self			Mashburn <i>et al.</i> , 1978
<i>Typha latifolia</i>	0,00	1,00	0,000	28	self			" "
<i>Zea mays</i>	0,67	2,65	0,301	11	mix	sex	ane	Senadhira, 1976
<i>Zea mexicana</i> (annuale)	0,72	2,09	0,230	20	mix	sex	ane	" "
Dicotiledoni								
<i>Cirsium canescens</i>	0,90	3,20	0,200	10	mix	sex	zoo	Loveless & Hamrick, 1988
<i>Cirsium pitcheri</i>	0,29	2,50	0,024	14	mix	sex	zoo	" " "
<i>Clarkia rubicunda</i>	0,46	2,30	0,110	13	out	sex	zoo	Gottlieb, 1973a
<i>Colobanthus quitensis</i>	0,00	1,00	0,000	22		mix		Lee & Postle, 1975
<i>Coreopsis nuecensis</i>	0,73	3,09	0,083	15	out	sex		Crawford & Smith, 1982a
<i>Coreopsis nuecensoides</i>	0,93	3,07	0,153	15	out	sex		" " "
<i>Gaura demareei</i>	0,28	3,00	0,050	18	out	sex	zoo	Gottlieb & Pilz, 1976
<i>Gaura longiflora</i>	0,33	3,16	0,074	18	out			" " "
<i>Helianthus debilis debilis</i>	0,25	1,40	0,060	12	out	sex		Wain, 1982
<i>Helianthus debilis tardiflorus</i>	0,21	2,17	0,047	12	out	sex		" "
<i>Helianthus debilis vestitus</i>	0,28	2,57	0,059	12	out	sex		" "
<i>Lasthenia maritima</i>	0,10	1,12	0,007	20	self	sex		Crawford <i>et al.</i> , 1985
<i>Lasthenia minor</i>	0,26	1,42	0,074	20	out	sex		" "
<i>Layia chrysanthemoides</i>	0,76	3,90	0,278	15	out	sex		Warwick & Gottlieb, 1985
<i>Layia munzii</i>	0,53	3,20	0,139	15	out	sex		" " "
<i>Liatris cylindracea</i>	0,56	1,63	0,158	27	out	mix	zoo	Schaal & Levin, 1976
<i>Limnanthes alba</i>	0,52	1,73	0,159	13	out	sex	zoo	De Arroyo, 1975; Jain, 1976
<i>Limnanthes floccosa</i>	0,18	1,19	0,130	13	self	sex	auto	" ; " "
<i>Lycopersicon cheesmanii</i>	0,57	2,65	0,000	14	self	sex	auto	Rick & Fobes, 1975
<i>Lycopersicon chmetelewskii</i>	0,50	3,52	0,046	14	out	sex	zoo	Rick <i>et al.</i> , 1977
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	0,36	1,54	0,128	13	mix	sex	zoo	" " "
<i>Lythrium tribracteatum</i>	0,28	1,39		18	self	sex	auto	Baker & Baker, 1976
<i>Mimulus guttatus</i>	0,94	2,82	0,336	10	out	mix	zoo	McClure, 1979
<i>Oenothera argillicola</i>	0,20	1,40	0,080	20	out	sex	zoo	Levy & Levin, 1975
<i>Oenothera hookeri</i>	0,00		0,000	20	out			" " "
<i>Oenothera organensis</i>	0,07	2,00	0,023	15	out			Gottlieb, 1981
<i>Persea americana</i>	0,80	1,90	0,195	10	out	sex	zoo	Torres <i>et al.</i> , 1978
<i>Phlox cuspidata</i>	0,08	1,08	0,026	18	self	sex	auto	Levin, 1975; Levin, 1978
<i>Phlox drummondii</i>	0,16	1,19	0,058	18	out	sex	zoo	" " ; " "
<i>Phlox roemariana</i>	0,16	1,13	0,055	20	out	sex	zoo	Levin, 1978
<i>Silene maritima</i>	0,29	2,33	0,140	21	mix	sex	zoo	Baker <i>et al.</i> , 1975
<i>Stephanomeria exigua carotifera</i>	0,57	2,10	0,156	14	out	sex	zoo	Gottlieb, 1975
<i>Stephanomeria exigua coronaria</i>	0,71	2,36	0,277	14	out	sex	zoo	Gottlieb, 1977
<i>Stephanomeria malheurensis</i>	0,12	2,30	0,001	25	self			Gottlieb, 1973b
<i>Tragopogon dubius</i>	0,09	1,09	0,028	21	self	sex	auto	Roose & Gottlieb, 1976
<i>Tragopogon pratensis</i>	0,00	1,00	0,000	21	self	sex	auto	" " "
<i>Tragopogon porrifolius</i>	0,06	1,07	0,014	21	self	sex	auto	" " "
GIMNOSPERME								
<i>Picea abies</i>	0,91	3,90	0,370	11	out	sex	ane	Lundkvist, 1979
<i>Pinus longaeva</i>	0,79	2,35	0,364	14	out	sex	ane	Hiebert, 1977
<i>Pinus pungens</i>	0,40	1,33	0,144	15	out	sex	ane	Feret, 1974
<i>Pinus ponderosa</i>	0,68	2,00	0,226	22	out	sex	ane	Lundkvist, 1979
<i>Pinus rigida</i>	0,97	1,96	0,170	15	out	sex	ane	Guries & Ledig, 1982
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0,69	2,47	0,436	12	out	sex	ane	Mejnartowicz, 1976
PTERIDOFITE								
<i>Lycopodium lucidulum</i>	0,28	1,39	0,070	18				Levin & Crepet, 1973

TAB. II - Valori medi dei parametri di variabilità genetica per le specie riportate in Tab. I. P=proporzione di loci polimorfici; A=numero medio di alleli per locus; H_e =eterozigosi media attesa.

	P	A	H_e	n° specie
ALLOGAME				
Monocotiledoni	0,82	2,96	0,25	4
Dicotiledoni	0,45	2,35	0,12	27
Gimnosperme	0,74	2,33	0,28	6
media su tutte le specie	0,54	2,41	0,16	37
AUTOGAME				
Monocotiledoni	0,28	1,68	0,05	7
Dicotiledoni	0,15	1,39	0,02	10
media su tutte le specie	0,20	1,51	0,03	17

quenza media dell'allele i -esimo, per un dato locus, nelle popolazioni studiate), intrapopolazionale (H_s , corrispondente all'eterozigosi attesa) e interpopolazione (G_{ST} , uguale a $H_T - H_s / H_T$), elaborate da NEI (1973). I fattori principali che influenzano tale distribuzione della variabilità sono il sistema riproduttivo, il tempo di generazione e lo stadio successionale. Così le piante autogame, annuali, di stadi successionali precoci, hanno, accanto a una bassa diversità intrapopolazionale, una elevata diversità interpopolazione; ne sono esempi *Hordeum spontaneum* ($G_{ST}=0,360$, BROWN *et al.*, 1978), *Capsella bursa-pastoris* ($G_{ST}=0,814$, BOSBACH e HURKA, 1981) e *Chenopodium alba* ($G_{ST}=0,326$, WARWICK e MARRIAGE, 1982). Bassi valori di diversità interpopolazione si osservano invece in piante prevalentemente allogame, a vita lunga, di stadi successionali tardivi, quali *Sequoiadendron giganteum* ($G_{ST}=0,097$, FINS e LIBBY, 1982) e *Desmodium nudiflorum* ($G_{ST}=0,105$, SCHAAL e SMITH, 1980).

In generale, i fattori che promuovono il movimento di polline, e quindi lo scambio genetico, tra individui di una popolazione permettono anche che gli alleli siano condivisi ampiamente tra le popolazioni e riducono il differenziamento intraspecifico, favorendo quindi il flusso genico tra popolazioni (LOVELESS e HAMRICK, 1984).

DIVERGENZA GENETICA E SPECIAZIONE

La speciazione rappresenta uno stadio particolarmente significativo dell'evoluzione biologica; infatti, a causa dell'isolamento riproduttivo, una mutazione può diffondersi a livello intraspecifico, ma non passare da una specie all'altra; le specie possono, quindi, essere considerate unità evolutive discrete e indipendenti. Vari biologi, come De Vries, Goldschmidt, Schindewolf hanno creduto che la speciazione fosse un evento pressoché istantaneo e che una nuova specie potesse originarsi in seguito ad eventi quali la comparsa in uno o più individui di una singola mutazione di tipo particolare (le cosiddette «macromutazioni» o «mutazioni sistemiche»). Goldschmidt, ad esempio, era convinto che una mutazione sistemica potesse dare origine non solo ad una nuova specie, ma anche a un genere e persino a una famiglia. Attualmente queste ipotesi godono minor credito. Tuttavia in certi casi fenomeni come l'ibridazione interspecifica possono dare origine pressoché istantaneamente a nuove specie (BULLINI, 1985a). Altri naturalisti (Wagner, più recentemente Mayr) hanno sostenuto il ruolo esclusivo o preminente dell'isolamento geografico nella speciazione (speciazione *allopatrica*). Questo tipo di speciazione si realizza quando popolazioni di una specie, separate per molte migliaia di anni da barriere geografiche, accumulano indipendentemente mutazioni a livello genico, cromosomico e genomico che differenziano i loro pools genetici fino a renderli «incompatibili», specialmente a livello meiotico. Tali popolazioni divengono così riproduttivamente isolate anche in casi di contatto secondario. Altri tipi di speciazione oggi ben documentati sono quello *semigeografico*, *simpatico*, *cromosomico*, per *autoploiploidia*, per *ibridazione* (allodiploidia e allopoliploidia), ecc. (WHITE, 1978; BULLINI, 1985a,b).

La stima dell'entità del differenziamento genetico che accompagna i vari processi di speciazione ha potuto essere realizzata solo di recente grazie ai progressi della genetica molecolare, della genetica biochimica e della citogenetica. Particolarmente fruttuose sono risultate le tecniche di confronto della struttura genetica di entità affini condotte mediante elettroforesi multilocus. I dati ottenuti con questo approccio vengono elaborati con formule statistiche, quali gli indici di identità e distanza genetica, messi a punto da vari autori (CAVALLI SFORZA e EDWARDS, 1967; BALAKRISHNAN e SANGHVI, 1968; HEDRICK, 1971; NEI, 1972; ROGERS, 1972). Riportiamo qui i metodi per calcolare gli indici maggiormente usati: quelli di Nei e di Rogers.

1) *Identità e distanza genetica standard* (NEI, 1972) - Se consideriamo due popolazioni, X e Y, in cui n alleli segregano ad un dato locus, e indichiamo con x_i e y_i le frequenze dell'allele i -esimo rispettivamente in X e Y, la probabilità che due alleli presi a caso all'interno di ciascuna popolazione siano uguali è rispettivamente:

$$j_x = \sum_{i=1}^n x_i^2$$

nella popolazione X, e: $j_y = \sum y_i^2$ nella popolazione Y; la probabilità che siano uguali due alleli del locus considerato, presi a caso in ciascuna delle due popolazioni, è:

$$j_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i$$

(le sommatorie sono effettuate su tutti gli alleli osservati al locus considerato). Se le mutazioni nucleotidiche sono indipendenti, l'identità genetica media normalizzata (standard) è data dalla formula: $I = J_{xy} / \sqrt{j_x j_y}$, dove J_x , J_y e J_{xy} rappresentano le medie aritmetiche di j_x , j_y e j_{xy} calcolate su tutti i loci studiati, inclusi i monomorfici. La distanza genetica media standard è invece: $D = -\log_e I$.

I valori di I variano da 1, quando le due popolazioni confrontate presentano frequenze alleliche identiche a tutti i loci, a 0, quando non hanno nessun allele in comune; in corrispondenza, D varia da 0 a ∞ . D rappresenta una stima del numero medio di sostituzioni alleliche, evidenziabili elettroforeticamente, accumulate nel genoma dal momento in cui le due popolazioni hanno cominciato a divergere. Tale stima parte, evidentemente, dal presupposto della neutralità selettiva di tutti i varianti allozimici (ipotesi *neutralista*). Benché tale ipotesi, in questa enunciazione estrema, sia ovviamente falsa sembra tuttavia probabile che la maggior parte degli allozimi attualmente presenti nei sistemi polimorfici delle varie popolazioni non determinino differenze significative di fitness ai loro portatori (va notato che tutti gli allozimi che diminuiscono sensibilmente la fitness del loro portatore vengono continuamente eliminati nel corso della storia evolutiva della specie, non superando la frequenza di allele raro). Inoltre il calcolo della divergenza genetica su un campione numeroso di loci compensa statisticamente effetti selettivi e stocastici.

La distanza genetica secondo Nei (D) tra due taxa è proporzionale al tempo di divergenza evolutiva. NEI (1975) ha dato una stima approssimativa di questa relazione con la formula $t = 5 \times 10^6 D$.

Autori successivi (SARICH, 1977; MAXSON e MAXSON, 1979) hanno proposto calibrazioni di tale formula tenendo conto del diverso tasso di evoluzione dei vari loci (vedi par. seguente).

2) *Distanza di Rogers* (1972) — Se sono presenti m alleli ad un locus, e x_i e y_i rappresentano le frequenze dell'allele i -esimo nelle popolazioni X e Y rispettivamente, la distanza di Rogers sarà $D_R = [\sum (x_i - y_i)^2]^{1/2}$. Questo indice corrisponde alla rappresentazione della distanza tra le due popolazioni in uno spazio a m dimensioni, corretta in modo da variare da 0 a 1 (ROGERS, 1972). Per più loci si utilizza la D_R media calcolata sul totale dei loci. Questo parametro, a differenza degli indici di Nei, soddisfa l'ineguaglianza del triangolo (è cioè un parametro metrico), per cui può essere utilizzato per costruire alberi filogenetici con metodi cladistici, come quello proposto da FARRIS (1972). L'indice di Rogers non è tuttavia proporzionale al tempo di divergenza evolutiva, né al numero di sostituzioni alleliche. Inoltre, nel caso in cui due popolazioni siano entrambe polimorfiche, ma non abbiano alleli in comune, il valore di D_R può essere molto minore di 1, portando quindi a una sottostima della divergenza genetica effettiva (NEI, 1987).

CONTRIBUTO DEI VARI LOCI ENZIMATICI ALLA DISTANZA GENETICA

I valori di distanza genetica risultano influenzati dalla composizione del campione di loci utilizzati. Enzimi che presentano un diverso grado di variabilità non daranno, evidentemente, lo stesso contributo alla divergenza genetica. In generale, i loci più variabili presentano un tasso di evoluzione molto più rapido rispetto ai loci poco variabili; i valori di D calcolati sui due gruppi di loci può essere molto diverso (SARICH, 1977). Un caso particolare è quello di loci codificanti per oligomeri a basso peso molecolare (per esempio MDH e SOD), che generalmente non risultano variabili né differenziati tra popolazioni locali, mentre tra sottospecie e specie danno valori di I delle due classi estreme (0 e 1), mostrando una rapida evoluzione da uno stato allelico ad un altro (EANES e KOHEN, 1978).

L'esistenza di due classi di loci strutturali, una caratterizzata da un tasso di evoluzione rapido (loci *fast evolving*), l'altra ad evoluzione lenta (loci *slow evolving*) risulta anche evidente dall'esame di istogrammi raffiguranti la distribuzione dei valori di identità genetica locus per locus in confronti tra specie affini, come quello riporta-

to nella fig. 3. Come si vede la grande maggioranza dei loci presenta valori di identità o molto elevati o molto bassi, mentre solo pochi loci presentano valori intermedi.

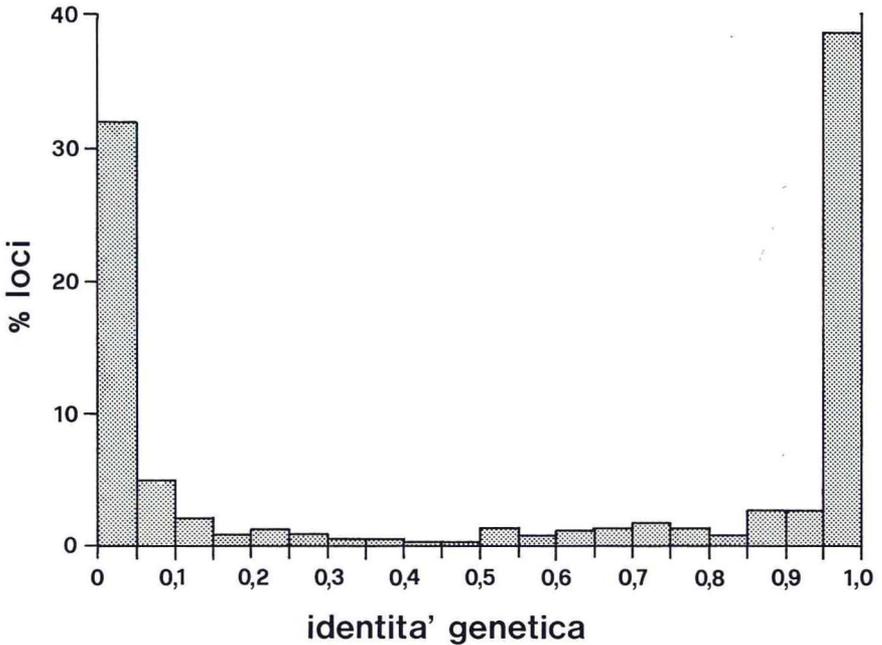


Fig. 3 - Istogramma della distribuzione dei valori medi di identità genetica (I) secondo Nei (1972) tra loci enzimatici utilizzati nei confronti tra specie gemelle del gruppo *Drosophila willistoni* (da Ayala, 1975).

Questa distribuzione fortemente bimodale delle identità genetiche tra i loci enzimatici è stata osservata non solo nei più diversi gruppi animali, dai ditteri ai roditori, dai nematodi ai molluschi gasteropodi, ma anche nelle piante. Tuttavia in queste ultime vi sono pochissimi studi in proposito (GOTTLIEB, 1981). Un esempio è mostrato in Fig. 4, in cui è illustrata la distribuzione dei valori di I_{Nei} di 20 loci in confronti interspecifici tra le orchidee *Orchis papilionacea* - *O. morio* e *O. longicornu* (ARDUINO *et al.*, dati non pubblicati). Come si vede i loci che più contribuiscono alla divergenza sono a substrato variabile (*Est-3*, *Est-6*), regolatori (*Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2*) e piccoli oligomeri (*Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3*).

Analogamente a quanto detto per le stime di variabilità genetica,

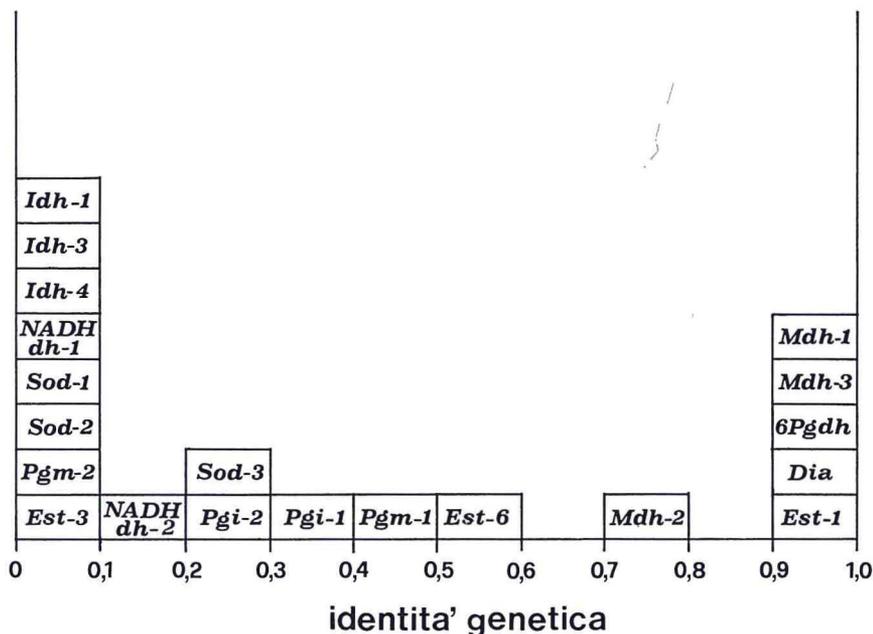


Fig. 4 - Istogramma della distribuzione dei valori medi di identità genetica (I) secondo Nei (1972) tra loci enzimatici utilizzati nei confronti interspecifici tra *Orchis papilionacea* e, rispettivamente, *O. morio* e *O. longicornu* (ARDUINO *et al.*, dati non pubblicati).

anche i valori di identità e di distanza genetica media tra popolazioni o taxa vanno calcolati, per essere attendibili e confrontabili, su un campione numeroso e rappresentativo di loci (20-30), che comprenda proporzioni note di loci fast e slow evolving.

ANALISI DELLA DIVERGENZA GENETICA TRA TAXA

Le ricerche sul differenziamento genetico tra popolazioni naturali e tra taxa, condotte mediante elettroforesi multilocus, sono assai più recenti e meno numerose nelle piante che non negli animali.

In questi ultimi i valori di distanza genetica tra popolazioni locali conspecifiche (espresse con l'indice di Nei) variano di solito tra 0,005 e 0,05; valori circa dieci volte superiori sono stati osservati tra sottospecie di una medesima specie (da 0,05 a 0,3); la distanza genetica tra specie affini, morfologicamente differenziate, varia in genere da 0,5 a 1. Un caso particolare è quello delle specie gemelle, che mostrano valori di D molto diversi. Ad esempio tra i roditori

Peromyscus boyli - *P. pectoralis* D_{Nei} è 0,03 (ZIMMERMANN *et al.*, 1978), mentre tra gli ascaridi *Parascaris univalens* - *P. equorum* D_{Nei} è 1,96 (BULLINI *et al.*, 1981). Questi dati indicano: 1) che i processi di speciazione non richiedono per realizzarsi cambiamenti in una porzione rilevante dei geni strutturali; 2) che il differenziamento genetico e quello morfologico possono essere largamente indipendenti; 3) che la distanza genetica è correlata positivamente con il tempo di divergenza evolutiva; 4) che l'isolamento riproduttivo può insorgere tra popolazioni con valori di distanza genetica molto diversi (BULLINI, 1980, 1985b).

Nelle piante le ricerche sul differenziamento genetico condotte con i metodi sopra descritti mostrano una maggiore eterogeneità, pur nell'ambito di un trend simile. Nelle Tab. III-V sono riportati i valori di identità (I) e distanza genetica (D) secondo NEI (1972) tra popolazioni locali, varietà, sottospecie e specie congeneriche in varie piante.

Tra popolazioni locali conspecifiche i valori di D mostrano in genere un più ampio range di variazione rispetto agli animali (generalmente tra 0 e 0,13), con una media di 0,05. Le piante autogame presentano in genere valori di distanza genetica interpopolazione assai eterogenei ($0 \leq D \leq 0,22$). Tra varietà e sottospecie conspecifiche vegetali le distanze genetiche partono da valori molto bassi ($D=0,01$) fino a raggiungere valori di circa 0,3 (GOTTLIEB, 1981; CRAWFORD, 1983). La differenza osservata rispetto agli animali per queste categorie tassonomiche è verosimilmente attribuibile al fatto che mentre gli zoologi considerano sottospecie entità il cui differenziamento morfologico si è realizzato in isolamento geografico, e quindi è correlato a un certo grado di divergenza genetica, i botanici utilizzano il rango di sottospecie o di varietà per distinguere forme spesso non allopatriche, il cui differenziamento morfologico è spesso legato a singoli caratteri polimorfici (cioè ad un singolo locus) o a una variabilità continua di tipo polifattoriale, spesso non accompagnata da livelli apprezzabili di divergenza genetica. Da ciò l'eterogeneità nelle piante di taxa quali le sottospecie e le varietà; quest'ultimo termine andrebbe rigorosamente limitato ai casi di polimorfismo morfologico.

Tra specie vegetali congeneriche il range di valori osservati di D varia da 0,01 a 1,31 (Tab. V). I valori più bassi di distanza genetica sono stati spesso osservati tra specie erbacee annuali morfologicamente molto simili, originatesi con processi di speciazione rapida (GOTTLIEB, 1981; CRAWFORD, 1983). Il loro isolamento riproduttivo è

TAB. III - Valori di identità genetica (I) e di distanza genetica (D) secondo Nei (1972) tra popolazioni locali conspecifiche. N=numero di loci saggiati elettroforeticamente; m.s.=mating system (out=allogamo; self=autogamo; mix=misto).

Taxa	I	D	N	m.s.	Autori
<i>Chenopodium incanum</i>					
var. <i>incanum</i>	0,94	0,06	12	self	Crawford, 1979, 1983
var. <i>elatum</i>	0,93	0,07	12	self	» » »
var. <i>occidentale</i>	1,00	0,00	12	self	» » »
<i>C. desiccatum</i>	0,96	0,04	12	self	Crawford & Wilson, 1979
<i>C. pratericola</i>	0,96	0,04	12	self	Crawford, 1983
<i>C. leptophyllum</i>	0,89	0,12	12	self	» »
<i>C. hians</i>	0,80	0,22	12	self	» »
<i>C. atrovirens</i>	0,97	0,03	12	self	» »
<i>Cirsium pitcheri</i>	0,98	0,02	14	mix	Loveless & Hamrick, 1988
<i>C. canescens</i>	0,93	0,07	10	mix	» » »
<i>Coreopsis cyclocarpa</i>					
var. <i>cyclocarpa</i>	0,98	0,02	>10	out	Crawford & Bayer, 1981
var. <i>pinnatisecta</i>	0,95	0,05	>10	out	» » »
<i>C. nuecensis</i>	0,97	0,03	15	out	Crawford & Smith, 1982a
<i>C. neucensoides</i>	0,96	0,04	15	out	» » »
<i>C. basalis</i>	0,94	0,06	14	out	Crawford & Smith, 1982b
<i>C. wrightii</i>	0,97	0,03	14	out	» » »
<i>C. leavenworthii</i>	0,97	0,03	20		Crawford <i>et al.</i> , 1984
<i>C. tinctoria</i>	0,96	0,04	20		» » »
<i>Elymus canadensis</i>	0,96	0,04	>10	out	Sanders <i>et al.</i> , 1979
<i>Gaillardia pulchella</i>	0,96	0,04	13	out	Heywood & Levin, 1984
<i>G. amblyodon</i>	0,97	0,03	>10		» » »
<i>Helianthus debilis</i>					
ssp. <i>debilis</i>	0,99	0,01	12	out	Wain, 1982
ssp. <i>tardiflorus</i>	0,99	0,01	12	out	» »
ssp. <i>vestitus</i>	0,99	0,01	12	out	» »
<i>Heuchera americana</i>	0,98	0,02	>10		Soltis, in Crawford, 1983
<i>Lasthenia minor</i>	0,91	0,09	20	out	Crawford <i>et al.</i> , 1985
<i>L. maritima</i>	0,90	0,11	20	self	» » »
<i>Layia fremontii</i>	0,98	0,02	17		Warwick & Gottlieb, 1985
<i>L. chrysanthemoides</i>	0,96	0,04	17	out	» » »
<i>L. jonesii</i>	0,97	0,03	17		» » »
<i>L. munzii</i>	0,98	0,02	17	out	» » »
<i>L. leucopappa</i>	0,97	0,03	17		» » »
<i>L. platyglossa</i>	0,88	0,13	17		» » »
<i>Limnanthes gracilis</i>					
var. <i>gracilis</i>	0,94	0,06	24		McNeill & Jain, 1983
var. <i>parishii</i>	0,97	0,03	24		» » »
<i>Limnanthes alba</i>					
var. <i>versicolor</i>	0,90	0,11	24		» » »
var. <i>alba</i>	0,97	0,03	24	out	» » »
<i>Limnanthes floccosa</i> (5 subsp.)	0,90	0,11	24	self	» » »
<i>L. montana</i>	0,93	0,07	24		» » »
<i>Lisianthus skinneri</i>	0,83	0,19	12		Sytsma & Schaal, 1985
<i>Lycopodium lucidulum</i>	0,98	0,02	18		Levin & Crepet, 1973
<i>Machaeranthera turneri</i>	0,97	0,03	>10	out	Arnold & Jackson, 1979
<i>M. parviflora</i>	0,93	0,07	>10		» » »
<i>M. boltoniae</i>	0,94	0,06	>10	out	» » »
<i>M. tenuis</i>	0,87	0,14	>10	out	» » »
<i>Pinus rigida</i>	0,97	0,03	>10	out	Guries & Ledig, 1982
<i>Phlox drummondii</i> (6 subsp.)	0,98	0,02	23	out	Levin, 1977
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0,99	0,01	>10	out	Yeh & O'Malley, 1980
<i>Sullivantia oregana</i>	1,00	0,00	>10	self	Soltis, 1981
<i>S. hapemanii</i>					
var. <i>purpusii</i>	0,93	0,07	>10	self	» »
var. <i>hapemanii</i>	0,98	0,02	>10	self	» »
<i>S. sullivantii</i>	0,92	0,08	>10	self	» »

TAB. IV - Valori di identità genetica (I) e di distanza genetica (D) secondo Nei (1972) tra varietà o sottospecie. N=numero di loci saggiati elettroforeticamente.

Taxa	I	D	N	Autori
<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>baccatum</i> -				
» » var. <i>pendulum</i>	0,98	0,02	26	McLeod <i>et al.</i> , 1982
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>incanum</i> -				
» » var. <i>aviculare</i>	0,93	0,07	26	» » »
<i>Chenopodium incanum</i> var. <i>incanum</i> -				
» » var. <i>occidentale</i>	0,92	0,08	>10	Crawford, 1983
<i>Chenopodium incanum</i> var. <i>incanum</i> -				
» » var. <i>elatum</i>	0,95	0,05	>10	» »
<i>Chenopodium incanum</i> var. <i>occidentale</i> -				
» » var. <i>elatum</i>	0,95	0,05	>10	» »
<i>Coreopsis cyclocarpa</i> var. <i>cyclocarpa</i> -				
» » var. <i>pinnatisecta</i>	0,75	0,29	>10	Crawford & Bayer, 1981
<i>Gaillardia pulchella</i> var. <i>pulchella</i> -				
» » var. <i>picta</i>	0,94	0,06	>10	Heywood & Levin, 1984
<i>Gaillardia pulchella</i> var. <i>pulchella</i> -				
» » var. <i>australis</i>	0,97	0,03	>10	» » »
<i>Gaillardia pulchella</i> var. <i>picta</i> -				
» » var. <i>australis</i>	0,94	0,06	>10	» » »
<i>Helianthus debilis</i> ssp. <i>vestitus</i> -				
» » ssp. <i>debilis</i>	0,89	0,12	12	Wain, 1982
<i>Helianthus debilis</i> ssp. <i>vestitus</i> -				
» » ssp. <i>tardiflorus</i>	0,98	0,02	12	» »
<i>Helianthus debilis</i> ssp. <i>debilis</i> -				
» » ssp. <i>tardiflorus</i>	0,92	0,08	12	» »
<i>Limnanthes gracilis</i> var. <i>gracilis</i> -				
» » var. <i>parishii</i>	0,76	0,27	24	McNeill & Jain, 1983
<i>Limnanthes alba</i> var. <i>versicolor</i> -				
» » var. <i>alba</i>	0,99	0,01	24	» » »
<i>Limnanthes floccosa</i> (5 sottospecie)	0,74	0,30	24	» » »
<i>Phlox drummondii</i> (6 sottospecie)	0,99	0,01	>10	Levin, 1977
<i>Plantago major</i> var. <i>major</i> -				
» » var. <i>pleiosperma</i>	0,99	0,01	>10	Van Dijk & Van Delden, 1981
<i>Sullivantia hapemanii</i> var. <i>hapemanii</i> -				
» » var. <i>purpusii</i>	0,94	0,06	>10	Soltis, 1981
<i>Tetramolopium humile</i> ssp. <i>humile</i> -				
» » «haleakalae»	0,99	0,01	22	Lowrey & Crawford, 1985
» » <i>filiformae</i> var. <i>filiformae</i> -				
» » «polyphyllum»	0,99	0,01	22	» » »
» » <i>rockii</i> var. <i>rockii</i> -				
» » «calcisabulorum»	0,99	0,01	22	» » »
» » <i>consanguineum</i> var. «kauense»-				
» » «leptophyllum»	0,95	0,05	22	» » »

basato generalmente su un fattore o su una combinazione di fattori comprendenti: cambiamenti nel sistema riproduttivo (per esempio da allogamo ad autogamo), nella fenologia fiorale, riordinamenti cromosomici, passaggio a pronubi diversi, ecc.

Uno dei primi esempi di questo tipo è quello studiato da GORTLIEB (1973b) delle composite *Stephanomeria exigua* subsp. *coronaria*, allogama, e di *S. malheurensis*, morfologicamente ed ecologicamente molto simile alla prima, ma autogama. *S. malheurensis* è sta-

TAB. V - Valori di identità genetica (I) e di distanza genetica (D) secondo Nei (1972) tra specie congeneriche. N=numero di loci saggiati elettroforeticamente.

Taxa	I	D	N	Autori
<i>Chenopodium atrovirens</i> - <i>C. desiccatum</i>	0,85	0,16	>10	Crawford, 1983
» » - <i>C. fremontii</i>	0,57	0,56	>10	» »
» » - <i>C. hians</i>	0,51	0,67	>10	» »
» » - <i>C. incanum</i>	0,40	0,92	>10	» »
» » - <i>C. leptophyllum</i>	0,64	0,45	>10	» »
» » - <i>C. pratericola</i>	0,97	0,03	>10	» »
» <i>desiccatum</i> - <i>C. fremontii</i>	0,56	0,58	>10	» »
» » - <i>C. hians</i>	0,35	1,05	>10	» »
» » - <i>C. incanum</i>	0,51	0,67	>10	» »
» » - <i>C. leptophyllum</i>	0,68	0,39	>10	» »
» » - <i>C. pratericola</i>	0,86	0,15	>10	» »
» <i>fremontii</i> - <i>C. hians</i>	0,43	0,84	>10	» »
» » - <i>C. incanum</i>	0,46	0,78	>10	» »
» » - <i>C. leptophyllum</i>	0,59	0,53	>10	» »
» » - <i>C. pratericola</i>	0,48	0,73	>10	» »
» <i>hians</i> - <i>C. incanum</i>	0,46	0,78	>10	» »
» » - <i>C. leptophyllum</i>	0,57	0,56	>10	» »
» » - <i>C. pratericola</i>	0,51	0,67	>10	» »
» <i>incanum</i> - <i>C. leptophyllum</i>	0,61	0,49	>10	» »
» » - <i>C. pratericola</i>	0,57	0,56	>10	» »
» <i>leptophyllum</i> - <i>C. pratericola</i>	0,62	0,48	>10	» »
<i>Cirsium canescens</i> - <i>C. picheri</i>	0,78	0,25	10-14	Loveless & Hamrick, 1988
<i>Clarkia rubicunda</i> - <i>C. franciscana</i>	0,28	1,27	>11	Gottlieb, 1973a
<i>Coreopsis nuecensis</i> - <i>C. nuecensoides</i>	0,97	0,03	15	Crawford & Smith, 1982a
» <i>basalis</i> - <i>C. wrightii</i>	0,92	0,08	14	Crawford & Smith, 1982b
» <i>basalis</i> - <i>C. nuecensoides</i>	0,77	0,26	14	» » »
» <i>basalis</i> - <i>C. nuecensis</i>	0,79	0,24	14	» » »
» <i>wrightii</i> - <i>C. nuecensoides</i>	0,73	0,31	14	» » »
» <i>wrightii</i> - <i>C. nuecensis</i>	0,76	0,27	0,14	» » »
» <i>leavenworthii</i> - <i>C. paludosa</i>	0,84	0,17	20	Crawford <i>et al.</i> , 1984
» <i>tinctoria</i> - <i>C. paludosa</i>	0,85	0,16	20	» » »
» <i>leavenworthii</i> - <i>C. tinctoria</i>	0,94	0,06	20	» » »
<i>Gaillardia pulchella</i> - <i>G. amblydon</i>	0,77	0,26	>10	Heywood & Levin, 1984
<i>Gaura longiflora</i> - <i>G. demareei</i>	0,99	0,01	>11	Gottlieb & Pilz, 1976
<i>Lasthenia minor</i> - <i>L. maritima</i>	0,89	0,12	20	Crawford <i>et al.</i> , 1985
<i>Layia fremontii</i> - <i>L. chrysanthemoides</i>	0,82	0,20	17	Warwick & Gottlieb, 1985
» » - <i>L. jonesii</i>	0,63	0,46	17	» » »
» » - <i>L. munzii</i>	0,59	0,53	17	» » »
» » - <i>L. leucopappa</i>	0,56	0,58	17	» » »
» » - <i>L. platyglossa</i>	0,64	0,45	17	» » »
» <i>chrysanthemoides</i> - <i>L. jonesii</i>	0,53	0,63	17	» » »
» » - <i>L. munzii</i>	0,58	0,54	17	» » »
» » - <i>L. leucopappa</i>	0,56	0,58	17	» » »
» » - <i>L. platyglossa</i>	0,51	0,67	17	» » »
» <i>jonesii</i> - <i>L. munzii</i>	0,88	0,13	17	» » »
» » - <i>L. leucopappa</i>	0,86	0,15	17	» » »
» » - <i>L. platyglossa</i>	0,61	0,49	17	» » »
» <i>munzii</i> - <i>L. leucopappa</i>	0,96	0,04	17	» » »
» » - <i>L. platyglossa</i>	0,67	0,40	17	» » »
» <i>leucopappa</i> - <i>L. platyglossa</i>	0,65	0,43	17	» » »
<i>Limnanthes</i> (4 specie)	0,65	0,43	24	McNeill & Jain, 1983
<i>Lisianthus habuensis</i> - <i>L. skinneri</i>	0,58	0,54	12	Sytsma & Schaal, 1985
» » - <i>L. jefensis</i>	0,62	0,48	12	» » »
» » - <i>L. peduncularis</i>	0,63	0,46	12	» » »
» » - <i>L. aurantiacus</i>	0,52	0,65	12	» » »
» <i>skinneri</i> - <i>L. jefensis</i>	0,60	0,51	12	» » »

TAB. V - (continua)

Taxa	I	D	N	Autori
<i>Lisianthus skinmeri</i> - <i>L. peduncularis</i>	0,47	0,75	12	Sytsma & Schaal, 1985
» » - <i>L. aurantiacus</i>	0,65	0,43	12	» » »
» <i>jefensis</i> - <i>L. peduncularis</i>	0,59	0,53	12	» » »
» » - <i>L. aurantiacus</i>	0,52	0,65	12	» » »
» <i>peduncularis</i> - <i>L. aurantiacus</i>	0,69	0,37	12	» » »
<i>Machaeranthera parviflora</i> - <i>M. turneri</i>	0,77	0,26	>10	Arnold & Jackson, 1979
» <i>boltoniae</i> - <i>M. mexicana</i>	0,76	0,27	>10	» » »
» » - <i>M. brevilingulata</i>	0,48	0,73	>10	» » »
» <i>brevilingulata</i> - <i>M. tenuis</i>	0,74	0,30	>10	» » »
» <i>tenuis</i> - <i>M. mexicana</i>	0,59	0,53	>10	» » »
<i>Phlox drummondii</i> - <i>P. cuspidata</i>	0,84	0,17	>11	Levin, 1978
» » - <i>P. roemariana</i>	0,70	0,36	>11	» » »
» <i>cuspidata</i> - <i>P. roemariana</i>	0,59	0,53	>11	» » »
<i>Stephanomeria exigua coronaria</i> - <i>S. malheurensis</i>	0,94	0,06	>11	Gottlieb, 1973b
<i>Sullivantia oregana</i> - <i>S. hapemanii purpusii</i>	0,87	0,14	>10	Soltis, 1981
» » - <i>S. sullivantii</i>	0,90	0,11	>10	» » »
» <i>hapemanii</i> - <i>S. sullivantii purpusii</i>	0,90	0,11	>10	» » »
» <i>hapemanii</i> - <i>S. sullivantii hapemanii</i>	0,90	0,11	>10	» » »
<i>Tetramolopium humile</i> - <i>T. filiformae</i>	0,97	0,03	22	Lowrey & Crawford, 1985
» » - <i>T. rockii</i>	0,96	0,04	22	» » »
» » - <i>T. «sylvae»</i>	0,99	0,01	22	» » »
» » - <i>T. remyi</i>	0,95	0,05	22	» » »
» » - <i>T. lepidotum</i>	0,87	0,14	22	» » »
» » - <i>T. consanguineum</i>	0,98	0,02	22	» » »
» <i>filiformae</i> - <i>T. rockii</i>	0,93	0,07	22	» » »
» » - <i>T. «sylvae»</i>	0,94	0,06	22	» » »
» » - <i>T. remyi</i>	0,92	0,08	22	» » »
» » - <i>T. lepidotum</i>	0,92	0,08	22	» » »
» » - <i>T. consanguineum</i>	0,96	0,04	22	» » »
» <i>rockii</i> - <i>T. «sylvae»</i>	0,97	0,03	22	» » »
» » - <i>T. remyi</i>	0,99	0,01	22	» » »
» » - <i>T. lepidotum</i>	0,91	0,09	22	» » »
» » - <i>T. consanguineum</i>	0,94	0,06	22	» » »
» <i>remyi</i> - <i>T. «sylvae»</i>	0,97	0,03	22	» » »
» » - <i>T. lepidotum</i>	0,92	0,08	22	» » »
» » - <i>T. consanguineum</i>	0,93	0,07	22	» » »
» <i>lepidotum</i> - <i>T. consanguineum</i>	0,90	0,11	22	» » »
» <i>consanguineum</i> - <i>T. «sylvae»</i>	0,96	0,04	22	» » »
<i>Tragopogon dubius</i> - <i>T. porrifolius</i>	0,50	0,69	>11	Roose & Gottlieb, 1976
» » - <i>T. pratensis</i>	0,62	0,48	>11	» » »
» <i>porrifolius</i> - <i>T. pratensis</i>	0,53	0,63	>11	» » »
<i>Typha latifolia</i> - <i>T. domingensis</i>	0,60	0,51	>11	Mashburn <i>et al.</i> , 1978

ta rinvenuta in un'unica popolazione in simpatria con *S. exigua*. Incroci tra i due taxa mostrano una minore produzione di semi e una ridotta fertilità degli ibridi di F₁, che dipende da differenze strutturali dei cromosomi. L'isolamento riproduttivo è anche assicurato dal diverso mating system. La loro distanza genetica secondo NEI (1972) è 0,06. Quest'autore ha ipotizzato un'origine molto recente di *S. malheurensis* da *S. exigua* subsp. *coronaria*, legata a una mutazione del gene per l'autoincompatibilità, che avrebbe prodotto una po-

polazione autogama di *coronaria* (individui autogami si rinvencono occasionalmente in questo taxon); in questa linea inbred sarebbero quindi diventati omozigoti dei riordinamenti cromosomici polimorfici nella popolazione ancestrale (GOTTLIEB, 1973).

UN ALTRO CASO È QUELLO DELLE ONAGRACEE *Gaura demareei* e *G. longiflora*, entrambe annuali, diploidi e allogame, morfologicamente molti simili (GOTTLIEB e PILZ, 1976). I due taxa differiscono principalmente nel tempo di fioritura: i fiori di *G. demareei* si aprono infatti al mattino, quelli di *G. longiflora* al tramonto. Le due specie differiscono anche per alcuni riordinamenti cromosomici. In laboratorio i loro ibridi di F_1 sono altamente fertili (70%). La distanza genetica tra *G. demareei* e *G. longiflora* è estremamente bassa: $D=0,01$. Il loro isolamento riproduttivo, oltre che temporale, è legato anche a pronubi diversi, farfalle notturne nel caso di *G. longiflora*, imenotteri per *G. demareei*. La base genetica dello sfasamento diurno della fioritura non è nota, ma è verosimilmente legata a pochi geni, poiché il fenomeno è stato osservato anche a livello intraspecifico (LEVIN, 1978; CRAWFORD, 1983).

Valori molto bassi di distanza genetica (D tra 0 e 0,15 con media 0,05) sono stati osservati anche tra le specie hawaiane del genere *Tetramolopium* (Compositae), che a differenza dei casi precedenti sono altamente differenziate sia morfologicamente che ecologicamente (LOWREY e CRAWFORD, 1985). Queste entità si sono originate verosimilmente in seguito ad un singolo evento di colonizzazione, nel tardo Pleistocene, con susseguente radiazione adattativa; la specie progenitrice proveniva dalla Nuova Guinea (FOSBERG, 1948; SMITH, 1977; LOWREY e CRAWFORD, 1985). Le specie di *Tetramolopium* hawaiane sono autocompatibili, diploidi, completamente interfertili in laboratorio, isolate in natura da barriere geografiche ed ecologiche (non vi sono casi di simpatria attuale e non sono stati rinvenuti ibridi). È stato ipotizzato che il differenziamento morfologico ed ecologico di queste specie sia legato a un numero molto limitato di geni (LOWREY e CRAWFORD, 1985).

Tra le piante sono finora pochissimi i casi di specie gemelle descritte, per cui è difficile fare un confronto con la situazione trovata negli animali. I dati disponibili indicano, comunque, che anche in questi organismi l'entità del differenziamento genetico può essere molto diversa, a seconda del tempo di isolamento. Un esempio è quello delle specie gemelle, o «microspecie» *Salicornia europea* e *S. ramosissima* (Chenopodiaceae), piante erbacee diploidi annuali, a pre-

valente autoincrocio, comuni nelle paludi salmastre europee. A livello morfologico sono praticamente indistinguibili, anche per la presenza di una notevole plasticità fenotipica e di fenomeni di differenziamento locale; vi sono invece differenze nella fenologia, con crescita dei semi continua in *S. europea* e ritardata in *S. ramosissima*. Quest'ultima prevale nelle parti superiori delle paludi, caratterizzate da condizioni più estreme (ipersalinità, minore potenziale d'acqua), mentre *S. europaea* appare più comune negli habitat sabbiosi e aperti delle parti inferiori delle paludi. Le due entità presentano alleli alternativi («diagnostici») a 6 su 30 loci (JEFFERIES e GOTTLIEB, 1982), ciò che corrisponde a una distanza secondo NEI (1972) di 0,22. L'esistenza di loci diagnostici ha permesso di chiarire la distribuzione delle due specie in Inghilterra, ove spesso coesistono anche se in rapporti molto diversi. La loro distribuzione riflette la frequenza e la durata delle inondazioni di marea della maggior parte delle paludi salmastre (JEFFERIES e GOTTLIEB, 1982).

STIME DI FLUSSO GENICO

Per flusso genico si intende il movimento di geni da una popolazione ad un'altra (generalmente conspecifica), che può essere causato da meccanismi diversi: 1) migrazione di individui; 2) movimento di gameti; 3) estinzione e ricolonizzazione di intere popolazioni; 4) movimento di segmenti extranucleari di DNA (per esempio mitocondri, plasmidi, virus).

Vi sono opinioni discordi sul ruolo evolutivo del flusso genico, legate in gran parte alla difficoltà di misurare questo parametro. Vari autori concordano con MAYR (1942, 1963), STANLEY (1979), SLATKIN (1985a) nel ritenere il flusso genico importante nel mantenere l'omogeneità genetica e fenotipica di una specie. Al contrario EHRlich e RAVEN (1969), ENDLER (1977) ed altri considerano il flusso genico poco importante dal punto di vista evolutivo, sulla base di due considerazioni: 1) l'osservazione in varie specie di una dispersione effettiva degli individui molto minore di quella potenziale; 2) l'ipotesi che pressioni selettive sufficientemente elevate possano superare l'effetto del flusso genico provocando differenziamento locale.

Su base teorica WRIGHT (1931) ha dimostrato che se una frazione m di individui di una popolazione è sostituita da migranti, in assenza di selezione non vi sarà differenziamento genetico significativo se $Nm > 1$, dove N è la dimensione effettiva della popolazione (l'au-

tore ipotizza in questo caso un modello di struttura di popolazione a «isole», in cui ogni popolazione è equivalente a tutte le altre e ha la stessa probabilità di ricevere ed inviare migranti da e a ognuna di queste). D'altra parte HALDANE (1930) ha dimostrato matematicamente che l'effetto unificante dell'immigrazione supera quello di una pressione selettiva di intensità s a favore di un allele adattato in un'unica popolazione se $m/s > 1$. L'importanza evolutiva del flusso genico dipende quindi sia da Nm che da m , oltre che dalle pressioni selettive ai singoli loci.

Sono stati elaborati vari metodi indiretti per valutare l'entità del flusso genico, e in particolare i valori di Nm e m , a partire dalle distribuzioni spaziali di alleli di un campione di loci analizzati elettroforeticamente. Questi metodi sono stati recentemente rivisti da SLATKIN (1981, 1985a). In particolare questo autore ha proposto un metodo grafico per una stima qualitativa di Nm sulla base delle frequenze medie, $p(i)$ degli alleli trovati solo in i delle d popolazioni studiate (frequenze medie condizionali). Tali frequenze risultano largamente indipendenti dai tassi di selezione e di mutazione, mentre dipendono fortemente dal livello medio di flusso genico. Una stima quantitativa di Nm può essere invece ottenuta a partire dalle frequenze $p(1)$ dei cosiddetti alleli privati (*private alleles*, NEEL, 1973), quelli cioè che vengono osservati in una sola delle popolazioni studiate. Sulla base di un modello di simulazione, $\ln p(1)$ risulta funzione lineare di $\ln Nm$ per un'ampia gamma di valori (SLATKIN, 1985b). La formula utilizzata è: $\ln p(1) = a \ln(Nm) + b$, con $a = -0,505$ e $b = -2,440$. Per bilanciare le differenze nella dimensione del campione, tra le varie popolazioni, il valore di Nm trovato viene diviso per $N_{\text{sam}}/25$, dove N_{sam} rappresenta la dimensione media del campione. I valori di flusso genico finora osservati variano da 0,1 a 42. Il primo valore è stato trovato in anfibi pletodontidi (SLATKIN, 1985b); nell'asteracea *Stephanomeria exigua* Nm è uguale a 1,4 (SLATKIN, 1985b); valori intorno a 4 sono presenti nell'onagracea *Clarkia speciosa* subsp. *polyantha* (SOLTIS e BLOOM, 1986), nelle orchidee *Orchis morio* e *O. papilionacea* (ARDUINO *et al.*, dati non pubblicati). Valori molto più elevati di Nm sono stati osservati nella pteridofita *Polystichum munitum* ($Nm=24$, SOLTIS e SOLTIS, 1987) e nel mollusco bivalve *Mytilus edulis* ($Nm=42$, SLATKIN, 1985b). Il metodo non permette comunque di distinguere tra livelli molto bassi di flusso genico in atto e assenza totale di flusso genico.

Altre stime indirette di Nm e di m si basano rispettivamente sul calcolo dei coefficienti di correlazione tra alleli (statistiche F ,

WRIGHT, 1951; NEI, 1973; REYNOLDS *et al.*, 1983) e sui valori di distanza genetica (NEI, 1975, 1987). In generale si assume che popolazioni di una specie con valori bassi di distanza genetica abbiano tra loro un flusso genico più elevato di popolazioni che mostrano valori maggiori di D .

ANALISI DEI FENOMENI DI IBRIDAZIONE E DI INTROGRESSIONE

Il possibile ruolo dell'ibridazione interspecifica e dell'introgresione nell'evoluzione delle popolazioni e delle specie è stato oggetto di numerosi lavori. Di particolare interesse a questo riguardo appare lo studio delle caratteristiche e del ruolo evolutivo delle cosiddette «zone ibride», aree più o meno ristrette in cui popolazioni, differenziate geneticamente in allopatria, vengono in contatto (*contatto secondario*) e si incrociano dando luogo a nuove combinazioni geniche.

L'analisi dell'ampiezza e della dinamica delle zone ibride permette di valutare: 1) l'importanza relativa delle pressioni selettive a favore o contro gli individui ibridi o introgressi; 2) il ruolo dei fenomeni di dispersione; 3) il ruolo dell'eterogeneità ambientale. Questi fenomeni sono stati oggetto di vari modelli matematici (per esempio FISHER, 1930; KEY, 1968; MOORE, 1977; BARTON e HEWITT, 1985), che tuttavia necessitano di una adeguata verifica sperimentale.

Le possibili conseguenze evolutive delle zone ibride sono numerose, e comprendono: a) un completo rimescolamento dei pools genici delle due entità; b) situazioni di equilibrio dinamico più o meno prolungate; c) l'evoluzione di efficienti barriere di isolamento riproduttivo.

Vari modelli di speciazione (per esempio quelli parapatrici, o il cosiddetto «shifting balance») prevedono l'esistenza e il movimento di zone ibride come tappa importante nel completamento dell'isolamento riproduttivo tra entità geneticamente differenziate.

La sola analisi morfologica, anche se può indicare l'esistenza di eventi ibridativi, non consente in genere di distinguere tra ibridi di F_1 , individui ricombinanti e introgressi, in quanto i caratteri analizzati hanno spesso base genetica relativamente complessa, quasi sempre non conosciuta. Con metodiche genetiche, e particolarmente mediante elettroforesi multilocus, tali valutazioni risultano invece possibili. A questo scopo vengono utilizzati loci che risultano differenziati (in genere per avere alleli alternativi fissati) nelle entità che ibridano. Tali loci fungono da marcatori dei genomi delle due entità

e permettono di identificare genotipi ibridi di F_1 e di generazioni successive (ricombinanti) e reincroci. È possibile, in tal modo, analizzare l'ampiezza della zona ibrida, la sua stabilità relativa, il suo livello di asimmetria, la penetrazione differenziale di determinati alleli, caratteristici di una delle due entità a determinati loci, all'interno dell'areale dell'altra. Vari studi di questo tipo sono stati condotti in numerosi gruppi animali, sia di invertebrati che di vertebrati (BARTON e HEWITT, 1985; HEWITT, 1988). Nelle piante, benchè l'ibridazione introgressiva sia stata considerata uno dei fattori principali di cambiamento evolutivo in molti gruppi (ANDERSON, 1949; STEBBINS, 1959, 1969; GRANT, 1981), la maggioranza degli studi sull'introggressione è basata solo su evidenze morfologiche (per esempio HEISER, 1949, 1951; GRANT, 1950; LEVIN, 1963; ORNDUFF, 1967; BLOOM, 1976; DAVIS, 1985). È sintomatico che nelle più recenti revisioni sulle zone ibride (HEWITT, 1988), meno di una decina di casi riguardino specie vegetali, contro più di 160 descritti negli animali.

Solo pochi autori, infatti, hanno utilizzato metodiche genetiche quali l'analisi elettroforetica multilocus per studiare l'ibridazione e l'introggressione nelle piante (BELL e LESTER, 1978; LEVIN, 1975; HEYWOOD, 1986; MILLAR, 1983; STEINBRÜCK *et al.*, 1986; ELLSTRAND *et al.*, 1987; WELLS, 1983; OLIVIERI, 1985; ROLLO *et al.*, 1985). Fenomeni di ibridazione accompagnati da livelli molto bassi di introggressione sono stati dimostrati tra *Phlox drummondii* e *P. cuspidata* (LEVIN, 1975), *Carduus pynoccephalus* e *C. tenuiflorus* (OLIVIERI, 1985), *Orchis palvens* e *O. mascula* (STEINBRÜCK *et al.*, 1986). In altre piante sono state invece osservati livelli di introggressione elevati, spesso con correlazione tra gradienti genetici e ambientali. Ad esempio tra *Orchis morio* e *O. longicornu*, orchidee morfologicamente molto simili e largamente allopatriche, è stata dimostrata un'estesa ibridazione, con introggressione in due aree di contatto: Sicilia e Corsica meridionale (ARDUINO *et al.*, dati non pubblicati). BELL e LESTER (1978) hanno dimostrato l'esistenza di ibridazione introgressiva tra le Gentianaceae *Sabatia arenicola* e *S. formosa*, con coincidenza di un cline morfologico e di frequenze alleliche lungo un gradiente edafico. Anche tra le Asteraceae *Cirsium californicum* e *C. occidentale* è stata dimostrata ibridazione e introggressione, con una differenziazione microgeografica dei vari genotipi correlata a caratteristiche microambientali (WELLS, 1983).

Una possibile conseguenza dell'instaurarsi di zone di ibridazione è l'origine di specie ibride, in cui coesistano i genomi di entrambe le specie parentali. Ciò richiede, in genere, l'affermarsi, al posto

della riproduzione sessuata, di particolari modalità riproduttive (apomissi, autofecondazione obbligatoria, ginogenesi, partenogenesi, ecc.), spesso unitamente alla fissazione di mutanti che modifichino in vari modi la meiosi (per esempio raddoppiamento premeiotico dei cromosomi, fusione del nucleo con il primo globulo polare, ecc.). L'analisi elettroforetica multilocus offre anche in questo caso dei marcatori per riconoscere l'origine ibrida di una specie e per identificarne le specie parentali, soprattutto se queste risultano differenziate a un certo numero di loci, che presentino alleli distinti nelle due entità parentali. Per una recente revisione della speciazione per ibridazione negli animali vedi BULLINI (1985a).

Nelle piante la speciazione per ibridazione è considerata un fenomeno molto diffuso, soprattutto associato alla poliploidia (vedi GRANT, 1981). Pochissimi casi sono stati tuttavia studiati mediante elettroforesi multilocus. Questi comprendono specie di origine ibrida sia diploidi che poliploidi. Un esempio del primo tipo è quello della Asteracea *Stephanomeria diegensis*, derivata dall'incrocio tra *S. exigua* e *S. virgata* (GALLEZ e GOTTLIEB, 1982). Le due specie parentali sono politipiche, ben distinte sia a livello morfologico che cariotipico. I loro areali sono largamente allopatrici, con sovrapposizione in California meridionale. Nelle aree di simpatria si trovano frequentemente ibridi molto vigorosi, che presentano una fertilità molto limitata (in laboratorio ibridi di F_1 mostrano una vitalità del polline del 14%) verosimilmente per anomalie alla meiosi legate alla presenza di riordinamenti cromosomici diversi nelle specie parentali. *S. diegensis* è una pianta endemica della California meridionale costiera, molto comune in habitat pionieri. Le sue caratteristiche morfologiche sono una combinazione di quelle di *S. exigua* ed *S. virgata*; il cariotipo è invece simile a quello di *S. exigua*. Ibridi sperimentali con *S. exigua* e *S. virgata* mostrano il 2% di vitalità. Le tre specie sono annuali, con allogamia obbligatoria.

A livello elettroforetico, *S. diegensis* presenta una combinazione degli alleli di *S. exigua* e *S. virgata*, ciò che conferma una sua origine ibrida. In particolare, ai quattro loci che consentono di discriminare le due specie parentali, *S. diegensis* risulta simile a *S. exigua* a due (*Sod* e *Tpi-2*), mentre presenta alleli di entrambe le specie agli altri due (*Got-1* e *Gdh*). Ciò indica che l'ibridazione di F_1 è stata seguita da generazioni ricombinanti e/o da reincroci con i parentali (in particolare con *S. exigua*), di cui una particolare linea è risultata fertile, evidentemente perché compatibile con i processi meiotici. Questa ipotesi è in accordo con uno dei modelli di speciazione

per ibridazione di GRANT (1981), secondo cui nuovi riordinamenti cromosomici omozigoti si possono formare dalla ricombinazione di due set distinti.

Nel caso di specie poliploidi, l'approccio elettroforetico consente di distinguere tra fenomeni di autopoliploidia e di allopoliploidia. Negli allopoliploidi si ha infatti eterozigosi fissata ai loci differenziati tra le specie parentali, determinata dall'appaiamento alla meiosi dei cromosomi omologhi derivati da uno stesso genitore, o da altri meccanismi che hanno lo stesso effetto, quali il raddoppiamento premeiotico o il riassorbimento del primo globulo polare. In tal caso l'allopoliploide costituisce un ibrido permanente di tipo F_1 (GOTTLIEB, 1981, 1983). In caso di autopoliploidia, invece, la specie poliploide sarà molto simile geneticamente a quella parentale diploide, differendone per eventuali mutanti accumulatisi dopo la sua origine. L'assenza di accoppiamenti preferenziali tra cromosomi omologhi determinerà segregazione ai loci polimorfici, con produzione di eterozigoti sbilanciati (per esempio in un tetraploide, a un locus con due alleli vi potranno essere tre tipi di eterozigoti: *AAaa*, *Aaaa* e *AAAA*).

Un esempio classico di allopoliploidi nelle piante analizzato mediante elettroforesi multilocus riguarda le specie tetraploidi *Tragopogon mirus* e *T. miscellus*, originatesi da incroci di *T. dubius* rispettivamente con *T. porrifolius* e *T. pratensis*. Le tre specie parentali sono diploidi biennali, diffuse nel Vecchio Mondo e ampiamente naturalizzate negli Stati Uniti. Sono autocompatibili e in grado di autoimpollinarsi. Tutte e tre sono ben distinte tra loro sia morfologicamente che a livello citologico e in simpatria formano frequentemente ibridi altamente sterili (OWNBEY, 1950; OWNBEY e McCOLLUM, 1953). Le due specie tetraploidi, *T. mirus* e *T. miscellus* si sono originate molto recentemente negli Stati Uniti e sono divenute rapidamente infestanti. A livello elettroforetico le tre specie diploidi presentano un livello di polimorfismo molto basso, con alleli distinti a vari loci (7 dei 21 studiati tra *T. dubius* e *T. pratensis*, 9 tra *T. dubius* e *T. porrifolius*). Gli individui delle specie poliploidi mostrano eterozigosi fissata a tali loci, con coesistenza di alleli delle rispettive due specie parentali (ROOSE e GOTTLIEB, 1976). Solo occasionalmente è stata osservata omozigosi per uno dei due alleli, verosimilmente dovuta a fenomeni di ricombinazione seguita da autofecondazione (ROOSE e GOTTLIEB, 1976).

Altri allopoliploidi studiati elettroforeticamente nelle piante sono i citotipi triploidi e tetraploidi della felce *Polypodium virginia-*

num, originatasi da incroci tra *P. virginianum* diploide e un'altra specie affine, verosimilmente *P. amorphum* (BRYAN e SOLTIS, 1987); sono inoltre state analizzate, spesso però solo per un numero molto limitato di loci, varie piante coltivate, quali il frumento (MITRA e BATHIA, 1971; HART, 1969, 1970, 1973, 1975), il cotone (CHERRY *et al.*, 1972), il tabacco (SMITH *et al.*, 1970; REDDY e GARBER, 1971; SHEEN, 1972), il cartamo (EFRON *et al.*, 1973), il fagiolo (GARBER, 1974).

Per quanto riguarda l'autopoliploidia, i casi studiati nelle piante sono estremamente limitati e riguardano *Coreopsis grandiflora* var. *longipes* (Asteraceae, CRAWFORD e SMITH, 1984); *Galax urceolata* (Dipsacaceae, EPES e SOLTIS, 1984) e *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae, SOLTIS e RIESENBERG, 1986). Per tutte queste entità l'analisi elettroforetica ha mostrato una elevata affinità genetica con la specie diploide di origine.

INFERENZE TASSONOMICHE E FILOGENETICHE DA DATI ELETTROFORETICI

Le tecniche elettroforetiche multilocus hanno importanti applicazioni in tassonomia (tassonomia biochimica) in quanto consentono di identificare entità difficilmente classificabili a livello morfologico (microspecie, specie gemelle, gruppi critici) e di evidenziarne l'eventuale status specifico. In situazioni di simpatria l'isolamento riproduttivo tra taxa può essere dimostrato direttamente ogni volta che esistano loci fissati per alleli alternativi (*loci diagnostici*) o comunque differenziati (tali da determinare scarti significativi dall'equilibrio di Hardy-Weinberg). In allopatria, invece, è necessario ricorrere a «transplantation experiments» che rendano artificialmente simpatriche le entità in studio (COLUZZI e BULLINI, 1971). Va infine notato che mentre valori bassi di distanza genetica (per esempio $< 0,2$) non rappresentano prove di specificità, valori elevati ($> 0,5$) corrispondono nella quasi totalità dei casi a buone specie.

Inoltre i caratteri enzimatici possono essere utilizzati per ricostruzioni filogenetiche (BULLINI e SBORDONI, 1980), in quanto: 1) essi riflettono condizioni di omologia: loci con funzione comune hanno generalmente un'origine comune (AVISE, 1974); 2) l'analisi elettroforetica consente di utilizzare molti caratteri indipendenti, le cui basi genetiche sono note; 3) l'entità della distanza genetica tra taxa è correlata al loro tempo di divergenza evolutiva.

Il metodo più comunemente usato per esprimere sinteticamente le relazioni di affinità genetica tra popolazioni e specie è la costru-

zione di dendrogrammi bidimensionali. Vi sono vari metodi per costruire tali dendrogrammi (SNEATH e SOKAL, 1973), che hanno diversa rilevanza filogenetica (PLATNIK, 1977). Il tipo più semplice e più usato è il metodo UPGMA (unweighted pair-group method of clustering, SOKAL e SNEATH, 1963). Per costruire un dendrogramma di questo tipo è necessario partire da una matrice di distanze genetiche come quella indicata in Tab. VI. I primi gruppi da unire sono quelli che presentano la distanza genetica più bassa. Questi due gruppi sono

TAB. VI - *Matrice dei valori di distanza genetica secondo Nei, 1972 (sopra la diagonale) e secondo Rogers, 1972 (sotto la diagonale) tra popolazioni e specie del complesso Lisianthus skinneri (Gentianaceae). LS4, LS6, LS7 = popolazioni locali di L. skinneri; LJ1 = L. jefensis; LH1 = L. habuensis; LP1 = L. peduncularis; LA1 = L. aurantiacus (dati da Systsma e Schaal, 1985).*

	LS4	LS6	LS7	LJ1	LH1	LP1	LA1
LS4	—	0,088	0,288	0,592	0,703	0,827	0,501
LS6	0,083	—	0,183	0,467	0,546	0,827	0,389
LS7	0,250	0,167	—	0,467	0,410	0,646	0,384
LJ1	0,458	0,392	0,392	—	0,473	0,528	0,650
LH1	0,509	0,425	0,342	0,400	—	0,468	0,656
LP1	0,563	0,563	0,479	0,424	0,384	—	0,364
LA1	0,399	0,337	0,307	0,473	0,489	0,321	—

combinati a formare un singolo gruppo; si calcolano quindi nuove stime di distanza genetica tra questo gruppo e gli altri. Lo stesso procedimento viene ripetuto finchè tutti i gruppi sono uniti in un unico cluster (NEI, 1975). Il dendrogramma così costruito (vedi esempio in fig. 5) può fornire due tipi di informazioni: una assoluta, che indica le distanze effettive tra i taxa in base alla loro topologia e le posizioni dei vari nodi sulla scala delle distanze genetiche (questi valori generalmente non sono identici a quelli della matrice di partenza per ragioni inerenti al metodo di costruzione del dendrogramma); l'altra, relativa, che prende in esame la posizione di un particolare taxon in un dato cluster. Alcune inferenze filogenetiche derivano principalmente dal secondo tipo di informazione, che dà più precise indicazioni sulle relazioni filetiche all'interno di un dato gruppo, purchè il dendrogramma comprenda un campione rappresentativo dei taxa esistenti entro il gruppo in esame. Deve essere chiaro

che un dendrogramma non può essere strettamente sovrapposto ad un albero filetico, in quanto riflette soltanto gradi di affinità geneti-

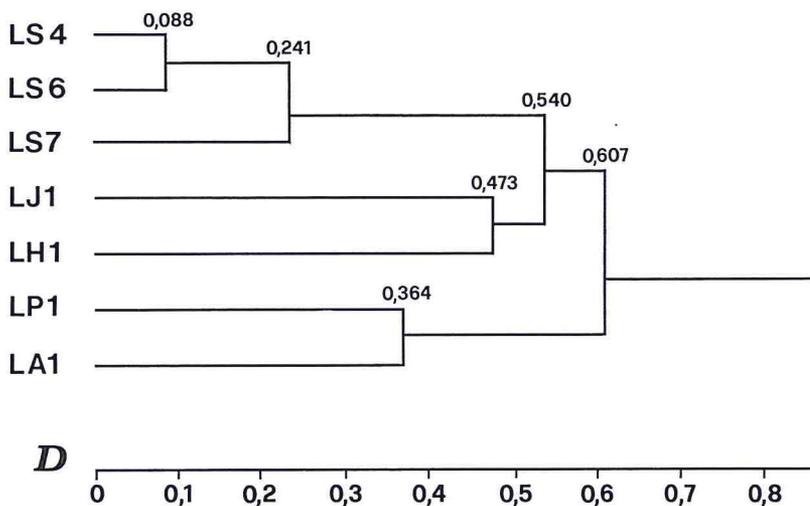


Fig. 5 - Dendrogramma UPGMA delle relazioni di affinità genetica tra popolazioni e specie del complesso *Lisianthius skinneri*, ottenuto dalla matrice dei valori di distanza genetica secondo Nei (1972), riportata in tab. 3. Per le sigle, vedi tab. 3.

ca, mentre gli alberi filogenetici cercano di scoprire le relazioni antenato-discendente indicando taxa esistenti o ipotetici come antenati.

Un'indagine filogenetica più approfondita si può ottenere mediante metodi cladistici (HENNIG, 1966; FITCH e MARGOLIASH, 1967; FARRIS, 1971), che possono essere applicati anche a dati allozimici (MICKEVICH e JOHNSON, 1976). Va ricordato che le unità base di confronto devono essere rappresentate da campioni casuali e sufficientemente numerosi di popolazioni mendeliane, raccolti sul campo, e rappresentativi dei loro pools genici. I ceppi di laboratorio, che sono frequentemente usati, possono dare risultati fuorvianti a causa di fenomeni stocastici o di inquinamenti. Un numero elevato di campioni risulta particolarmente necessario quando si studi una specie «politipica», o che comprenda popolazioni isolate da barriere geografiche. Un esempio di analisi cladistica condotta su dati elettroforetici (Tab. VI) è mostrato in fig. 6 (SYTSMA e SCHAAL, 1985).

Un'applicazione più estesa delle tecniche di analisi elettroforetica multilocus alle piante contribuirà certamente a una migliore in-

dividuzione di gruppi naturali e a un ordinamento più aderente alla loro storia evolutiva.

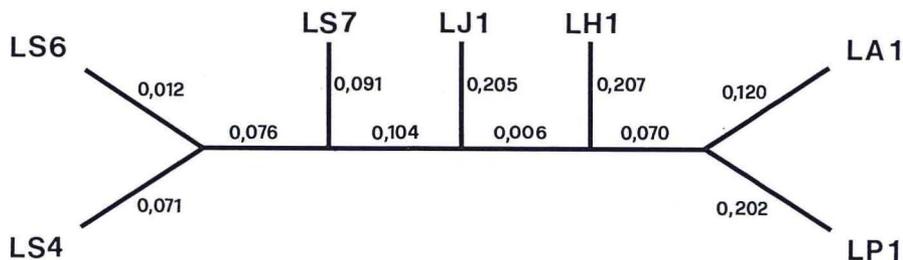


Fig. 6 - Analisi cladistica del complesso *Lisianthus skinneri*, ottenuta con il metodo di Fitch e Margoliash (1967) dalla matrice dei valori di distanza genetica secondo Rogers (1972), riportata in tab. 3. Per le sigle, vedi tab. 3.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON E. (1949) - Introgressive hybridization. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- AVISE J. (1974) - Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, **23**: 465-481.
- AYALA F.J. (1975) - Genetic differentiation during the speciation process. *Evol. Biol.*, **8**: 1-78.
- ARNOLD H.L., JACKSON R.C. (1979) - Genic differentiation in *Machaeranthera* section *Psilactis* (Compositae). *Southwest. Nat.*, **24**: 645-654.
- BAKER I., BAKER H.G. (1976) - Variation in an introduced *Lythrum* species in California vernal pools. In: «Vernal Pools: their Ecology and Conservation.», S. Jain (ed.), Davis, Calif. Inst. Ecol., pp. 63-69.
- BAKER J., MAYNARD-SMITH J., STROBECK C. (1975) - Genetic polymorphism in the bladder campion, *Silene maritima*. *Biochem. Genet.*, **13**: 393-410.
- BALAKRISHNAN V., SANGHVI L.D. (1968) - Distance between populations on the basis of attribute data. *Biometrics*, **24**: 859-865.
- BARTON N.H., HEWITT G.M. (1985) - Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **16**: 113-148.
- BELL N., LESTER L.J. (1978) - Genetic and morphological detection of introgression in a clinal population of *Sabatia* section *Campestris* (Gentianaceae). *Syst. Bot.*, **3**: 87-103.
- BLOOM W.L. (1976) - Multivariate analysis of the introgressive replacement of *Clarkia nitens* by *Clarkia speciosa polyantha* (Onagraceae). *Evolution*, **30**: 412-424.
- BOSBACH K., HURKA H. (1981) - Biosystematics studies on *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae): enzyme polymorphism in natural populations. *Plant Syst. Evol.*, **137**: 73-94.
- BROWN A.H.D., ZOHARY D., NEVO E. (1978) - Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. *Heredity*, **41**: 49-62.

- BRYAN F.A., SOLTIS D.E. (1987) - Electrophoretic evidence for allopolyploidy in the fern *Polypodium virginianum*. *Syst. Bot.*, **12** (4): 553-561.
- BULLINI L. (1980) - Aspetti genetici, ecologici ed etologici del processo di speciazione negli animali. *Acc. Naz. Lincei, Contr. del Centro Linceo Interdisciplinare di scienze matematiche e loro applicazioni*. VI. Seminario sulla *Evoluzione Biologica*, Roma, **51**: 29-59.
- BULLINI L. (1985a) - Speciation by hybridization in animals. *Boll. Zool.*, **52**: 121-137.
- BULLINI L. (1985b) - Biologia di popolazioni e speciazione. In: «La vita a la sua storia. Stato e prospettive degli studi di genetica», L. Bullini, M. Ferraguti, F. Mondello e A. Oliverio (eds.), *Scientia*, Milano, pp. 145-159.
- BULLINI L., SBORDONI V. (1980) - Electrophoretic studies of gene-enzyme systems: microevolutionary processes and phylogenetic inference. *Boll. Zool.*, **47** (suppl.): 95-112.
- BULLINI L., NASCETTI G., GRAPPELLI C. (1981) - Nuovi dati sulla divergenza e sulla variabilità genetica delle specie gemelle *Ascaris lumbricoides* - *A. suum* e *Parascaris univalens* - *P. equorum*. *Parassitologia*, **23**: 139-142.
- CAVALLI SFORZA L.L., EDWARDS A.W.F. (1967) - Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Amer. J. Hum. Genet.*, **19**: 233-257.
- CHERRY J.P., KATTERMAN F., ENDRIZZI J. (1972) - Seed esterases, leucine aminopeptidases and catalases of species of the genus *Gossypium*. *Theor. App. Gen.*, **42**: 218-226.
- CLEGG M.T., ALLARD R.W. (1972) - Patterns of genetic differentiation in the slender wild oat species *Avena barbata*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1820-1824.
- COLEMAN P. (1977) - Spatial and temporal variation in population structure of *Lolium multiflorum* Law. (Italian rye-grass). Ph. D. Thesis. Univ. California, Davis.
- COLUZZI M., BULLINI L. (1971) - Enzyme variants as markers in the study of pre-copulatory isolating mechanisms. *Nature*, **231**: 455-456.
- CRAIG K.L., MURRAY B.E., RAJHATHY T. (1974) - *Avena canariensis*: morphological and electrophoretic polymorphism and relationship to the *A. magna*-*A. murphyi* complex and *A. sterilis*. *Can J. Genet. Cytol.*, **16**: 677-689.
- CRAWFORD D.J. (1979) - Allozyme variation in *Chenopodium incanum*: intraspecific variation and comparison with *Chenopodium fremontii*. *Bull. Torrey Bot. Club*, **196**: 257-261.
- CRAWFORD D.J. (1983) - Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: «Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A», S.D. Tanksley & T.J. Orton (eds.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 257-287.
- CRAWFORD D.J., WILSON H.D. (1979) - Allozyme variation in several closely related diploid species of *Chenopodium* of the western United States. *Amer. J. Bot.*, **66**: 237-244.
- CRAWFORD D.J., BAYER R.J. (1981) - Allozyme divergence in *Coreopsis cyclocarpa* (Compositae). *Syst. Bot.*, **6**: 373-379.
- CRAWFORD D.J., SMITH E.B. (1982a) - Allozyme variation in *Coreopsis neucensoides* and *C. neucensis* (Compositae), a progenitor-derivative species pair. *Evolution*, **36**: 379-386.
- CRAWFORD D.J., SMITH E.B. (1982b) - Allozyme divergence between *Coreopsis basalis* and *C. wrightii* (Compositae). *Syst. Bot.*, **7**: 359-364.

- CRAWFORD D.J., SMITH E.B. (1984) - Allozyme divergence and intraspecific variation in *Coreopsis grandiflora* (Compositae). *Syst. Bot.*, **9**: 219-225.
- CRAWFORD D.J., SMITH E.B., PILATOWSKI R.E. (1984) - Isozymes of *Coreopsis* section *Calliopsis* (Compositae): genetic variation within and divergence among species. *Brittonia*, **36** (4): 375-381.
- CRAWFORD D.J., ORDNUFF R., VASEY M.C. (1985) - Allozyme variation within and between *Lasthenia minor* and its derivative species, *L. maritima* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.*, **72** (8): 1177-1184.
- DAVIS J.I. (1985) - Introgression in Central America *Phytolacca* (Phytolaccaceae). *Amer. J. Bot.*, **72** (12): 1944-1953.
- DE ARROYO M.T.K. (1975) - Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Limnanthes alba* and autogamous *Limnanthes floccosa* (Limnanthaceae). *Heredity*, **35**: 153-164.
- DIJK H. VAN, VAN DELDEN W. (1981) - Genetic variability in *Plantago* species in relation to their ecology. *Theor. Appl. Genet.*, **60**: 285-290.
- EANES W.F., KOEHN R.K. (1978) - Relationship between subunit size and number of rare electrophoretic alleles in human enzymes. *Biochem. Genet.*, **19** (9/10): 971-985.
- EFRON Y., PELEG M., AHSRI A. (1973) - Alcohol dehydrogenase allozymes in the safflower genus *Carthamus* L. *Biochem. Genet.*, **9**: 229-308.
- EHRlich P.R., RAVEN P.H. (1969) - Differentiation of populations. *Science*, **165**: 1228-1232.
- ELLSTRAND N.C., LEE J.M., KEELEY J.E., KEELEY S.C. (1987) - Ecological isolation and introgression: biochemical confirmation of introgression in an *Arctostaphylos* (Ericaceae) population. *Acta Oecologica Oecol. Plant.*, **8** (22), n° 4: 299-308.
- ENDLER J.A. (1977) - Geographic Variation, Speciation, and Clines. Princeton Univ. Press, N. J.
- EPES D.A., SOLTIS D.E. (1984) - An electrophoretic investigation of *Galax urceolata* (Diapensiaceae). Abstract, *Amer. J. Bot.*, **71** (2): 219-225.
- FARRIS J.S. (1971) - The hypothesis of non specificity and taxonomic congruence. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **2**: 277-302.
- FARRIS J.S. (1972) - Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Amer. Natur.*, **106**: 645-668.
- FERET P.P. (1974) - Genetic differences among three small stands of *Pinus pungens*. *Theor. Appl. Genet.*, **44**: 173-177.
- FINS L., LIBBY W.J. (1982) - Population variation in *Sequoiadendron*: seed and seedling studies, vegetative propagation, and isozyme variation. *Silvae Genet.*, **31**: 102-110.
- FISHER R.A. (1930) - The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon Press, Oxford.
- FITCH W.M., MARGOLIASH E. (1967) - Construction of phylogenetic trees. *Science*, **155**: 279-284.
- FOSBERG F.R. (1948) - Derivation of the flora of the Hawaiian Islands. In: «Insects of Hawaii», vol. 1, E. Zimmerman (ed.), Univ. of Hawaii Press, Honolulu, pp. 107-119.
- GALLEZ G.P., GOTTLIEB L.D. (1982) - Genetic evidence for the hybrid origin of the diploid plant *Stephanomeria diegensis*. *Evolution*, **36** (6): 1158-1167.
- GARBER E. (1974) - Enzymes as taxonomic and genetic tools in *Phaseolus* and *Aspergillus*. *Israel J. Med. Sci.*, **10**: 268-277.

- GILLESPIE J. (1974) - The role of the environmental grain in the maintenance of genetic variation. *Amer. Nat.*, **108**: 831-836.
- GILLESPIE J., KOJIMA K.I. (1968) - The degree of polymorphism in enzymes involved in energy production compared to that in non specific enzymes in two *Drosophila ananassae* populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**: 582-584.
- GOTTLIEB L.D. (1973a) - Enzyme differentiation and phylogeny in *Clarkia franciscana*, *C. rubicunda* and *C. amoena*. *Evolution*, **27**: 205-214.
- GOTTLIEB L.D. (1973b) - Genetic differentiation, sympatric speciation and the origin of a diploid species of *Stephanomeria*. *Amer. J. Bot.*, **60**: 545-553.
- GOTTLIEB L.D. (1975) - Allelic diversity in the outcrossing annual plant *Stephanomeria exigua* spp. *carotifera* (Compositae). *Evolution*, **29**: 213-225.
- GOTTLIEB L.D. (1977) - Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **64**: 161-180.
- GOTTLIEB L.D. (1981) - Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.*, **7**: 1-46.
- GOTTLIEB L.D. (1983) - Isozyme evidence and problem solving in plant systematics. In: «Plant Biosystematics», W.F. Grant (ed.), Academic Press, pp. 343-357.
- GOTTLIEB L.D., PILZ G. (1976) - Genetic similarity between *Gaura longiflora* and its obligately outcrossing derivative *G. demareei*. *Syst. Bot.*, **1**: 181-187.
- GRANT V. (1950) - Genetic and taxonomic studies in *Gila. Aliso*, **2**: 239-316.
- GRANT V. (1981) - Plant Speciation. Columbia Univ. Press, New York.
- GURIES R.P., LEDIG F.T. (1982) - Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Hill.). *Evolution*, **36**: 387-402.
- HALDANE J.B.S. (1930) - A mathematical theory of natural and artificial selection. Part IV. Isolation. *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **26**: 220-230.
- HAMRICK J.L., LINHART Y.B., MITTON J.B. (1979) - Relationship between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **10**: 173-200.
- HARRIS H., HOPKINSON D.A., EDWARDS H.Y. (1977) - Polymorphism and subunit structure of enzymes - Contribution to the neutralist-selectionist controversy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 698.
- HART G. (1969) - Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in *Triticum dicocum*. *Biochem. Genet.*, **3**: 617-625.
- HART G. (1970) - Evidence for triplicate genes for alcohol dehydrogenase in hexaploid wheat. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**: 1136-1141.
- HART G. (1973) - Homoeologous gene evolution in hexaploid wheat. *Proc. 4th Intern. Wheat Genet. Symp.*, 805-810.
- HART G. (1975) - Glutamate oxaloacetate transaminase isozymes of *Triticum*: evidence for multiple systems of triplicate structural genes in hexaploid wheat. In: «Isozymes III: Developmental Biology», Markert (ed.), Academic Press, New York, pp. 637-657.
- HEDRICK P.W. (1971) - A new approach to measuring genetic similarity. *Evolution*, **25**: 276-280.
- HEISER C.B. (1949) - Natural hybridization with particular reference to introgression. *Bot. Rev.*, **15**: 645-687.

- HEISER C.B. (1951) - Hybridization in the annual sunflower: *Helianthus annuus* x *H. debilis* var. *cucumerifolius*. *Evolution*, **5**: 42-51.
- HENNIG W. (1966) - Phylogenetic Systematics. Univ. Illinois Press, Urbana.
- HEYWOOD J.S. (1986) - Clinal variation associated with edaphic ecotones in hybrid populations of *Gaillardia pulchella*. *Evolution*, **40**: 1132-1140.
- HEYWOOD J.S., LEVIN D.A. (1984) - Allozyme variation in *Gaillardia pulchella* and *G. amblyodon* (Compositae): relation to morphological and chromosomal variation and to geographic isolation. *Syst. Bot.*, **9**: 448-457.
- HEWITT G.M. (1988) - Hybrid zones - Natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*, **3** (7): 158-167.
- HIEBERT R.D. (1977) - Ecology and demographic genetics of the bristlecone pine (*Pinus longaeva*) of the Great Basin. Ph. D. Thesis, Univ. Kansas, Lawrence.
- JAIN S.K. (1976) - The evolution of inbreeding in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **7**: 468-495.
- JAIN S.K., RAY K.N. (1974) - Population biology of *Avena*. IV. Polymorphism in small populations of *Avena fatua*. *Theor. Appl. Genet.*, **44**: 7-11.
- JEFFERIES R.L., GOTTLIEB L.D. (1982) - Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europaea* L. (sensu stricto) and *S. ramosissima*, J. Woods. *New Phytol.*, **92**: 123-129.
- JOHNSON G.B. (1974) - Enzyme polymorphism and metabolism. *Science*, **184**: 28.
- KEY K.H.L. (1968) - The concept of stasipatric speciation. *Syst. Zool.*, **17**: 14-22.
- KOHN R.K., EANES W.F. (1978) - Molecular structure and protein variation within and among populations. *Evol. Biol.*, **11**: 39-100.
- KOJIMA K., GILLESPIE J., TOBARI N. (1970) - A profile of *Drosophila* species' enzymes assayed by electrophoresis. I. Number of alleles, heterozygosities, and linkage disequilibrium in glucose-metabolizing systems and some other enzymes. *Biochem. Genet.*, **4**: 627-637.
- LEE D.W., POSTLE R.L. (1975) - Isozyme variation in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.: methods and preliminary analysis. *Br. Antarct. Surv. Bull.*, **41**: 133-137.
- LEVIN D.A. (1963) - Natural hybridization between *Phlox maculata* and *Phlox glaberrima* and its evolutionary significance. *Amer. J. Bot.*, **50** (7): 714-720.
- LEVIN D.A. (1975) - Interspecific hybridization, heterozygosity and gene exchange in *Phlox*. *Evolution*, **29**: 37-51.
- LEVIN D.A. (1977) - The organization of genetic variability in *Phlox drummondii*. *Evolution*, **31**: 477-494.
- LEVIN D.A. (1978) - Genetic variation in annual *Phlox*: self-compatible versus self-incompatible species. *Evolution*, **32**: 245-263.
- LEVIN D.A., CREPET W.L. (1973) - Genetic variation in *Lycopodium lucidulum*: a phylogenetic relic. *Evolution*, **27**: 622-632.
- LEVY M., LEVIN D.A., (1975) - Genic heterozygosity and variation in permanent translocation heterozygotes of the *Oenothera biennis* complex. *Genetics*, **79**: 493-512.
- LOVELESS M.D., HAMRICK J.L. (1984) - Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **15**: 65-95.
- LOVELESS M.D., HAMRICK J.L. (1988) - Genic organization and evolutionary history in two north American species of *Cirsium*. *Evolution*, **42** (2): 254-265.

- LOWREY T.K., CRAWFORD D.J. (1985) - Allozyme divergence and evolution in *Tetramolopium* (Compositae: Astereae) on the Hawaiian Islands. *Syst. Bot.*, **10** (1): 64-72.
- LUNDKVIST K. (1979) - Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of norway spruce (*Pinus abies* K.). I. Estimates of genetic variation within and among populations, genetic linkage and among mating system parameters. *Hereditas*, **90**: 127-143.
- MASHBURN S.J., SHARITZ R.R., SMITH M.H. (1978) - Genetic variation among *Typha* populations of the southeastern United States. *Evolution*, **32**: 681-685.
- MAXSON L.R., MAXSON R.D. (1979) - Comparative albumin and biochemical evolution in plethodontid salamanders. *Evolution*, **33**: 1057-1062.
- MAYR E. (1942) - Systematics and the Origin of Species. Columbia Univ. Press, New York.
- MAYR E. (1963) - Animal Species and Evolution. Harvard Univ. Press, Mass.
- MCCLURE S. (1979) - Allozyme variability in natural population of the yellow monkey-flower, *Mimulus guttatus*, located in the North Yuba River drainage. Ph. D. Dissertation, University of California, Berkeley.
- MCLEOD M. J., GUTTMAN S.I., ESHBAUGH W.H., RAYLE R.E. (1982) - An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution*, **37**: 562-574.
- MCCNEILL C.I., JAIN S.K. (1983) - Genetic differentiation studies and phylogenetic inference in the plant genus *Limnanthes* (section *Inflexae*). *Theor. Appl. Genet.*, **66**: 257-269.
- MEJNARTOWICZ L. (1976) - Genetic investigations on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) populations. *Arboretum Kornickie*, **21**: 126-187.
- MICKEVICH M.F., JOHNSON M.S. (1976) - Congruence between morphological and allozyme data in evolutionary inference and character evolution. *Syst. Zool.*, **25**: 260-270.
- MILLAR C.I. (1983) - A steep cline in *Pinus muricata*. *Evolution*, **37** (2): 311-319.
- MITRA R., BATHIA C. (1971) - Isoenzymes and polyploidy. I. Qualitative and quantitative isoenzymes studies in the Triticinae. *Genet. Res., Camb.*, **18**: 57-69.
- MOORE W.S. (1977) - An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quart. Rev. Biol.*, **52**: 263-277.
- NEEL J. V. (1973) - «Private» genetic variants and the frequency of mutation among South American Indians. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3311-3315.
- NEI M. (1972) - Genetic distance between populations. *Amer. Natur.*, **106**: 283-292.
- NEI M. (1973) - Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3321-3323.
- NEI M. (1975) - Molecular Population Genetics and Evolution. American Elsevier, New York.
- NEI M. (1987) - Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- NEVO E. (1978) - Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.*, **13**: 121-177.
- NEVO E., ZOHARY D., BROWN A. D., HABER M. (1979) - Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Israel. *Evolution*, **33**: 815-833.

- NEVO E., BEILES A., BEN SCHLOMO R. (1984) - The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life-history correlates. In: «Evolutionary dynamics of genetic diversity», G.S. Mani (ed.), Lecture notes in Biomathematics, **53**: 13-213.
- OLIVIERI I. (1985) - Comparative electrophoretic studies of *Carduus pycnocephalus* L., *C. tenuiflorus* Curt. (Asteraceae) and their hybrids. *Am. J. Bot.*, **72** (5): 715-718.
- ORNDUFF R. (1967) - Hybridization and regional variation in Pacific Northwestern *Impatiens* (Balsaminaceae). *Brittonia*, **19**: 122-128.
- OWNBEY M. (1950) - Natural hybridization and amphiploidy in the genus *Tragopogon*. *Amer. J. Bot.*, **37**: 487-499.
- OWNBEY M., MCCOLLUM G. (1953) - Cytoplasmic inheritance and reciprocal amphiploidy in *Tragopogon*. *Amer. J. Bot.*, **40**: 788-796.
- PLATNICK N.I. (1977) - Cladograms, phylogenetic trees, and hypothesis testing. *Syst. Zool.*, **26**: 438-442.
- POWELL J.R. (1975) - Protein variation in natural populations of animals. *Evol. Biol.*, **8**: 79-119.
- REDDY M., GARBER E. (1971) - Genetic studies of variant enzymes. III. Comparative electrophoretic studies of esterases and peroxidases for species, hybrids and amphiploids in the genus *Nicotiana*. *Bot. Gaz.*, **132**: 158.
- REYNOLDS J., WEIR B.S., COCKERHAM C.C. (1983) - Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, **105**: 767-779.
- RICK C.M., FOBES J.F. (1975) - Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species. *Bull. Torrey Bot. Club*, **102**: 376-384.
- RICK C.M., FOBES J.F., HOLLE M. (1977) - Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: evidence of evolutionary change in mating systems. *Plant Syst. Evol.*, **127**: 139-170.
- ROGERS J.S. (1972) - Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in Genetics VII, University of Texas Publications N° 7213, University of Texas, Austin, Texas, 145-153.
- ROLLO C.D., MCFARLANE J.D., SMITH B.S. (1985) - Electrophoretic and allometric variation in burdock (*Arctium* spp.): hybridization and its ecological implications. *Can. J. Bot.*, **63**: 1255-1261.
- ROOSE M.L., GOTTLIEB L.D. (1976) - Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon*. *Evolution*, **30**: 818-830.
- SANDERS T.B., HAMRICK J.L., HOLDEN L.R. (1979) - Allozyme variation in *Elymus canadensis* from the tallgrass prairie region: geographic variation. *Amer. Modl. Nat.*, **101**: 1-12.
- SARICH V.M. (1977) - Rates, sample sizes and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. *Nature*, **263**: 24-28.
- SCACCHI R., LANZARA G. (1989) - Isoenzyme polymorphisms in *Gymnadenia conopsea* and its inferences for systematics within the species. *Biochem. Syst. & Ecol.*, in press.
- SCHAAL B.A., LEVIN D.A. (1976) - The demographic genetics of *Liatris cylindracea* Michx. (Compositae). *Amer. Nat.*, **110**: 191-206.

- SCHAAL B.A., SMITH W.G. (1980) - The apportionment of genetic variation within and among populations of *Desmodium nudiflorum*. *Evolution*, **34**: 214-221.
- SELANDER R.K., KAUFMAN D.W. (1973) - Genic variability and strategies of adaptation in animals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 1875-1877.
- SENADHIRA D. (1976) - Genetic variation in corn and its relatives. Ph. D. Thesis. Univ. California, Davis.
- SHEEN S. (1972) - Isozymic evidence bearing on the origin of *Nicotiana tabacum*. *Evolution*, **26**: 143-154.
- SINGH R.S., JAIN S.K. (1971) - Population biology of *Avena*. II. Isoenzyme polymorphisms in populations of the Mediterranean region and central California. *Theor. Appl. Genet.*, **41**: 79-84.
- SLATKIN M. (1981) - Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics*, **99**: 323-335.
- SLATKIN M. (1985a) - Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **16**: 393-430.
- SLATKIN M. (1985b) - Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, **39**: 53-65.
- SMITH H.H., HAMILL D., WEAVER E., THOMPSON K. (1970) - Multiple molecular forms of peroxidases and esterases among *Nicotiana* species and amphiploids. *J. Hered.*, **61**: 203-212.
- SMITH J.M.B. (1977) - Origins and ecology of the tropicalpine flora of Mt. Wilhelm, New Guinea. *Bot. J. Linn. Soc.*, **9**: 87-131.
- SNEATH P.H., SOKAL R.R. (1973) - Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- SOKAL R.R., SNEATH P.H.A. (1963) - Principles of Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- SOLTIS D.E. (1981) - Allozymic variability in *Sullivantia* (Saxifragaceae). *Syst. Bot.*, **7**: 26-34.
- SOLTIS P.S., BLOOM W.L. (1986) - Genetic variation and estimates of gene flow in *Clarkia speciosa* subsp. *polyantha* (Onagraceae). *Amer. J. Bot.*, **73** (12): 1677-1682.
- SOLTIS P.S., SOLTIS D.E. (1987) - Population structure and estimates of gene flow in the homosporous fern *Polystichum munitum*. *Evolution*, **41** (3): 620-629.
- SOLTIS D.E., RIESENBERG L.H. (1986) - Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis. *Amer. J. Bot.*, **73** (2): 310-318.
- STANLEY S.M. (1979) - Macroevolution: Pattern and Process. Freeman, San Francisco.
- STEBBINS G.L. (1959) - The role of hybridization in evolution. *Proc. Amer. Phil. Soc.*, **103**: 231-251.
- STEBBINS G.L. (1969) - The significance of hybridization for plant taxonomy and evolution. *Taxon*, **18**: 26-35.
- STEINBRÜCK G., SCHLEGEL M., DAHLSTRÖM I., RÖTTGER B. (1986) - Characterization of interspecific hybrids between *Orchis mascula* and *O. pallens* (Orchidaceae) by enzyme electrophoresis. *Plant Syst. Evol.*, **153**: 229-241.
- SYTSMA K.J., SCHAAL B.A. (1985) - Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. *Evolution*, **39** (3): 582-593.
- TORRES A.M., DIEDENHOFEN U., BERGH B.O., KNIGHT R.J. (1978) - Enzyme polymorphism as genetic markers in the avocado. *Amer. J. Bot.*, **65**: 134-139.

- WAIN R.P. (1982) - Genetic differentiation in the Florida subspecies of *Helianthus debilis* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.*, **69** (10): 1573-1578.
- WARD R.D. (1977) - Relationships between enzyme heterozygosity and quaternary structure. *Biochem. Genet.*, **15**: 123.
- WARWICK S.I., MARRIAGE P.B. (1982) - Geographical variation in populations of *Chenopodium album* resistant and susceptible to atrazine. I. Between- and within- population variation in growth and response to atrazine. *Can. J. Bot.*, **60**: 483-493.
- WARWICK S.I., GOTTLIEB L.D. (1985) - Genetic divergence and geographic speciation in *Layia* (Compositae). *Evolution*, **39** (6): 1236-1241.
- WELLS H. (1983) - Hybridization and genetic recombination of *Cirsium californicum* and *C. occidentale* (Asteraceae: Carduaceae). *Madroño*, **30**: 12-20.
- WHITE M.J.D. (1978) - Modes of Speciation. Freeman, San Francisco, California.
- WRIGHT S. (1931) - Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**: 97-159.
- WRIGHT S. (1951) - The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, **15**: 323-354.
- WU L. (1976) - Esterase isoenzymes in populations of *Agrostis stolonifera* L. *Bot. Bull. Acad. Sinica*, **17**: 175-184.
- YEH F.C., O'MALLEY D. (1980) - Enzyme variation in natural populations of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genet.*, **29**: 83-92.
- ZIMMERMANN E.G., KILPATRICK C.W., HART B.J. (1978) - The genetics of speciation in the Rodent genus *Peromyscus*. *Evolution*, **32**: 565-579.
- ZOUROS E. (1976) - Hybrid molecules and the superiority of the heterozygote. *Nature*, **262**: 227.

(ms. pres. il 30 giugno 1989; ult. bozze il 2 dicembre 1989)

