UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

"ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE" - XVIII CICLO

"DESCRIZIONE DI UNA ZONA DI CONTATTO E IBRIDAZIONE TRA *Speleomantes italicus* e *S. ambrosii bianchii* (Amphibia: Plethodontidae) SULLE ALPI APUANE, MEDIANTE MARCATORI NUCLEARI E MITOCONDRIALI"

s.s.d. BIO/07

Coordinatore: Prof. Giuseppe Nascetti

Firma

Tutor: Dott.ssa Roberta Cimmaruta

Firma

Dottoranda: Alessandra Ruggi

Firma

INTRODUZIONE

CAP. 1 GENERALITA'

1.1 Generalità sui Pletodontidi - biologia e sistematica pag 1

1.2 Genere *Speleomantes* - sistematica, tassonomia, distribuzione geografica ed eco-etologia. pag 4

CAP. 2 GENERALITA' SULE ZONE IBRIDE

2.1 Le zone ibride pag 13

2.2 Origine e possibili conseguenze di una zona di contatto pag 15

2.3 Modelli di zone di contatto e ibridazione pag 20

- Vantaggio dell'ibrido in aree di transizione e/o ecotonali pag 21
- Zone di tensione pag 22
- Zone ibride a mosaico pag 24
- "Evolutionary Novelty" Model pag 25

CAP. 3 MATERIALI E METODI

3.1 Materiali pag 28

3.2 Metodi

- Estrazione del DNA e amplificazione mediante PCR pag 28
- Sequenziamento e analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione pag 29

3.2.1 Elaborazioni statistiche sui dati allozimici pag 32

- Variabilità genetica
- Verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, Linkage disequilibrium e F_{is} pag 32
- Differenziamento genetico tra popolazioni pag 33
- Indice di ibridazione e analisi delle classi genotipiche pag 34

3.2.2 Elaborazioni statistiche sui dati molecolari pag 35

- Diversità genetica e Neighbour joining (NJ)
- Network di parsimonia (TCS)

CAP. 4 RISULTATI

4.1 Allozimi

4.1.1 Struttura e variabilità genetica delle popolazioni studiate pag 36

- Differenziamento genetico tra *S. ambrosii ambrosii* *S. ambrosii bianchii* e *S. italicus* pag 40
- Variabilità genetica pag 43
- Verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, Linkage disequilibrium e F_{is} pag 45

4.1.2 Descrizione della zona di contatto e ibridazione pag 47

- Andamento delle frequenze alleliche ai sette loci discriminanti
- Descrizione dell'ampiezza, centro, e del pattern di introgressione pag 52
- Indice di Ibridazione (HI) e analisi delle classi genotipiche per popolazione. pag 53

4.2 Analisi della regione mitocondriale citocromo b

4.2.1 RFLP pag 57

4.2.2 Diversità nucleotidica e aplotipica pag 60

4.2.3 Neighbour Joining e network degli aplotipi pag 62

CAP. 5 DISCUSSIONE pag 66

CAP. 6 CONCLUSIONI pag 85

BIBLIOGRAFIA pag 89

Appendici pag 110

INTRODUZIONE

Le zone ibride, cioè regioni in cui individui provenienti da popolazioni geneticamente distinte si incrociano generando una progenie ibrida, sono state riconosciute soprattutto negli ultimi venti anni come terreno fertile per affrontare e capire fenomeni di natura evolutiva, come i modelli di speciazione ma soprattutto i processi microevolutivi. In accordo col concetto biologico di specie, le zone ibride rappresentano, all'interno di un processo di speciazione in condizioni allopatriche, "*una tappa intermedia tra conspecifico e specifico all'interno di un continuum di divergenza genetica ed evolutiva, che ragionevolmente porterà alla speciazione cioè al completamento dei meccanismi di isolamento riproduttivo"* (Mayr 1942). Le zone ibride possono essere in quest'ottica, indicatori di speciazione incipiente e rappresentano dei laboratori naturali per comprendere quindi i meccanismi che limitano il flusso genico ovvero i meccanismi di speciazione. Le zone ibride vengono quindi sempre più spesso prese in considerazione in studi di filogenesi proprio per le potenzialità sopra citate (Garcìa-Parìs *et al.* 2000; Weisrock *et al.* 2005; Bonnet 2002; Sites *et al*. 2004).

Gli eventi di ibridazione introgressiva naturale rappresentano inoltre su larga scala importanti fenomeni evolutivi nel generare nuovi genotipi, che porteranno o meno ad evoluzione adattativa fondando nuove discendenze evolutive (Bullini 1985; Arnold 1992, 1997, 2004; Barton 2001; Seehausen 2004). Ricordiamo anche il contributo che le zone ibride hanno recentemente dato nel campo della filogeografia, cioè nell'ambito di studi che vogliano ricostruire la biogeografia delle specie (Hewitt 2001, 2004).

Se i primi casi di zone di contatto utilizzavano prevalentemente un approccio elettroforetico (Szymura & Barton 1986; Cesaroni *et al*. 1992; Muller 1998; Jones & Collins 1992), talvolta unito ad analisi morfologiche, attualmente lo studio delle zone ibride si avvale dell'utilizzo di più marcatori molecolari, ecologici e morfologici, secondo un approccio comparato multi-markers. In particolare, accoppiando marcatori nucleari e mitocondriali, si possono mettere in evidenza pattern e processi evolutivi altrimenti insospettati (Alexandrino *et al*. 2000; Szymura & Barton 1991; Szymura *et al.* 2000; Jiggins *et al*. 1997; Cianchi *et al.* 2003).

Tra i vari marcatori molecolari, il DNA mitocondriale viene ormai utilizzato abitualmente nello studio delle zone ibride, grazie alle sue numerose potenzialità: permette di studiare la struttura genetica della zona con un maggiore grado di risoluzione, considerato il tasso di evoluzione più rapido per esempio rispetto agli allozimi, cui viene spesso affiancato. Può mettere in luce la direzionalità dell'introgressione e conseguentemente permette di fare considerazioni di carattere ecoetologico (Louise *et al*. 2001); permette di effettuare studi filogeografici, per comprendere in modo più approfondito i fenomeni evolutivi che hanno portato alla formazione della zona stessa evincendo i meccanismi storici che hanno portato le singole specie in contatto (Alexandrino *et al*. 2000, 2002); permette inoltre di inferire sulla tassonomia quindi identificare i confini tra le specie qualora accoppiato a marcatori nucleari (Phillips *et al*. 2004);

Il presente lavoro ha lo scopo di descrivere in dettaglio la struttura genetica della zona di contatto e ibridazione tra le specie *Speleomantes ambrosii bianchii*, tipica delle Alpi Apuane, e *Speleomantes italicus*, il cui range è molto più ampio e si estende dalle Alpi Apuane lungo l'Apennino tosco-emiliano fino all'Abruzzo. Sono stati analizzati 300 individui, provenienti da 38 popolazioni, mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) di una porzione del citocromo b di 501bp, il cui protocollo è stato messo a punto in questo lavoro. Per 162 di questi individui è stato sequenziato un frammento più lungo, 838bp, che include il precedente, a conferma e integrazione dei risultati ottenuti. I dati aplotipici sono stati confrontati nelle elaborazioni statistiche con i dati allozimici prodotti in un precedente studio che aveva identificato la presenza della zona ibrida stessa (Cimmaruta 1993). Si sono incluse nelle analisi statistiche sui dati allozimici e mitocondriali, anche le popolazioni note appartenenti alla sottospecie *S. ambrosii ambrosii* il cui areale si estende dalla parte sud della provincia di La Spezia, Appenino Ligure, fino alla parte meridionale della provincia di Massa Carrara, a ovest del fiume Magra.

Le finalità particolari dello studio sono state:

- Descrivere in maniera dettagliata la struttura genetica della zona in termini di variabilità genetica e differenziamento genetico.
- Verificare la collocazione e la relativa ampiezza del fronte di contatto tra le due specie, avanzare considerazioni di carattere eco-etologico e sulla dinamica di formazione della zona stessa.

- Studiare il pattern di introgressione ai loci discriminanti tra i due *taxa* anche mediante un approccio basato sui disequilibri genetici (deficit di eterozigoti e linkage disequilibria).
- Verificare l’eventuale sintopia di parentali e la presenza di ibridi di prima generazione. Quindi, considerando l’indice di ibridazione e i risultati del test di attribuzione degli individui a varie classi genotipiche, classificare la zona secondo una struttura uni- o bi-modale e confermare o meno l’attribuzione al modello più diffuso di zona di tensione.

CAP. 1 GENERALITA'

1.1 Generalità sui Pletodontidi

Biologia e Sistematica

La famiglia Plethodontidae (classe Amphibia - super ordine Batrachia – sottordine Caudata – superfamiglia Salamandroidea) è suddivisa in due sottofamiglie (Wake 1996; Duellman & Trueb 1986; Laurent 1986) Desmognatinae e Pletodontinae. Quest'ultima è suddivisa a sua volta in tre tribù: Hemidactyliini (sei generi), Plethodontini (tre generi) e Bolitoglossini (14 generi). Le specie appartenenti alle ultime due tribù sono caratterizzate dall'assenza di larve acquatiche, anche se recentemente è stata descritta *Pseudoeurycea aquatica* dallo stato messicano di Oaxaca (Wake & Campbell 2001).

I Plethodontidi sono la più grande famiglia dell'ordine Urodela, ne costituiscono circa il sessanta per cento delle specie attuali.

La famiglia include circa 270 specie suddivise in circa 27 generi (http://ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser), la maggior parte dei quali si trova nelle Americhe, dalla Nuova Scozia e dal Sud-ovest della British Columbia fino alla Bolivia centrale e al Brasile orientale, attraverso l'America centrale e la Colombia L'unico genere diffuso in Eurasia appartenente alla tribù bolitoglossini, è *Speleomantes* (Dubois 1984), che include relativamente poche specie (Lanza *et al.* 1995,1999), limitatamente alle Basses Alpes francesi, all'Italia centro settentrionale ed alla Sardegna (fig. 1).

I pletodontidi sono caratterizzati da una scarsa variabilità fisiologica e morfologica inter- e intra-specifica, mentre invece presentano una notevole variabilità genetica. Per esempio studi condotti mediante elettroforesi sui sistemi gene-enzima, hanno permesso di individuare numerose specie all'interno della famiglia (Wake 1981; Bullini 1980; Lanza *et al.* 1982, 1986). Altri caratteri distintivi sono la taglia piuttosto ridotta, la forma del corpo allungata e soprattutto un metabolismo relativamente basso. Negli esemplari adulti sono assenti i polmoni e gli scambi gassosi avvengono attraverso la pelle, soprattutto a livello della mucosa oro-faringea.

L'efficienza respiratoria in assenza di polmoni vincola i pletodontidi ad ambienti che presentano un alto tasso di umidità e temperature non troppo elevate. Sono animali



fig. 1 areale delle specie continentali del genere *Speleomantes*. A: *S. italicus*; B: *S. ambrosii ambrosii* e *S. ambrosii bianchii*; C: *S. strinatii*; D: *S. flavus*; E: *S. imperialis imperialis*; F: *S. imperialis serrabusensis*; G: *S. genei*

subtroglofili, possono vivere per brevi periodi, quando le condizioni climatiche lo consentono soprattutto in autunno ed in inverno, anche al di fuori delle grotte presentando una stagionalità comportamentale (Casali *et al*. 2002a; Forti *et al*. 2005). Questi anfibi rispondono all'insorgere di condizioni ambientali avverse (caldo arido) con periodi di inattività superficiale che si protraggono tanto quanto le condizioni sfavorevoli (Jaeger 1980; Feder 1983; Lanza *et al.* in prep.). Durante stagioni secche e calde le grotte, i sistemi di fessurazione o i massi addossati, forniscono microambienti e rifugi freschi ed umidi. Lunghi periodi di caldo e secco causano la scomparsa dei pletodontidi dagli ambienti superficiali e per questo i rifugi sono di grande importanza. Con questo tipo di strategia quindi questi animali riescono a mantenere costanti i livelli di attività non dovendosi adattare ai cambiamenti delle condizioni ambientali, possono così mantenere un tasso metabolico tra i più bassi mai osservati nei Vertebrati (Feder 1983).

Dal punto di vista tassonomico i pletodontidi sono stati considerati un taxa monofiletico, classificazione basata su criteri morfologici, tra cui i principali sono l'assenza di polmoni, lo sviluppo larvale diretto per tre dei quattro gruppi principali. L'evoluzione morfologica dei pletodontidi è caratterizzata da una estesa omoplasia e alcuni autori hanno cercato di indadagarne le cause (Wake 1966, 1981, 1991; Bullini 1983; Wake *et al*. 1983; Wake & Larson 1987; Parra-Olea & Wake 2001).
Lo studio della biologia sistematica dei pletodontidi ha ricevuto un notevole impulso con l'avvento delle tecniche biochimiche, elettroforetiche, immunologiche e recentemente anche molecolari (Larson & Wilson 1989; Larson 1990; Weisrock *et al.* 2005).
E' stato possibile riconoscere molte specie gemelle, come nel caso di *Plethodon dorsalis* (Highton 1979). In alcuni casi le ricerche genetiche hanno incentivato quelle morfologiche, come nel caso della salamandra del genere *Thorius* le cui dimensioni ridotte (1,5cm) avevano sempre scoraggiato un'analisi morfologica fino al momento in cui le indagini elettroforetiche rivelarono la presenza di due specie (Hanken 1980, 1983).
In un recente studio basato sull'analisi del DNA mitocondriale, in particolare sul sequenziamento completo di 24 genomi, l'ipotesi di monofilia per la sottofamiglia Plethodontinae viene rifiutata mentre si conferma quella per Desmognatinae. Nello studio vengono presi in considerazioni tre ricorrenti trasformazioni morfologiche (la

protusione della lingua, la riduzione in numero delle dita e l'autotomia della coda a scopi difensivi), che per certi versi suggeriscono nuovi scenari sull'evoluzione morfologica dei pletodontidi. Emerge alla luce di queste nuove relazioni evolutive tra gruppi, che lo sviluppo dello stadio larvale si sia evoluto più volte a partire da un antenato comune a sviluppo diretto.

Emerge altresì che non ci sono evidenze filogenetiche che supportino la teoria dell'origine dei pletodontidi al di fuori dei monti Appalachi (Mueller *et al.* 2004).

Riguardo questo ultimo punto bisogna ricordare che i pletodontidi presentano distribuzione disgiunta dell'areale, nord americana e europea. Anche altre famiglie appartenenti alla super famiglia Salamandroidea presentano areale disgiunto, come Proteidae (America del nord- Europa), Cryptobranchidae (America del nord-Asia).

Molti autori concordano nell'identificare l'area di origine della famiglia pletodontidi nei Monti Appalachi, da cui poi avrebbe invaso l'America settentrionale, centrale, l'Europa e secondo alcuni anche l'Asia. Questa teoria è supportata anche dalla filogenesi molecolare (Mueller *et al.* 2004).

Per spiegare l'attuale distribuzione relitta delle specie europee i pareri sono discordi. Fino ad oggi si ipotizzava un'origine neartica, quindi le ipotesi di come avessero potuto raggiungere l'Europa sono sostanzialmente due. Da un lato alcuni autori ipotizzano una diffusione per migrazione diretta verso est dall'America all'Europa passando attraverso l'Islanda; l'invasione è stata datata dal tardo Mesozoico al tardo Miocene (Dunn 1926; Lanza & Vanni 1981; Delfino 2002b; Lanza *et al.* in prep.).

Altri autori propendono per una migrazione indiretta dall'America attraverso il ponte sullo stretto di Bering verso l'Europa passando per l'Asia (Gorman 1964; Wake 1966; Duelmann & Trueb 1986; Jackman *et al.* 1997). Fino a quest'anno i records fossili non hanno dato nessun supporto ad una teoria piuttosto che ad un'altra perché provengono dall'areale attuale e sono relativamente recenti. In Europa sono stati rinvenuti sei reperti fossili di cui tre datati, due descritti e figurati e uno come comunicazione personale (Sondaar *et al*. 1984; Caloi *et al*. 1986; Delfino 2002a; Lanza *et al.* in prep.; Bailon Salvador, pers. comm. to Massimo Delfino, 18.IV.2002). Questi fossili risalgono al massimo al Pliocene e cioè a 5,3 milioni di anni fa, epoca in cui la disgiunzione dell'areale era già avvenuta.

Nel 2005 è stato scoperto il primo esemplare vivente di Pletodontide asiatico nelle foreste montane del sudovest della Corea, si chiama *Karsenia coreana*, in onore dello scopritore Stephen Karsen (Min *et al.* 2005). Morfologicamente assomiglia ai

pletodontidi del nord america in particolare al genere *plethodon.* L'analisi filogenetica rivela una stretta vicinanza con il "clade" che comprende il genere *Ensatina* e *Aneides* (tribù pletodontini), *Hydromantes* (bolitoglossini), e desmognatinae (salamandre), mentre *plethodon* è il sister taxon di tutti questi citati come in accordo con recenti studi di sistematica filologenetica (Chippindal 2004). Questa scoperta ha delle importanti implicazioni biogeografiche in quanto ora la famiglia Plethodontidae sembra avere una distribuzione oloartica sebbene risulti ancora abbastanza disgiunto l'areale. Alla luce di questa recente scoperta anche l'ipotesi di una colonizzazione dell'Europa dall'America ma passando per l'Asia potrebbe avere ulteriori supporti.

1.2 Il genere *Speleomantes*

Sistematica, tassonomia, distribuzione geografica ed eco-etologia

E' l'unico genere europeo di pletodontidi che include tutti i membri europei della famiglia. Le specie sono distribuite in Sardegna, eccetto che nella provincia di Sassari, nella Francia sud orientale e nell'Italia nord occidentale e centrale dalle Alpi Liguri all'Appennino centrale fino alla provincia di Pescara (Abruzzo) (Lanza *et al.* 1995) (fig.1).

Il genere appartiene alla sottofamiglia Pletodontini e alla tribù Bolitoglossini, l'unica che è stata in grado di colonizzare la regione neotropicale e l'Europa.

Il nuovo genere europeo *Speleomantes* (Lanza 1986b) è nato per differenziarsi dal genere americano *Hydromantoides* (Lanza & Vanni 1981). In seguito a numerose discussioni (Dubois 1995; Salvidio 1995; Smith *et al*. 1995, 1996), infine la proposta di Dubois (1995) di considerare il genere *Speleomantes* per le specie europee e *Hydromantes* per le specie americane, fu accettata dalla "International Commission on Zoological Nomenclature" (1999). La menzionata opinione della commissione è definita "anomala" da Lanza *et al.* (in prep.), poiché sarebbe più logico considerare come specie-tipo del genere *Hydromantes* la specie europea *Salamandra genei* descritta prima da Temminck e Schlegel (1838), piuttosto che l'americana *Spelerpes platycephalus* descritta da Camp (1916), come proposto anche da Smith & Wake (1993). Inoltre le ricerche condotte da Nacetti *et al*. (1996), dimostrarono la grande

distanza genetica tra la californiana "*Hydromantoides*" *shastae* e la specie sarda S*peleomantes genei* (D_{Nei} 3.38) e *Speleomantes imperialis* (D_{Nei} 3.92). Questo differenziamento genetico sembra dare ragione alla suddivisione di "*Hydromantes*" in due generi. La stessa conclusione sembra emergere anche dagli studi citomolecolari condotti da Nardi *et al.* (1999), in cui tutte e tre le famiglie di DNA ripetuto trovate nei Pletodontidi europei sono assenti nell'americano *Hydromantes shastae*.

Ad oggi sono state descitte sulla base di studi genetici e morfologici sette specie di *Speleomantes.* Tre specie continentali e quattro con areale sardo. Di queste ultime una è la più diffusa e tre sono politipiche con due sottospecie ciascuna (Lanza *et al.* 1986; Lanza *et al.* 1995; Nascetti *et al.* 1996; Forti *et al.* 1998; Cimmaruta *et al.* 2002; Lanza *et al.* 2001).

Le sette specie sono descritte qui di seguito.

Speleomantes ambrosii (Lanza 1955): dalla Liguria orientale alla Toscana nord orientale, dalla parte più estrema a sud-est della Provincia di Genova e dalla parte sud della provincia di La Spezia fino alla parte meridionale della provincia di Massa Carrara.

Speleomantes ambrosii ambrosii (Lanza 1955): copre la parte ligure del range fino a ovest del fiume Magra.

Speleomantes ambrosii bianchii: copre la parte toscana del range fino al vesante orientale del fiume Magra (Cimmaruta *et al.* 2002).

Speleomantes flavus (Stefani 1969): diffuso nel nord-est della Sardegna, nella provincia di Nuoro, lungo la catena del Monte Albo e sulle colline tra Siniscola e il fiume Posada.

Speleomantes genei (Temminck & Schlegel 1838): diffuso nella provincia di Cagliari, Sardegna sud occidentale e nel Sulcis-Iglesiente.

Speleomantes genei subsp. A: stesso range della specie, da cui la subsp. B è esclusa.

Speleomantes genei subsp. B: nel comune di Carbonia. Questo taxon potrebbe diventare una specie vera e propria.

Speleomantes imperialis (Stefani 1969): Sardegna centrale, centro orientale e sud orientale, nelle province di Nuoro, Oristano e Cagliari.

Speleomantes imperialis imperialis (Stefani 1969): lo stesso range delle specie, la subsp. *sarrabusensis* è esclusa.

Speleomantes imperialis sarrabusensis (Lanza *et al.* 2001): distribuita sul Monte dei Sette Fratelli, nel territorio del Sarrabus. Questo *taxon* potrebbe diventare una specie vera e propria.

Speleomantes italicus (Dunn 1923): Appennino Tosco-Emiliano, Alpi Apuane e Apennino centrale (Appennino Umbro-Marchigiano; Appennino Abruzzese) con le popolazioni agli estremi dell'areale collocate a nord presso S.M.M. in Vallestra (Reggio Emilia) e a sud presso Monte La Queglia vicino a Pescosansonesco (PE).

Speleomantes strinatii (Aellen 1958): distribuito nel sud-est della Francia nella parte più orientale del "Departement des Alpes-de-Haute-Provence" (Basses-Alpes) e "Departement des Alpes-Maritimes". In Italia si distribuisce in Liguria dalle Alpi Liguri all'Appennino Settentrionale (Appennino Ligure e la propaggine nord occidentale dell'Appennino Tosco-Emiliano), nelle provincie di Cuneo (meridionale), Imperia, Savona, Alessandria (meridionale), Genova, La Spezia (sud-occidentale), Massa-Carrara (nord-occidentale), Pavia (sud-occidentale), Piacenza e Parma.

Speleomantes supramontis (Lanza *et al.*1986): distribuzione in Sardegna centro orientale nei pressi del Golfo di Orosei, tra il mare e il Rio della Valle Oliena-Cedrino, nella provincia di Nuoro.

Come sottolineato in precedenza in generale per la famiglia pletodontidi, anche per il genere *Speleomantes* a una divergenza genetica anche considerevole spesso è associato un basso differenziamento morfologico (Nascetti *et al.* 1996).

Per questo motivo gli studi genetici su *Speleomantes* hanno fornito importanti risultati sia nella tassonomia che nella biogeografia, che nella storia evolutiva del genere. Sono stati applicati diversi approcci genetici, allozimici, cariologici e molecolari (Nascetti *et al*. 1996; Batistoni *et al.* 1991; Nardi 1991; Batistoni *et al.* 1995; Ruggi *et al.* 2002, 2005).

Le difficoltà di classificazione e di uso delle chiavi identificative restano. Spesso le difficoltà di classificazione nascono da fenomeni come la crescita allometrica (Lanza *et al.* 1995). Gli adulti delle tre specie "giganti" della Sardegna orientale (*S. flavus*, *S. supramontis*, *S. imperialis*) hanno una zampa più grande degli adulti delle specie "normali" (*S. genei*, S*. strinatii*, S*. ambrosii* e *S. italicus*); questa differenza si attenua o sparisce quando si paragonano animali della stessa taglia (es. individui a metà della loro crescita delle specie "giganti" con individui ben sviluppati delle specie cosiddette normali).

Considerate le dovute differenze, si può fare lo stesso discorso per altri caratteri

come i denti che sono ontogeneticamente variabili nelle salamandre. Le specie "giganti" per esempio hanno statisticamente un numero maggiore di denti premascellari, prevomerini e mandibolari che le specie *S. genei*, S*. strinatii*, S*. ambrosii* e S*. italicus* in entrambi i sessi. Questo non accade quando gli individui di queste specie completamente sviluppati vengono paragonati a quelli a metà sviluppo delle specie "giganti" di taglia simile. Quindi individui che provengono da località sconosciute potrebbero essere non correttamente identificati nemmeno su base osteologica. I taxa parapatrici comunque possono essere identificati con una certa accuratezza anche dove i rispettivi range si incontrano, perché possono mostrare differenze morfologiche e cromatiche (Lanza *et al.* in prep.).

Il genere *Speleomantes* è completamente terrestre e lo si rinviene in habitats differenti: foreste di conifere, boschi misti, aperta macchia, terreni rocciosi semi brulli, aree ad elevata ramificazione idrologica e zone con suoli meno fertili. Per quanto riguarda i livelli altitudinali, li troviamo dal livello del mare fino ad altitudini che raggiungono o superano, come nel caso di *S. strinatii*, i 2000 metri. La loro biologia e soprattutto le loro caratteristiche ecoetologiche legano questi animali alla vita nelle grotte di varia origine litologica e geologica, calcarea, metamorfica (Alpi Apuane) o sedimentaria. Adeguate caverne sotterranee più o meno articolate, forniscono a questi animali un ambiente favorevole per condizioni di umidità, temperatura, e cibo, soprattutto durante i periodi più o meno lunghi in cui le condizioni esterne sono proibitive, ad esempio freddo, caldo o secco molto intensi. *Speleomantes* abita indifferentemente sia grotte naturali che artificiali (miniere abbandonate, gallerie etc.) così come strutture superficiali (muretti a secco, muri di contenimento, etc.). Il rinvenimento di geotritoni presso corsi d'acqua è da considerarsi del tutto accidentale; *Speleomantes strinatii* è stato trovato a lato di fiumi in boschi igrofili ma anche in boschi di castagno abbastanza lontano da corsi d'acqua.
Da uno studio che analizza le condizioni climatico-vegetazionali di 24 siti posti nella Liguria orientale, di *S. strinatii* e *S. a. ambrosii* (Cimmaruta 1999), emerge che in condizioni allopatriche entrambe le specie sono state ritrovate pincipalmente in ambienti mesici, con temperatura media annuale e precipitazioni basse, alta percentuale di copertura vegetazionale (70%-100%), caratterizzati da boschi misti decidui.
In condizioni di parapatria con *S. strinatiii* invece *S. a. ambrosii* occupa soprattutto

ambienti xerici con scarsa copertura vegetazionale (30% -70%) come la macchia mediterranea e boschi di sclerofille.

S. italicus sull'Appennino Tosco-Romagnolo occupa boschi misti mesofili (Pastorelli *et al*. 2001; Casali *et al.* 2002a-b; Lanza *et al.* in prep.).

In Sardegna *Speleomantes* occupa zone pressoché brulle e a macchia mediterranea (Voesenek *et al.* 1987)

Da studi sulle erpetocenosi *sensu strictu*, per esempio di anfibi e rettili che presentano simili preferenze ecologiche, si può affermare che *Speleomantes* attualmente non condivide la sua nicchia con altre specie di anfibi e rettili.

I principali predatori di *Speleomantes* sono diverse specie di rettili come *Natrix natrix* (Linné, 1758) (Berg 1893), *N. tessellata* (Laurenti, 1768) and *N. maura* (Linné, 1758) e altre.

Speleomantes è vittima di molti piccolo mammiferi e uccelli notturni per la maggior parte come conseguenza delle abitudini notturne del genere (Puddu & Viarengo 1988).

Da studi sul contenuto stomacale di *S. strinatii* (Morisi 1981; Salvidio 1990) non è stata evidenziata nessuna specializzazione significativa nella predazione degli organismi tipici delle biocoenosi di profondità (troglobi e troglofili) che rappresentano solo il 1.27% e il 3.36% della dieta di *Speleomantes* rispettivamente, né degli organismi più rappresentativi del tratto vestibolare della grotta, come i troglosseni e le forme extra cavernicole che rappresentano rispettivamente il 36% e il 60% della dieta. Morisi (1981) e Salvidio (1990, 1992) accordano nel considerare *S. strinatii* un predatore opportunista in grado di predare tutti gli invertebrati delle opportune dimensioni: Oligochaeta, Gastropoda Polmonata, Crustacea, Isopoda, Araneae, Pseudoscorpiones, Opiliones, Acari, Diplopoda, Chilopoda, Thysanura, Collembola, Blattaria, Mantoidea, Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Neuroptera, Mecoptera, Trichoptera, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, and Hymenoptera.

Negli individui maturi il fabbisogno energetico è pienamente soddisfatto da prede anche di taglia grande mentre le piccolo prede sono relativamente più importanti nella dieta delle salamandre immature. Gli adulti inoltre hanno una nicchia trofica più ampia e ricca dei giovani.

In alcuni casi, apparentemente discordanti (Salvidio *et al.* 1994), è stato osservato che i giovani presentavano una nicchia trofica più ampia degli adulti. L' autore spiega questa situazione considerando che i giovani vengono segregati dagli adulti nella

parte anteriore della grotta vicino all'entrata dove possono predare una varietà di invertebrati maggiore.

Per quanto riguarda l'uso dell'habitat, *Speleomantes* tollera fuori dalle grotte temperature tra i 3.8 e i 22.0 °C con un tasso di umidità relativa tra il 67 e il 100%; ma non tollera lunghi periodi ad un'umidità relativa sotto il 70% (Durand 1970, 1973). Da una serie di esperimenti di termoregolazione su *S. strinatii* emerge che questi animali hanno una capacità di termoregolazione molto bassa (Cerchi 1952) soprattutto quando la temperatura dell'ambiente circostante è intorno ai 24 °C la loro capacità decresce fortemente.

Il genere continentale *Speleomantes* può essere classificato come euritermo piuttosto che oligotermo e stenoigro (Lanza 1999a).

Presumibilmente le specie sarde sono più resistenti al caldo che quelle continentali (Lanza 1999b).

Nelle grotte le condizioni di temperatura e umidità permettono agli animali di frequentare le parti della grotta verso la superficie o i tratti semi bui nei pressi dell'uscita dove solitamente c'è una ricca offerta di risorse di cibo rispetto ai tratti più profondi della cavità (Cimmaruta *et al.* 1999; Forti *et al.* 2002; Morisi 1981; Salvidio *et al.* 1994; Pastorelli *et al.* 2001, 2002).

I giovani S*peleomantes*, frequentano le zone vicino all'uscita mentre gli adulti si ritrovano nelle parti più profonde (Pastorino *et al.* 1997; Pastorelli *et al.* 2001, 2002; Forti *et al.* 2002). Questa segregazione spaziale tra i giovani e gli adulti è stata dimostrata anche per altre salamandre terrestri dei generi americani di pletodontidi come Desmognathus (Colley *et al.* 1989).

Non sembra che ci siano differenze statistiche fra la distribuzione spaziale degli adulti maschi e femmine, sebbene i maschi siano stati trovati ad una distanza media maggiore dall'entrata della grotta (Pastorelli *et al.* 2002; Lanza *et al.* in prep.). I subadulti mostrano una dispersione random. I giovani durante I periodi umidi possono muoversi al di fuori della grotta per diminuire l'interferenza con gli adulti (Salvidio *et al.* 1994), nutrirsi e colonizzare nuovi spazi. Sembra infatti che le i geotritoni migrino dagli habitat sotterranei verso l'esterno durante la primavera e l'autunno quando le condizioni lo permettono (Lanza 1999a). Particolare è da notare uno studio di Casali (2002a-b; Lanza *et al.* in prep.) sulle abitudini arboricole di *S. italicus* nella Repubblica di San Marino.

Nell'ambiente ipogeo sembra che le variabili ambientali come la temperature esterna

e l'umidità e la densità di invertebrati, soprattutto del genere Limonia, giochino un ruolo importante. Il periodo di massima attività all'esterno è l'inverno (Cimmaruta *et al*. 1999; Forti *et al.* 2002; Lanza *et al.* in prep.) Questo varrebbe per *S. strinatii* e *S. ambrosii* mentre per *S. italicus* sembra che l'attività ipogea raggiunga i massimi in estate e autunno e che ci sia una correlazione con le temperature all'interno della grotta (Pastorelli *et al.* 2002). Sembra quindi non esistere per tutte le specie di *Speleomantes*, un pattern definito di movimento, territorialità e capacità di orientamento (Lanza 1999a), mentre sembra sia di tipo "dispersion". Per questo sembra improprio distinguere fra popolazioni cavernicole e non (Bologna 1982; Salvidio 1990, 1991, 1992, 1996, 1998; Salvidio *et al.* 1994). Comunque i geotritoni sono territoriali e probabilmente filopatrici e non sono specie vagili nel senso comune del termine (Lanza 1986a).

Il comportamento predatorio di *Speleomantes* sembra essere statico a basso costo energetico, gli animali attendono che la preda si avvicini a parte qualche caso in cui cacciano ad esempio quando incontrano un verme (Freytag 1967; Diesener & Reichholf 1986; Lanza 1999a). Il comportamento antipredatorio coinvolge l'uso della coda in particolare l'ondulazione e l'elevamento del corpo, che consiste nell'inarcamento del tronco indietro, le colorazioni aposematiche e le escrezioni nocive attraverso la pelle.

L'ondulazione della coda sembra avere la funzione di spostare l'attenzione del predatore ad un organo che produce la maggior parte delle escrezioni tossiche.

Solo le femmine adulte mostrano il "beating behaviuor" e si ipotizza sia per difesa del nido; ipotesi che va verificata per il genere *Speleomantes,* mentre per alcuni pletodontidi americani è stato già dimostrato (Hom *et al.* 1987).

Un altro comportamento antipredatorio è la raccolta gli arti inferiori sotto per poi fuggire dal predatore rotolando su sé stessi, un comportamento osservato in *Speleomantes*, un altro comportamento antipredatorio è l'immobilità (Lanza 1999a).

Nella comunicazione in generale nei geotritoni gioca un ruolo fondamentale la chemiorecezione (Lanza 1999a) dalla ricerca del cibo alla comunicazione intra ed inter-specifica, così come molti aspetti del comportamento (corteggiamento, territorialità) sembrano mediati da segnali chimici ferormonali; i segnali chimici contengono informazioni sulla specie, il sesso, la condizione riproduttiva, la famigliarità in alcune specie di pletodontidi. Nel corteggiamento i feroromoni svolgono un importante ruolo nel riconoscimento ed attrazione del compagno e nella

persuasione all'accoppiamento da parte del maschio nei confronti della femmina; perfino la coordinazione dei movimenti dei due sessi per un efficace trasferimento della spertmatofora. I ferormoni vengono prodotti da ghiandole speciali che solitamente solo i maschi possiedono, anche se possono usare anche gli odori epidermici (Ovaska 1989).

I geotritoni sono caratterizzati da dimorfismo sessuale (Lanza *et al.* 1995). Il carattere che permette di distinguere nel miglior modo i due sessi in *Speleomantes* è la ghiandola mentoniera e i denti premascellari, entrambe caratteristiche dei maschi, e la morfologia della cloaca.

Lo sviluppo della ghiandola mentoniera è direttamente correlato al grado di maturità dei testicoli. Il muso è più prominente nei maschi e la superficie ventrale è d solito più o meno concava, mentre è piatta nelle femmine. Queste ultime possono raggiungere una taglia maggiore dei maschi, tuttavia differiscono da loro per la "body ratio"; per esempio hanno zampe più corte e un tronco più allungato (Lanza *et al* 1995, 1999). Anche in altri membri della tribù dei Bolitoglossini il dimorfismo sessuale è a carico delle femmine (Bruce 2000).

Per quanto riguarda il comportamento riproduttivo non ci sono molti studi a proposito anche per le intrinseche difficoltà correlate all'osservazione (Lanza 1999a). La deposizione sembra avvenire in ottobre, mentre il periodo di "courtship" in primavera. Il corteggiamento inizia con una serie di sfregamenti del maschio, attraverso la sua ghiandola mentoniera, sul corpo della femmina. Lo scopo sembra essere quello di aumentare l'attrazione della femmina. I maschi di pletodontidi utilizzano inoltre i loro larghi denti premascellari per "grattare" la pelle della partner al fine di inoculare le secrezioni della propria ghiandola mentoniera all'interno del sistema sanguigno della femmina, sortendo un effetto afrodisiaco (Arnold 1972, 1976, 1977; Houck *et al*. 1998). Qualche minuto dopo la femmina strisciando si allontana dal suo nascondiglio e si dirige verso il maschio che monta sulla sua schiena appoggiando la sua testa su quella della femmina. Il maschio abbraccia la femmina giusto dietro le sue ascelle, mantenendo il corpo e la coda strette intorno al corpo di lei. Inizia a ondeggiare la coda con movimenti serpentini. La femmina riesce a strisciare lentamente in avanti; il maschio viene trasportato per una breve distanza. Dopo 3-4 minuti il maschio rilascia la femmina. La copre per una seconda volta, non rimanendo a lungo sulla femmina che tenta di liberarsi dal maschio e ritorna nel suo nascondiglio. L'accoppiamento non dura più di una quindicina di minuti (Serra 1968).

Dopo la fine del nono inizio del decimo mese le uova schiudono. I piccoli sono lunghi circa due centimetri e mezzo dopo qualche ora sono già in grado di strisciare sul ventre. Sono completamente neri, Il giorno dopo la schiusa gli animali sono già in grado di arrampicarsi. Dopo qualche giorno invece già possono sollevare la testa, mantenere l'equilibrio, rigirarsi se cadono sulla schiena. All'età di un mese e mezzo i piccoli cominciano a cibarsi di prede di dimensioni adatte alla loro taglia e il pattern di colorazione si arricchisce in cromatofori dando la colorazione specie-specifica. Verso i cinque mesi di età i giovani raggiungono i 29-38 mm e l'anno successivo i 46-50 mm. Il terzo anno raggiungono una lunghezza di 80-89 mm e divengono poi adulti in breve tempo. I tassi di crescita giovanili vanno da 10 a 13 mm/anno (Salvidio 1993), tasso simile a quello riportato per altri pletodontidi che abitano le regioni temperate del continente americano (Bruce 1988, 1990).

La demografia di *Speleomantes* è stata studiata per alcune specie. La struttura di popolazione è costituita da tre classi di età (Salvidio 1993, 1998, 2001; Salvidio & Pastorino 2002; Pastorelli *et al.* 2001). Le due più piccole corrispondono rispettivamente ai giovani di uno e due anni di vita, la terza corrisponde a un gruppo di individui subadulti, del terzo-quarto anno di vita. Gli individui più piccoli vanno da 19 a 23 mm (Durand 1967). I maschi raggiungono la maturità nel loro terzo anno di vita, ad una taglia di almeno 50 mm. Le femmine sono mediamente più grandi (64 mm) e più pesanti dei maschi e possono arrivare ad una lunghezza di oltre 72 mm, contro 67 mm dei maschi, che diventano sessualmente maturi probabilmente un anno dopo le femmine e ad una taglia maggiore, almeno di 58 mm. Le femmine raggiungono la maturità sessuale tra il terzo e il quarto anno di vita dopo la schiusa (Durand 1970, 1973). La sex ratio studiata per *S. strinatii* è 1:1 sebbene sembri deviare verso un eccesso di femmine (Salvidio 1993; Pastorelli *et al.* 2001).

CAP. 2 GENERALITA' SULE ZONE IBRIDE

2.1 Le zone ibride

Le variazioni geografiche nella distribuzione delle popolazioni di una data specie che si riscontrano in vari tipi di organismi, si possono descrivere secondo i seguenti pattern strutturali proposti da Endler (1977).

1) DISGIUNZIONE – isolamento geografico di una o più popolazioni dal resto del taxon. Si possono distinguere:

- disgiunzione non differenziata, in cui le popolazioni separate restano simili (questo caso è più spesso risultato della mancanza di ricerche genetiche adeguate che di un processo di divergenza realmente recente).
- disgiunzione differenziata, in cui una o più delle popolazioni isolate si sono differenziate dalle altre.

2) SOVRAPPOSIZIONE – esiste una parziale o totale simpatria tra alcuni gruppi di popolazioni ed altri senza ibridazione nell'area di sovrapposizione.

3) ZONE IBRIDE – identificate come gruppi disgiunti di un insieme relativamente uniforme di popolazioni, collocati in regioni ristrette e separate caratterizzati da un notevole incremento di variabilità in fitness e morfologia, rispetto a quella attesa per un mescolamento casuale.

4) CONGIUNZIONE – gruppi di popolazioni distinti ma contigui non separati da zone di ibridazione in quanto riproduttivamente isolati.

Le zone ibride rappresentano un fenomeno diffuso in natura in vari tipi di animali e piante (Mayr 1942; Barton & Hewitt 1985; Harrison 1993; Jiggins *et al*. 1996; Mueller 1998; Bennuah 2004; Redenbach & Taylor 2003; Cianchi *et al*. 2003; Betteles *et al*. 2005) compresi alcuni casi descritti per specie appartenenti alla famiglia dei pletodontidi (Weisrock *et al*. 2005; Alexandrino *et al*. 2005; Sequeira *et al.* 2005).

Si origina una zona ibrida ogniqualvolta in natura due popolazioni di individui, distinguibili sulla base di uno o più caratteri ereditabili, si sovrappongono spazialmente e temporalmente ed incrociandosi danno origine a progenie vitale e, almeno parzialmente, fertile (Arnold 1997).

In altri casi la definizione di zona ibrida coincide con quella di cline, ovvero una distribuzione graduale nella frequenza di uno o più caratteri secondo una direttrice

geografica, che vede la progressiva trasformazione di una forma nell'altra (Barton & Hewitt 1981).

Le zone ibride sono caratterizzate da scarsa larghezza, a volte solo poche centinaia di metri (a causa dell'esistenza di un parziale isolamento post-mating che riduce la fitness dell'ibrido oppure in corrispondenza di una particolare situazione ecologica), rispetto all'estensione in lunghezza, che può raggiungere le decine e centinaia di chilometri, lungo il fronte di contatto delle due entità. Un esempio è il fronte di contatto lungo molte centinaia di chilometri tra *Bombina bombina* e *B. variegata* (Szymura 1993).

L'identificazione e analisi di zone ibride può basarsi su qualsiasi tipo di carattere purchè sia compatibile con la produzione di ibridi. Ad esempio si utilizzano caratteri morfologici, come le differenze nel piumaggio degli uccelli (Mayr 1963), comportamentali, come i richiami per l'accoppiamento nelle rane (Littlejohn & Watson 1985) o i patterns del canto negli uccelli (Salomon & Hemim 1992; Lein & Corbin 1990; Gee 2005), marcatori molecolari (allozimi, mtDNA, rDNA etc.) o cromosomici (Baker *et al.* 1989), oppure molecolari e morfologici, ad esempio il caso della zona ibrida di "Alpine weta" (*Hemideina maori* -Orthoptera Stenopelmatidae) in cui la colorazione del corpo è strettamente correlata con la variazione degli aplotipi mitocondriali (King *et al*. 2003).

Il grado di differenziamento riscontrato nell'analisi dei diversi tipi di caratteri considerati non è sempre confrontabile. In molti casi è stata dimostrata una correlazione tra differenziamento morfologico e genetico ma a volte la differenziazione ai vari livelli è molto diversa. Ad esempio alcune razze cromosomiche di *Sorex araneus*, per cui è stata evidenziata una zona d'ibridazione, non sono differenziate biochimicamente (Frykman & Bengtsson 1984). In altri casi ad una marcata differenziazione morfologica non ne corrisponde una biochimica, come nel caso del picchio americano *Colaptes auratus* (Moore & Buchanan 1985; Moore & Price 1993). Questo attesta che l'evoluzione procede per diverse vie, che possono essere quasi del tutto indipendenti fra loro.

2.2 Origine e possibili conseguenze di una zona di contatto

L'origine e le caratteristiche di una zona ibrida dipendono dalle modalità di distribuzione geografica delle due entità e del relativo incontro nonchè dal loro grado di differenziazione.

Mayr (1942) sostiene che le zone d'ibridazione siano il risultato di un contatto primario o secondario e che si possano quindi riconoscere zone di intergradazione primaria e secondaria, rispettivamente.

Le zone di intergradazione primaria si originano all'interno di una distribuzione continua, fra razze geografiche la cui differenziazione è avvenuta in presenza di flusso genico. Questo vale soprattutto per specie poco vagili, nelle quali la distribuzione frammentata delle popolazioni, assieme alla loro bassa vagilità, ne permette il differenziamento sebbene non ci siano barriere geografiche che impediscano il flusso genico.

Nelle zone d'intergradazione secondaria invece il differenziamento è avvenuto tra popolazioni allopatriche, separate da una barriera geografica e originatesi da una stessa popolazione ancestrale. A causa della scomparsa della barriera preesistente, l'areale delle due entità neodifferenziate si è potuto estendere fino a sovrapporsi e, allorchè non sia stato raggiunto l'isolamento riproduttivo prezigotico, si possono originare individui ibridi. Molti esempi di contatti secondari si hanno in membri della fauna dell'Europa centrale (Mayr 1942; Hewitt 1995, 2004) e del nord America (Remington 1968), in cui popolazioni occidentali ed orientali, precedentemente separate da ghiacciai e gelate distese di steppa, si sono incontrate e parzialmente sovrapposte in seguito all'aumento della temperatura media nel periodo seguente l'ultima glaciazione. Altri contatti secondari sono conseguenti a manipolazioni dell'ambiente ad opera dell'uomo (ad esempio massicci disboscamenti) o a fenomeni di trasporto passivo (Rubidge & Taylor 2004). In habitat disturbati aumenta la probabilità di incontro delle entità parentali adattate ad ambienti differenti, che possono dar origine incrociandosi ad una zona ibrida (Arnold 1997).

Spesso è difficile cercare di definire le zone ibride in base al tipo di contatto che le ha prodotte. Non è sempre facile distinguere tra situazioni di contatto primario e secondario (Endler 1977; Durrett *et al*. 2000), a meno che non siano a disposizione dati paleogeografici e paleoclimatici; per esempio è possibile che le popolazioni di una data specie si siano differenziate all'interno di una distribuzione continua mentre

le zone attuali siano il risultato di un contatto secondario (Barton & Hewitt 1985). Il dibattito sull'origine delle zone di contatto riflette quello correlato ai meccanismi di speciazione. Da un lato c'è chi sostiene che le zone ibride possano raggiungere una distribuzione bimodale, in cui le popolazioni sono costituite soprattutto da individui simili geneticamente ai genotipi parentali di una o dell'altra specie con pochi genotipi intermedi, soprattutto per accoppiamento assortativo piuttosto che per incompatibilità tra genomi ibridanti (coadattamento genico) come risultato di una divergenza genetica raggiunta in allopatria. In questo contesto è verosimile che la speciazione possa non aver richiesto condizioni allopatriche (Jiggins & Mallet 2000a).

Da un altro lato ci sono i sostenitori dell'isolamento geografico come prerequisito per l'evoluzione di barriere intrinseche al flusso genico, in quest'ottica la maggior parte delle zone ibride sono viste come il risultato di un contatto secondario (Hewitt 2004). Tuttavia se è possibile identificare l'origine della zona non necessariamente si ottengono informazioni circa il processo di speciazione (Barton & Hewitt 1981), che può venir "oscurato" da episodi di dispersione, colonizzazione ed estinzione locale (Harrison & Rand 1989).

Per una classificazione più realistica delle varie situazioni naturali è necessario tener conto del tipo di forze agenti all'interno della zona di contatto (differenti pressioni selettive, dispersione, variazioni nella struttura delle popolazioni etc.) che contribuiscono, attraverso il raggiungimento di differenti equilibri, a determinare la struttura della zona di contatto stessa.

A questo proposito sono state proposte diverse teorie per spiegare l'evoluzione di un contatto, sia esso primario o secondario, tra popolazioni geneticamente differenziate, e la dinamica dei fenomeni osservati.

Poichè in realtà risulta essere abbastanza difficile definire leggi generali per spiegare i singoli casi, alcuni autori (Barton & Hewitt 1985; Hewitt 1986, 1987) hanno fuso le varie teorie per tentare di spiegare situazioni molto diverse tra loro a causa del diverso grado di differenziamento raggiunto dalle popolazioni in contatto e a differenti variabili ambientali.

In generale quando due popolazioni in espansione, geneticamente differenziate, s'incontrano, secondo il grado di isolamento riproduttivo e di compatibilità ecologica raggiunti, si possono realizzare diversi eventi:

1) Se è stato acquisito completo isolamento riproduttivo (pre-copula) e compatibilità ecologica, le due neospecie potranno largamente sovrapporsi formando una zona di simpatria.
2) Se si sono sviluppati meccanismi di isolamento riproduttivo (pre-copula) ma non compatibilità ecologica l'esclusione competitiva, secondo il principio di Gause, manterrà gli areali contigui, se l'ambiente non è abbastanza eterogeneo da consentire la diversificazione delle nicchie .
3) Se non sono state acquisite efficienti barriere anti-ibridazione si svilupperà una fascia di ibridazione nella zona di contatto più o meno ampia in relazione a fattori ecologici e genetici. Se l'isolamento è post-zigotico (non vitalità o sterilità dell'ibrido), gli ibridi saranno rappresenteti essenzialmente da individui F_1 o prodotti di reincrocio; si creeranno quindi zone ibride molto ristrette. Zone di ibridazione di questo tipo si osservano tra *Bufo boreas* e *B. punctatus* nelle oasi californiane (Feder 1979) e tra le razze cromosomiche della cavalletta *Warramaba virgo* (White & Contreras 1979).
In seguito alla formazione di ibridi si potrà verificare:
a) Diffusione degli alleli differenziati tra le due forme nel caso però in cui la fitness degli ibridi non sia sufficientemente bassa (Wilson 1965) da permettere alla selezione di completare l'isolamento riproduttivo mediante il meccanismo del rinforzo (Dobzhansky 1940), cioè laddove gli alleli in questione risultino neutrali. Il cline che si verrà a formare avrà un andamento graduale; la diffusione dipenderà dall'eterogeneità ambientale, dalla densità della popolazione e dalla sua struttura locale nonché dalla capacità di dispersione degli individui.
Nel tempo, tramite il ponte di introgressione degli ibridi vitali e fertili, potrebbe avvenire la fusione dei taxa ibridanti (Dobzhansky 1940; Remington 1968).
b) Fissazione dell'allele vantaggioso; si realizza quando il differenziamento delle due popolazioni produce un vantaggio selettivo relativo agli alleli di uno o più loci, in una delle due popolazioni. L'allele vantaggioso andrà progressivamente sostituendo nell'altra popolazione l'allele che conferisce una fitness minore; questo fenomeno è detto "onda di progressione di un allele vantaggioso" (Fisher 1937). L'estensione del cline corrispondente sarà determinata dal grado di dispersione dell'allele e dalla portata del vantaggio selettivo dello stesso (Piàlek & Barton 1997)
c) La formazione di un cline ambientale. Qualora le due forme abbiano raggiunto diversi adattamenti ad ambienti differenti (diversificazione di nicchia) e la variabilità genetica risulti strettamente correlabile con quella ambientale, gli alleli delle due

forme risulteranno vantaggiosi in ambienti differenti, pertanto le forze selettive saranno responsabili dell'estensione del cline insieme all'ampiezza della zona di transizione delle variabili ambientai interessate.

A questo proposito si può notare che nella maggioranza dei casi l'ibridazione è più frequente in zone di transizione ecologica come gli ecotoni. Il cline sarà soggetto ad un gradiente omogeneo di pressioni selettive, quindi ci si attende che a variazioni ambientali, per esempio dell'estensione ecotonale, corrisponda una estensione della zona ibrida.

Le zone ibride possono rappresentare un contesto naturale in cui l'evoluzione possa completare i meccanismi di isolamento riproduttivo pre-mating perfezionando l'isolamento post-mating precedentemente raggiunto tra due entità già parzialmente differenziate, accellerando così la speciazione (Dobzhansky 1940, 1970). Questo potrebbe avvenire mediante il già citato fenomeno del "rinforzo" (Butlin 1989). Il rinforzo dei sistemi di isolamento pre-copula è inteso come un crescente isolamento riproduttivo prodotto esclusivamente dalla selezione contro gli ibridi non adatti, che favorisce quindi la diffusione dei tratti che accrescono l'accoppiamento assortativo. Ci sono casi validi che testimoniano il fenomeno del rinforzo. Ad esempio la zona ibrida tra la balia dal collare e la balia nera, in cui individui di popolazioni allopatriche si accoppiano in modo meno assortativo di individui simpatrici. Sembra che questo sia il risultato di una divergenza *in situ* nel colore del piumaggio, tratto geneticamente determinato. In questa zona ibrida c'è una selezione contro gli ibridi e una divergenza in simpatria delle preferenze per la scelta del compagno che riduce gli accoppiamenti ibridi (Haavie *et al*. 2004). Questo risultato è coerente con la teoria del rinforzo, secondo cui le associazioni prodotte tra geni codificanti per caratteri coinvolti nella selezione sessuale e geni responsabili della ridotta fitness degli ibridi, avrebbero come conseguenza l'originarsi di un numero inferiore di individui ibridi non adatti (Butlin 1989).

Esistono altri esempi che sottolineano la selezione contro gli ibridi quale forza speciativa. In esperimenti di laboratorio condotti su allevamenti misti di *Drosophila pseudoscura* e *D. persimilis* (Koopman 1950), gli individui ibridi venivano rimossi ad ogni generazione simulando l'effetto della selezione; infatti si verificava una diminuzione della percentuale di ibridi dal 49% (prima generazione) al 5% (quinta generazione); ciò costituiva una prova che era avvenuta una rapida selezione dei meccanismi di riconoscimento sessuale atti a prevenire l'ibridazione.

In alcuni casi ben documentati sembra plausibile pensare all'evoluzione di meccanismi di isolamento pre-mating in seguito alla formazione di ibridi, fra razze cromosomiche, il cui successo riproduttivo sia altamente compromesso. E' il caso di due popolazioni di *Mus musculus domesticus* con diferenti cariotipi (originati da fusioni Robertsoniane) in Valtellina (Capanna *et al.* 1985a; Hauffe *et al*. 2002). Sulla base di analisi anche elettroforetiche, si è dimostrata l'assenza di ibridi in situazioni di diffusa simpatria e sintopia; questo potrebbe rappresentare una prova della rapida selezione di meccanismi di isolamento pre-mating basati sul riconoscimento sessuale (Capanna *et al.* 1985b). Deve essere considerata l'ipotesi alternativa che la divergenza del sistema di riconoscimento riproduttivo sia insorta come sottoprodotto casuale della divergenza genetica accumulatasi in un precedente isolamento delle popolazioni e non come conseguenza diretta della bassa fitness degli ibridi. Comunque il basso grado di differenziamento genetico stimato in base all'analisi di 26 loci enzimatici (D=0.024), darebbe ragione all'ipotesi del rinforzo (Capanna *et al.* 1985b).

Secondo altri autori (Barton & Hewitt 1981; Hewitt 1986) ci sono altri meccanismi evolutivi che potrebbero agire in una zona ibrida che non sia necessariamente il rinforzo come ipotizzato da Dobzhansky. Vi sarebbero, infatti, favoriti anche geni che determinino una minore capacità di dispersione o che riducano la selezione contro i genotipi ibridi; il risultato sarebbe una stabilizzazione della zona piuttosto che la formazione di due specie distinte. Un'altra direzione evolutiva sarebbe invece la comparsa di mutazioni casuali che determinino spostamento dei caratteri ecologici o riproduttivi con conseguente comportamento assortativo.

2.3 Modelli di zone di contatto e ibridazione

In una prospettiva di più ampio respiro, si possono considerare i vari modelli, compreso quello di Barton & Hewitt (1985) che fino ad oggi sono stati proposti per cercare di spiegare la dinamica delle zone ibride. In ognuno si considerano i contributi relativi di selezione e dispersione e le stime sulla fitness relativa degli ibridi nell'evoluzione delle zone ibride.

Esistono due orientamenti principali circa l'importanza relativa della selezione e della dispersione. Il più comune dà peso sia alla dispersione degli individui parentali all'interno della zona di contatto, che alla selezione contro gli ibridi, indipendentemente dall'ambiente (Darwin 1859; Dobzhansky 1937, 1940; Mayr 1942, 1963; Barton 1979). Secondo questa teoria la non vitalità degli ibridi e/o la loro sterilità dipende dalla rottura delle combinazioni geniche parentali (Barton & Hewitt 1985) oppure da differenze nel numero o nella struttura dei cromosomi rispetto ai taxa parentali (Grant 1963), e non da variazioni nel grado di adattamento all'ambiente. Mayr (1963) affermava: *"The majority of such hybrids are totally sterile…..even those hybrids that produce normal gametes in one or both sexes, are neverthless unsuccessfull in most cases and do not participate in reproduction. Finally, when they do backcross to the parental species, they normally produce genotypes of inferior viability that are eliminated by natural selection."*

L'altro orientamento considera fondamentali, per determinare la struttura genetica delle popolazioni ibride, le interazioni tra l'ambiente e i genotipi (Endler 1977; Slatkin 1973; May *et al*. 1975; Moore 1977; Harrison 1986). Questi modelli sono quindi "environmental-dependent" e considerano l'effetto dei gradienti della selezione correlati all'eterogeneità ambientale. Per alcuni autori la dispersione è meno importante (Endler 1973; Moore 1977) nella strutturazione della zona ibrida e gli ibridi presentano fitness maggiore in alcuni ambienti (ad es. habitat ecotonali) rispetto agli individui parentali o in particolari condizioni di stress, ad esempio i fringuelli ibridi delle isole Galapagos (Grant & Grant 1996).

Altri autori (Howard 1982, 1986; Harrison 1986) considerano invece entrambe le forze, dispersione e selezione, fondamentali ma la fitness degli ibridi, nello stesso habitat degli individui parentali, è considerata comunque inferiore. Quindi se da un lato tutti gli autori considerano le forze selettive importanti per determinare la struttura

genetice delle zone ibride, il ruolo della fitness degli ibridi viene valutato diffrentemente nell'ambito dei vari modelli proposti.

Vantaggio dell'ibrido in aree di transizione e/o ecotonali

Secondo il modello proposto da Moore (1977), gli individui ibridi hanno fitness maggiore in alcuni ambienti, in genere aree ecotonali o habitat di transizione in cui i genotipi parentali sono sicuramente meno adattati di alcuni genotipi ibridi. Questo è evidentemente un modello "environmental-dependent" in quanto sono i fattori ecologici che determinano la fitness degli ibridi (Endler 1973; Moore 1977). Questo modello comprende anche i clini ambientali, il cui andamento è correlato ad una transizione ecotonale in cui l'ibrido ha una fitness maggiore grazie ad una minore competizione con le forme parentali che perdono abilità competitiva man mano che cambiano le condizioni ambientali cui sono naturalmente adattate. A questo proposito Moore evidenzia l'incidenza di alcune zone ibride in aree ecotonali: ad esempio il caso della zona di contatto tra *Bufo fowleri* e *B. woodhousei* nella regione di transizione tra le foreste di pini e noci e le foreste di querce e noci.
Parallelamente molti autori (Moore 1977; Anderson 1949) sono convinti che gli ibridi godano di minor fitness negli habitat tipici degli individui parentali. Anderson (1948) sostiene che quando un habitat viene modificato dall'uomo o da cause naturali, si rendono disponibili nuove nicchie per gli ibridi; se l'habitat ritorna allo stato precedente al disturbo, gli ibridi possono essere nuovamente rimpiazzati dalle specie parentali.

Zone di Tensione

Il modello delle zone di tensione è stato senza dubbio in grado di spiegare un elevato numero di casi di zone di contatto riscontrati in natura. Il nome zone di tensione, coniato da Key (1968), si riferisce alla stabilità che gli autori (Barton 1979; Barton & Hewitt 1985) ritengono sia caratteristica delle zone di contatto e ibridazione. Tali zone sarebbero mantenute in un equilibrio dinamicamente stabile grazie al bilanciamento tra forze di dispersione dei genotipi parentali e opposte forze di selezione contro i genotipi ibridi. Questi genotipi eterozigoti e/o ricombinanti sarebbero inferiori in vitalità, fertilità o successo riproduttivo, rispetto ai genotipi parentali maggiormente coadattati. L'estensione di una zona di tensione è per definizione ristretta: quando gli individui con genotipo parentale puro tenteranno di attraversarla, spingendosi in un'area dove la loro frequenza è bassa, produrranno progenie ibrida ad un tasso tanto maggiore quanto più sono lontani dal loro territorio. Tale progenie verrà rimossa per controselezione ma si riformerà continuamente per l'arrivo di nuovi individui parentali nella zona di tensione.

La maggior parte delle zone di tensione sono il risultato di un contatto secondario tra genomi parentali differenti e coadattati, il cui incontro può comportare un fenomeno di coalescenza delle differenze accumulate; in genere tali differenze si estendono a più di una categoria dei caratteri considerati nello studio di una zona ibrida (morfologici, comportamentali, molecolari, cromosomici); pertanto la zona di tensione sarà caratterizzata da clini di variazione per più caratteri, paralleli e coincidenti, come ad esempio nei Discoglossidi del genere *Bombina* (Szymura & Barton 1986; Szymura *et al*. 2000) e nelle cavallette del genere *Corthippus* (Hewitt 1993) e del genere *Caledia* (Shaw *et al.* 1986). Un altro carattere di tali clini coincidenti è il gradiente molto ripido. Le zone di tensione presentano di solito significativi linkage disequilibria, perché la selezione endogena contro la rottura dei genomi parentali coadattati porta all'instaurarsi di associazioni tra geni provenienti da un solo tipo parentale (Alexandrino *et al*. 2005).

I dati raccolti dimostrano che le zone di tensione possono spostarsi nel tempo e che una varietà di forze può influenzare il loro spostamento (Barton & Hewitt 1985; Hewitt 1986):

- Differenze in fitness individuale: popolazioni locali possono essere sottoposte a differenti pressioni selettive che agiranno in maniera differenziale su alcuni alleli

favorendo gli omozigoti per l'allele positivamente selezionato. Quindi nella popolazione che possiede tale allele sopravviverà una quantità maggiore di progenie spostando così il centro della zona di contatto.

- Spostamenti casuali della zona dovuti a variazioni nella struttura delle popolazioni da un anno all'altro, che comprendono sia dispersione anisotropa sia variazioni di densità delle popolazioni. La prima si verifica quando esiste una direzione preferenziale di dispersione dovuta alla presenza o assenza di barriere estrinseche; il flusso genico conseguente sarà orientato geograficamente e sospingerà la zona in una data direzione. La seconda si verifica spesso in natura poiché la struttura e la distribuzione delle popolazioni è altamente eterogenea. Differenze significative di densità determineranno un flusso netto di individui parentali secondo il gradiente di densità stesso, determinando uno spostamento della zona (Bazykin 1969; Key 1974). Qualora vi siano barriere locali, agenti da "trappole", il movimento della zona si arresta. E' il caso di zone di contatto che restano confinate localmente in regioni a bassa dispersione o densità che spesso si trovano associate a grandi barriere ecologiche e fisiche (per es. montagne) (Hewitt 1995). Un esempio è la zona ibrida tra razze cromosomiche della cavalletta *Podisma pedestris* nelle Alpi Marittime che è coincidente con la localizzazione di pendii inospitali (Barton & Hewitt 1981).

La relativa stabilità e antichità di molte delle zone studiate, ad esempio quelle formatesi dopo l'ultima era glaciale (Hewitt 1995, 2004), dimostrano che diverse forze selettive agiscono sulla zona di tensione impedendo il flusso di geni oltre la zona d'ibridazione. Tali forze comprendono: la perdita dell'epistasi favorevole in seguito ad ibridazione tra genotipi fortemente coadattati (Mayr 1963), la diminuita fitness dell'ibrido, la capacità di dispersione che può essere ridotta da fattori fisici ed ambientali.

Nelle zone di tensione quindi questi fattori possono agire simultaneamente creando barriere al flusso genico e giustificando così la scarsa estensione della zona stessa. Esempio emblematico di questo modello è la zona di tensione studiata da Szymura & Barton (1991) e Szymura *et al*. (2000) su *Bombina* i quali affermavano: "*The set of sharp clines, flancked by shallow tails, reflects the barrier to the flow of genes between the two taxa, which is caused by selection on sets of linked loci".*

Zone ibride a mosaico

Il modello "environmental-dependent" detto "a mosaico" (Howard 1982, 1986; Harrison 1986, 1990) parte dalla constatazione che, in contrasto con l'usuale descrizione delle zone ibride quali aree di transizione armonica tra forme alternative, risultante da un gradiente omogeneo di coefficienti selettivi (per es. Endler 1977), c'è l'osservazione che in molti casi le transizioni da un ambiente ad un altro non siano graduali ma distribuite in modo frammentato. I taxa interagenti sono strettamente correlati ma sono ecologicamente distinti, per esempio nella scelta dell'habitat o nell'utilizzo di risorse limitanti, e/o comportamentalmente differenti, come avviene nel caso della zona ibrida tra *Triturus vulgaris* e *T. montandoni* nei Carpazi, in cui l'accoppiamento assortativo è uno dei fattori più importanti nel determinare la struttura genetica a mosaico della zona ibrida (Babik. *et al*. 2003).

Come conseguenza le caratteristiche della zona di contatto, e quindi le frequenze genotipiche, rifletteranno il mosaico ambientale in cui habitat e risorse si trovano distribuiti in modo frammentato ("patchily"). Per stabilire se una zona ibrida è descritta in modo più appropriato dal modello a gradiente (Endler 1977) o dal modello a mosaico (Harrison & Rand 1989), bisogna considerare la capacità di dispersione degli individui relativamente alla scala spaziale dei "patches" (tessere) ambientali. Qualora le distanze siano inferiori alla grandezza media dei patches, la zona di contatto rifletterà l'eterogeneità ambientale assumendo una struttura a mosaico; qualora invece le distanze di dispersione siano maggiori rispetto ad un ambiente finemente frammentato, il modello a gradiente descriverà meglio i pattern di distribuzione della zona. Inoltre se la frammentazione ambientale è presente su larga scala, cioè i "patches" sono di grandi dimensioni, si possono individuare zone di tensione ai margini di tali tessere (Butlin 1989).

Caso emblematico del modello a mosaico è quello del genere *Gryllus* americano studiato da Harrison & Arnold (1982). La zona di contatto tra *G. pennsylvanicus* e *G. firmus* si è formata in seguito all'ultima glaciazione (il contatto secondario è rivelato concordemente da markers allozimici, morfologici e mtDNA) e presenta una distribuzione a mosaico che rispecchia i diversi adattamenti delle due specie a differenti habitat; è stata infatti trovata una correlazione significativa tra il tipo di suolo e i genotipi parentali ("genotype-environmental association"). Gli individui ibridi, considerati a minor fitness degli individui parentali, occupano le ristrette aree di

transizione tra i due tipi di suolo fra una tessera e l'altra. Recentemente ulteriori studi su scala più fine hanno evidenziato che a livello dei confini tra le tessere ambientali i clini di variazione dei parametri morfologici e molecolari sono estremamente ripidi e concordi, rivelando che la zona ibrida viene mantenuta dalla selezione esogena. Non è ancora chiaro quale sia il ruolo giocato dalla selezione endogena cioè contro gli ibridi (Ross & Harrison 2002).

"Evolutionary Novelty" Model

Il modello è stato proposto (Arnold 1997) in quanto i precedenti modelli non davano spiegazione a tutti i patterns riscontrati in natura.

Tutti i modelli prevedevano una fitness minore per gli ibridi almeno negli habitat parentali (maggiore in habitat ecotonali, vedi Moore 1977), mentre Arnold & Hodges (1995) scoprono che gli ibridi non sono uniformemente meno adatti dei genotipi parentali, ma possono avere più bassa, uguale o maggior fitness anche negli habitat parentali.

Arnold ha constatato che sebbene il modello delle zone di tensione spiegasse parecchi casi, non si adattava completamente nemmmeno ad alcuni esempi considerati emblematici (*Chorthippus, Bombina*, etc.). E' possibile che, date alcune assunzioni del modello di Barton (cioè che ci siano clini coincidenti e paralleli e significativi linkage disequilibria) vi sia selezione esogena operante nella zona (genotype-environmental association). Per poter stimare l'effetto di una selezione esogena sull'evoluzione di una zona ibrida sono necessari studi ecologici accanto a studi genetici (e.g. *Bombina*).

Possono essere segnale di selezione esogena i seguenti risultati:

- una struttura genetica e spaziale frammentata anche se ci possono essere "micro-variazioni" clinali di markers genetici e morfologici al confine fra le varie tessere ambientali.
- la concordanza dei clini non costante nel raffronto di markers o transetti diversi collocati dentro diverse regioni della zona;
- gli ibridi non mostrano bassi livelli di fitness.

Un nuovo modello si rende quindi necessario per poter conciliare, nell'ambito della stessa zona, osservazioni che supportano modelli environmental-dependent con

altre maggiormente coerenti con modelli non dipendenti dall'ambiente. In altre parole, l'accumularsi di osservazioni sperimentali indica che alcune zone ibride sono meglio spiegabili ricorrendo a modelli sia dipendenti dall'ambiente che no, in particolare per gli aspetti che riguardano la fitness degli ibridi.

Partendo dalla constatazione che le zone di contatto si instaurano di preferenza in habitat disturbati o ecotonali (e.g. Moore 1977), Arnold ipotizza che gli ibridi di prima generazione si formino con difficoltà in natura e che quindi le zone ibride inizino a formarsi dove gli individui parentali abbiano maggior probabilità di incontrarsi. Ciò accade tipicamente dove c'è la massima possibilità di simpatria, quindi di incrocio (ad esempio in habitat ecotonali), tra taxa differentemente adattati. Esperimenti di incrocio per capire quali fossero le barriere alla formazione di ibridi F_1, hanno visto accoppiamenti condotti con individui conspecifici ed eterospecifici di grilli del genere *Allonemobius* (Howard & Gregory 1993; Gregory & Howard 1994). Affiancando i risultati ad osservazioni su popolazioni ibride naturali si è concluso che gli ibridi F_1 si formano con difficoltà ma che, una volta formati, tali ibridi risultano stabili negli habitat ecotonali per azione della selezione esogena, proprio come proposto da Moore (1977) e Anderson (1948).

Inoltre il tasso di formazione di reincroci e ricombinanti è molto più alto: in poche generazioni ci saranno pochi F1 e molti F2, B1, B2 (Arnold *et al.* 1993). Arnold ha dimostrato che è possibile che esista una selezione contro alcuni tipi di ibridi, per infertilità o non vitalità, che determina quali genotipi sono prodotti e sopravvivono nelle zone ibride (Cruzan & Arnold 1994). La selezione endogena, indipendente dall'ambiente, contrariamente al modello delle zone di tensione, non agisce indiscriminatamente contro tutti gli ibridi ma solo su alcuni. Un esempio chiaro è *Chorthippus*: gli ibridi in natura non soffrivano della disfunzione vista in esperimenti in laboratorio (Virdee & Hewitt 1994).

Sugli ibridi agisce anche la selezione esogena, positivamente o negativamente a seconda della disponibilità di ambienti appropriati a diversi genotipi ibridi, quindi il risultato sarà un adattamento differenziale al complesso insieme di habitat riscontrabile in popolazioni naturali per cui gli ibridi possono risultare con fitness maggiore anche nell'habitat parentale, un caso non previsto da nessun altro modello.

Il concorso di selezione esogena ed endogena porterà gli ibridi positivamente selezionati ad invadere nuovi habitat oppure a rimpiazzare, in virtù della maggiore

fitness, i genotipi parentali nel loro habitat. Questo modello predice lo stabilizzarsi di discendenze geologicamente “long-lived”.

In seguito al dibattito circa l’importanza relativa di selezione esogena ed endogena nel mantenere stabili le zone ibride, è stato formulato un modello analitico per poter valutare clini multi-locus originatesi per selezione esogena (differenti adattamenti ad ambienti diversi) e paragonarli con quelli generati da selezione endogena (svantaggio dell’eterozigote). In entrambi i casi la forma assunta dal cline è la stessa a prescindere dal tipo di regime selettivo agente sulla zona ibrida. Ciò significa che non c’è una intrinseca differenza nella struttura genetica di popolazione dei due scenari e che si possono stimare flusso genico e pressioni selettive nello stesso modo per entrambi (Kruuk *et al*. 1999).

CAP. 3 MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Sono stati analizzati circa 300 individui appartenenti a 38 popolazioni (tab.1 e fig. 2). Le popolazioni campionate fanno parte dell'areale di *S. a. ambrosii*, *S a. bianchii*, *S. italicus*, pure e introgresse (vedi tab.1). E' stato condotto inoltre un campionamento lungo un transetto più fine che corrisponde alla zona di contatto e ibridazione, dove cioè è collocabile il centro e il fronte di contatto tra *S a. bianchii* e *S. italicus* (vedi tab.1 e fig.2).
L'elettroforesi dei sistemi gene enzima è stata effettuata in uno studio precedente per valutare i genotipi di ciascun esemplare campionato di *S. italicus* e introgresso, *S. a. bianchii* e introgresso, *S. ambrosii ambrosii* (Cimmaruta 1993, dati non pubblicati).

3.2 Metodi

Estrazione del DNA e amplificazione mediante PCR

E' stato estratto il DNA genomico totale da circa 300 campioni di tessuto e conservato ad una temperatura di –80°C. L'estrazione è stata eseguita seguendo il protocollo CTAB/phenol-chlorophorm. Circa 200 mg di tessuto per ogni campione è stato omogeinizzato in 500 μl di soluzione CTAB di estrazione (Tris HCl 0,1 M, pH 8; NaCl 1,4 M; EDTA 0,02 M; CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 2%; 2-mercaptoethanol 0,1%); sono stati aggiunti 5 μl di proteinasi K (20 mg/μl) in una eppendorf da 1,5 ml e quindi incubati a 45°C per 12 ore. Questa soluzione è stata purificata due volte con fenolo: cloroformio: alcohol isoamilico (25: 24:1) e una volta con cloroformio.
L'ammontare del DNA gnomico totale è stato precipitato in 1000 μl di etanolo a –20°C dopo aver aggiunto 20μl di NaCl (7mM). Il DNA totale è stato lavato in un ultimo passaggio in etanolo al 70%. Il pellet così ottenuto contenente il DNA totale, è stato disciolto in 100 μl di buffer TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8).

POPOLAZIONE	Sigla	*Taxon*	S	R	A	X	Y
Capo d'Acqua (AQ)	IAQ	*S.italicus*	3	3	4	2427354	4679493
Gole del torrente Salinello (TE)	ISA	*S.italicus*	3	3	5	2407366	4734304
Pieve Torina e Ussita (MC)	ITO	*S.italicus*	2	3	4	_	_
Grotta Magnetica (PG)	IGM	*S.italicus*	4	4	-	2323733	4803328
Gola di Frasassi (AN)	IFR	*S.italicus*	-	2	4	2353025	4807265
San Marino (Rocca di S.Marino)	IMR	*S.italicus*	6	6	10	2317656	4867339
S.Maria Maddalena In Vallestra, loc. Carpiteti (RE)	IMV	*S.italicus*	2	3	4	1625228	4923892
Sestola (MO); Pratignano e Tana del Romitorio (BO)	ITR	*S.italicus* (introgressa)	5	6	10	1654853	4888502
Firenze (FI)	IFI	*S.italicus* (introgressa)	2	2	19	1682389	4870427
Calvana (Grotta del Castagno) (FI)	ICA	*S.italicus* (introgressa)	1	1	15	1673787	4866929
Piteccio (PT)	IPT	*S.italicus* (introgressa)	4	12	15	1651463	4873450
Buca Tana di Maggiano (LU)	IMA	*S.italicus* (introgressa)	1	1	8	1612726	4857215
San Martino in Freddana (LU)	ISM	*S.italicus* (introgressa)	-	-	8	1615155	4862626
Borgo a Mozzano (LU)	IBM	*S.italicus* (introgressa)	2	9	29	1615073	4872897
Cardoso Stazzemese (LU)	ICS	*S.italicus* (introgressa)	4	6	8	1604413	4872829
Focchia, Pescaglia (LU)	IFO	*S.italicus* (introgressa)	3	3	7	1602443	4870904
Vagli di Sotto (LU)	IVA	*S.italicus* (introgressa)	1	3	9	1603813	4885569
Magnano (Tana del Pollone) (LU)	IMN	*S.italicus* (introgressa)	1	1	4	1610970	4892522
Buca di Tamignana, loc. Sillano(LU)	ISI	*S.italicus* (introgressa)	1	3	5	1607172	4897953
Galleria del Cipollato (LU)	ICI	*S.italicus* (introgressa transetto)	15	42	91	1601174	4877927
Isolasanta, loc. Campaccio	IIS	*S.italicus* (introgressa transetto)	7	24	23	1603723	4879519
Case Henraux (LU)	ACH	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	3	4	7	1601772	4879100
Campagrina (LU)	ACM	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	9	16	38	1600794	4879252
Mulattiera da Arni (LU)	AMU	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	1	1	23	1601155	4878842
Galleria del Monte Pelato (LU)	AMP	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	4	14	8	1598735	4880005
Galleria Val di Sora (LU)	AVS	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	5	12	14	1597342	4879105
Galleria di Tecchia (Massa)	ATE	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	5	9	13	1596976	4878936
Pian della Fioba (Massa)	APF	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	4	6	26	1596682	4879008
Rifugio Città di Massa (Massa)	APO	*S.a.bianchii (* introgressa transetto)	8	23	47	1595974	4878832
Forno (Massa)	AFO	*S.a.bianchii* (introgressa)	9	11	22	1594472	4882914
Bedizzano (Massa)	ABE	*S.a.bianchii* (introgressa)	5	10	22	1589820	4881522
Pulica (Massa)	APU	*S. a. bianchii*	17	31	19	1583984	4887370
Grotta di Taggia (La Spezia)	ASP	*S. a. ambrosii*	-	-	10	1563175	4883465
Riccò del Golfo (La Spezia)	ARG	*S. a. ambrosii*	9	9	15	1560953	4885727
Pignone (La Spezia)	API	*S. a. ambrosii*	4	4	22	1557656	4891653
Ginepro (La Spezia)	AGI	*S. a. ambrosii*	2	2	12	1556029	4894910
Cassana (La Spezia)	ACA	*S. a. ambrosii*	-	-	25	1555313	4895551
Passo del Bracco (La Spezia)	ABR	*S. a. ambrosii*	6	6	16	_	_
Monte S. Nicolao (La Spezia)	ASN	*S. a. ambrosii*	4	5	25	_	_

Tab. 1 lista delle popolazioni studiate con relativa sigla; taxon di appartenenza; S:individui sequenziati. R: individui analizzati con RFLP; A: individui analizzati con allozimi; collocazione geografica in coordinate Gauss-Boaga.

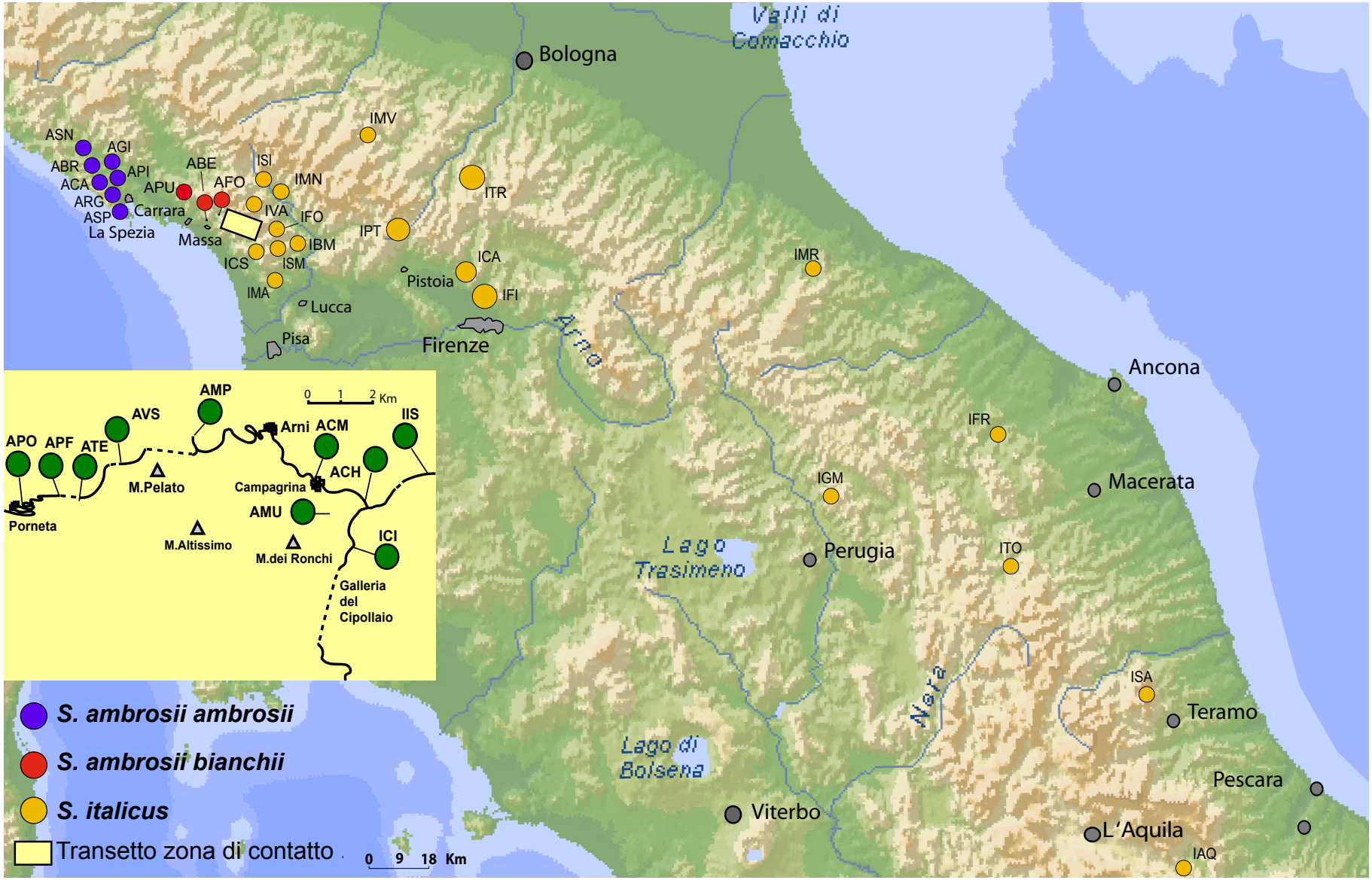


fig. 2 collocazione geografica delle popolazioni totali studiate

E' stata condotta una reazione a catena della polimerasi (PCR) (Saiki *et al*., 1988) in un volume finale di 50 μl contenente: 5-20 ng di DNA genomico totale purificato; 2,5u di Taq DNA polimerasi, i primers (0,2 μM), $MgCl_2$ (2,5 mM), 1 μl dNTP (0,2 mM). La reazione di amplificazione è stata condotta usando GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), con una denaturazione del DNA iniziale a 94°C per 5 minuti e successivamente una ripetizione per 35 volte del seguente ciclo: denaturazione a 94°C per l'appaiamento dei primers per 30'', estensione dei filamenti a 72°C per 1'. L'ultimo step è stato condotto a 72°C per 10'.

E' stato ottenuto un frammento di 501 bp parte del Citocromo b corrispondente alla posizione 16,580 (5'end) e 17,078 (3'end) di *Xenopus laevis* (Roe *et al*. 1985) per 270 dei 300 campioni di cui è stato estratto il DNA, probabilmente a causa delle scarse condizioni di qualità di quest'ultimo. Sono stati usati i seguenti primers per la PCR:

MVZ25-L (Moritz *et al*. 1992) modificato in:

HY01 (5'–AAAGAAACTTGAAATATTGGAGT-3')

e

MVZ16 (5'–AAATAGGAAWTATCAYTCTGGTTTWAT- 3'),

disegnato per salamandre (Moritz *et al*. 1992).

Sequenziamento e analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione

Un ammontare di 5μl di prodotto di PCR è stato fatto correre in un gel di agarosio al 2% (0,5 X TBE: 0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA, pH 8). I prodotti di PCR sono stati purificati con QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). La sequenza dei corrispondenti frammenti è stata condotta con A.B.I. Prisma 310 sequencer (Perkin Elmer), in un volume totale di 10 μl contenente 2 μl di ABI-mix (Perkin Elmer), 1 μl di primer (3,2 pmol) e circa 50 ng di prodotto di PCR. I primers usati per il sequenziamento sono gli stessi utilizzati per l'amplificazione mediante PCR.

Le sequenze dei frammenti di 501 bp sono state allineate e controllate usando il programma Clustal X (Thompson *et al.* 1997). In particolare il frammento di 501bp corrisponde alla posizione 16,267 (5'end) e alla posizione 17,051 (3'end) di *Xenopus laevis* (Roe *et al*. 1985). E' stato definito un set di enzimi di restrizione che permettesse di distinguere aplotipi specifici, utilizzando il programma "DNA" for

Windows (Dixon 1997). Il set prescelto è il seguente: HaeIII, SspI, RsaI, MboI (tab.2). La reazione di digestione enzimatica è stata condotta in un volume totale di 10μl contenente 7,5 μl di prodotto di PCR; 1 μg di BSA e 5u di endonucleasi. I frammenti digeriti di DNA sono stati fatti correre in un gel di agarosio al 3%. I pattern di digestione sono stati identificati comparandoli ad un idoneo DNA step ladder marker.

tab. 2

Enzimi di restrizine	**Sequenza del sito di restrizione**
HaeIII	GG/CC
MboI	/GA TC
RsaI	GT/AC
SspI	AAT/ATT

In un secondo momento sono state ottenute con le stesse metodologie sopra esposte, 162 sequenze di DNA mitocondriale corrispondenti ad una porzione più lunga di citocromo b (mtDNA) comprendente il precedente frammento di 501bp e in particolare dalla posizione 16,267 (5'end) alla posizione 17,051 (3'end) di *Xenopus laevis* (Roe *et al*. 1985). Le sequenze così ottenute sono lunghe 838bp si riferiscono ad individui appartenenti a popolazioni di *S. italicus* puro e introgresso*, S. a. bianchii* puro e introgresso*, S a. ambrosii*. I primers utilizzati sia per la PCR che per il sequenziamento sono i seguenti:

MVZ15 (Moritz *et al*. 1992) (5' – GAA CTA ATG GCC CAC ACW WTA CGN AA - 3')

e

MVZ16 (Moritz *et al.* 1992) modificato in:

MVZ16mod1 (5' – GC AAA TAG GAA ATA TCA TTC TGG - 3')

Le 162 sequenze ottenute di 838 bp sono state allineate e controllate usando il programma Clustal X (Thompson *et al.* 1997). La sequenza utilizzata come outgroup nelle elaborazioni statistiche è *Eurycea bislineata* (Mueller *et al*. 2004), in particolare

il frammentodi 784bp, esclusi i primers, che corrisponde alla posizione 14,080 (5') e 14,863 (3') della sequenza completa del DNA mitocondriale di *Eurycea bislineata* (Mueller *et al*. 2004).

3.2.1 Elaborazioni statistiche sui dati allozimici

Variabilità genetica

Sono stati utilizzati i seguenti parametri di variabilità genetica: numero medio di alleli per locus (A), percentuale di loci polimorfici con il criterio del 99% (P99) e del 95% (P95), eterozigosi media attesa per locus (H_e). mediante il software BIOSYS-1 (Swofford *et al*.1981).

Verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, Linkage disequilibrium e F_{is}

E' stata verificata, per ogni locus, la condizione di equilibrio di Hardy-Weimberg, mediante il Test del X^2. E' stato applicato il test della probabilità esatta per campioni di dimensioni ridotte e con il "pooling" degli alleli rari con il software BIOSYS-1 (Swofford *et al*. 1981).

E' stato condotto l' "Exact test" per verificare l'eccesso o il deficit di eterozigoti per ogni locus in ogni popolazione, e per lo stesso motivo è stato anche condotto il "Global test" su tutti i loci e su tutte le popolazioni secondo il metodo di Fisher. E' stato calcolato il coefficiente di inbreeding, F_{is}, per ogni locus su tutte le popolazioni, e per ogni popolazione su tutti i loci.

$F_{is}= 1- (P_{Aa} / 2\ p_A\ p_a)$

dove P_{Aa} è la frequenza osservata e $2\ p_A\ p_a$ è la frequenza attesa degli eterozigoti. F_{is} varia da -1 a +1. Valori positivi indicano che c'è un deficit di eterozigoti, mentre valori negativi indicano un eccesso, e zero indica la proporzione attesa secondo la combinazione casuale dei gameti. Queste elaborazioni statistiche sono state ottenute con il software Genepop vs 1.2 (Raymond & Rousset 1995).

E' stato verificata la presenza di Linkage Disequilibria tra loci mediante il software Genetix vs 4.02 (Belkhir *et al.* 2001). Si calcola R_{ij} che è il coefficiente di correlazione del linkage disequilibrium tra coppie di loci (Cockerham & Weir 1977) dove i è l'allele i-esimo al locus 1 e j è l'allele j-esimo al locus 2. R_{ij} è testato con il test del X^2 secondo Weir (1979), con una soglia di significatività del 5%. Mediante il software Genepop vs 1.2 (Raymond & Rousset 1995), è stato calcolato il P-value secondo il test di Fisher, per ogni coppia di loci su tutte e popolazioni.

Differenziamento genetico tra popolazioni

Per valutare la divergenza genetica tra popolazioni e taxa é stata stimata la distanza genetica mediante gli indici di Nei (1972) e Rogers (1972).

Per valori relativamente bassi di distanza genetica ($D < 1$), ed assumendo un tasso costante di sostituzioni aminoacidiche per le varie proteine, la distanza genetica secondo Nei (1972) risulta correlabile al tempo di divergenza (t) tramite una relazione lineare. Nei (1975), ha proposto la seguente formula:

$$t = \frac{D}{2\,c\,n\,\lambda},$$

dove t rappresenta il tempo relativo all'inizio dell'isolamento fra le due popolazioni ancestrali, in seguito al quale si sarebbe verificata la loro evoluzione indipendente; c è la proporzione di sostituzioni aminoacidiche riconoscibili elettroforeticamente; n è il numero medio di aminoacidi per proteina; λ corrisponde al tasso di sostituzione aminoacidica per sito per anno. Una stima approssimativa di tali parametri porta alla formula

$t = 5 \cdot 10^{6} D$ (Nei 1975).

Sulla base della distanza genetica di Rogers (1972) sopra citata è stato ottenuto un dendrogramma UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Analysis; Soakal & Sneath 1963). L'UPGMA è stato anche costruito sulla stessa distanza con il metodo di Wagner. Il grafico prodotto (fenogramma) descrive le somiglianze fra i taxa prescindendo dalla loro storia evolutiva e non costituisce necessariamente un albero filogenetico.

Per valutare il differenziamento genico e genotipico tra popolazioni è stato effettuato il test "population differentiation" per ogni locus in tutte le popolazioni e per coppie di popolazioni mediante il software GENEPOP (Raymond & Rousset 1995). Il test si basa sul exact test di Fisher che permette di calcolare la probabilità (P-value), su una serie di tabelle di contingenza, che l'ipotesi nulla sia vera e cioè che la distribuzione allelica e genotipica sia identica tra le popolazioni.

Indice di ibridazione e analisi delle classi genotipiche

Per quantificare l'introgressione è stato calcolato per ogni individuo un indice di ibridazione (*HI*) (Sage & Selander 1979; Sage *et al.* 1986).
Utilizzando il genotipo di ogni individuo saggiato, per i loci fissati per alleli alternativi nelle due entità in contatto, è stato assegnato un valore arbitrario di -1 ad ogni allele caratteristico di una delle due forme differenziate, ed un valore +1 ad ogni allele tipico dell'altra forma. Inoltre, per ogni popolazione, é stato calcolato un valore medio dell'indice di ibridazione (HI), in base ai valori osservati nei singoli individui e alla dimensione della popolazione.
Per valutare in maniera più approfondita la struttura delle singole popolazioni ibride e non in riferimento alla loro distribuzione in classi genotipiche (individui puri; ibridi di prima o successiva generazione) è stato utilizzato il software New Hybrid (Anderson & Thompson 2003). Questo programma utilizza il sistema di clustering di Anderson & Thompson (2002) implementato appunto nel software New Hybrid. Questo modello si basa sulla statistica bayesiana per identificare gli individui in una popolazione. Piuttosto che assegnare un individuo ad una singola categoria ibrida, come invece accade per il calcolo dell'indice di ibridazione precedentemente descritto, questo metodo calcola, utilizzando la Markov Chain Monte Carlo algoritmo, la probabilità a posteriori che un individuo appartenga ad una determinata classe genotipica: specie pura, individui di F1, F2 o backcrosses. L'efficacia del modello è tanto maggiore quanto più sono differenziate geneticamente le specie che hanno ibridato, quindi tanto maggiore è il numero di loci discriminanti tra i taxa ibridanti, tanto più sarà agevole distinguere la classe genotipico-specifica, F2 verso i backcrosses per esempio. Importante assunto del modello è che i loci siano non linked.
Poiché il "mixing" non è solo determinato dalle frequenze genotipiche, i dati possono essere utilizzati per determinare la probabilità a posteriori della proporzione di mixing ovvero dell'introgressione. E' stato infatti calcolato un indice di introgressione (I) (Streiff *et al.* 2005) che indica la probabilità a posteriori della percentuale di mixing per ogni popolazione. (I) è il valore medio di (M) per ogni popolazione dove
M= (1-p)
e p è la probabilità a posteriori di appartenere alla specie 1, e si ottiene direttamente dai calcoli del programma.

3.2.2 Elaborazioni statistiche sui dati molecolari

Diversità genetica e Neighbour joining (NJ)

La percentuale di siti polimorfici, variabili e informativi è stata calcolata usando il programma DNASP (Rozas *et al.* 2003). Le frequenze nucleotidiche medie e le distanze genetiche tra gruppi di aplotipi sono state calcolate utilizzando il programma MEGA (Kumar *et al*. 2001); la distanza genetica che è stata calcolata è Kimura-2 parametri.

La diversità aplotipica, nucleotidica sono state calcolate utilizzando gli algoritmi implementati in DNASP basati sulle equazioni di Nei (1987).

Il Neighbor joining con la distanza genetica di Kimura 2-parametri, è stato ottenuto con il programma Phylip vs. 3.65 (Felsenstein 2005).

Network di parsimonia (TCS)

L'associazione non casuale di aplotipi geografici può dipendere sia da flusso genico ristretto che da eventi storici (frammentazione, espansione, colonizzazione), o da un insieme di entrambi i fattori.

Per stimare il network degli aplotipi si applica l'algoritmo sviluppato da Templeton *et al*. (1992) utilizzando il programma TCS (Clement *et al*. 2000) che stima il massimo numero di differenze tra gli aplotipi in termini di singole sostituzioni con un limite di confidenza del 95%; cioè viene calcolato il network solamente quando esiste il 95% di probabilità che l'albero unrooted tra gli aplotipi trovati (minimum spanning tree) sia corretto. Vengono cioè raggruppati gli aplotipi che differiscono per una mutazione, come quelli che differiscono per due, tre o più mutazioni fino ad undici, limite massimo di connessioni che rispettano il limite di parsimonia. Questo metodo enfatizza quello che gli aplotipi, che differiscono in misura minima, condividono piuttosto che le differenze fra gli stessi, fornendo una stima sperimentale delle deviazioni dalla parsimonia.

CAP. 4 RISULTATI

4.1 Allozimi

4.1.1 Struttura e variabilità genetica delle popolazioni studiate

Sono state analizzate 38 popolazioni appartenenti alle specie *S. ambrosii ambrosii, S. ambrosii bianchii*, *S. italicus* e alla zona di contatto e ibridazione tra queste due ultime entità (vedi tab.1).
Sono stati analizzati 24 loci, di cui 4 sono risultati monomorfi per lo stesso allele in tutte le popolazioni, cioè *Pgm-1, Mdh-1, Me-1, Hbdh*. I 20 loci rimanenti sono risultati polimorfici in misura variabile, con valori bassi di polimorfismo (*Mdh-2,Idh-1, Got-1,CK,Ldh-2,Adk,AP*) fino a valori più alti (*α-Gpdh, Ldh-1, Me-2, Pgm-2, Nadh, Sod, 6-Pgdh, Got-2, Est-4, Ada-1,Ada-2,Mpi,Pgi*) (App. 1).
Di questi venti, sette loci (*α-Gpdh, Ldh-1, Ldh-2, Me-2, Pgm-2, Nadh, Ck*) sono discriminanti tra *S. ambrosii bianchii e S. italicus.* Sono fissati ciascuno per alleli alternativi nelle due specie e permettono quindi di distinguere le specie stesse sulla base dell'analisi elettroforetica dei genotipi.
Andiamo ad esaminare in dettaglio ogni locus polimorfico non discriminante tra le specie, descrivendo l'andamento delle varianti alleliche nelle popolazioni studiate.

Il locus *Mdh-2* presenta due varianti elettroforetiche *Mdh-2* ^{85,100} con l'allele *Mdh-2*^{100} sempre presente e fissato in omozigosi in 36 popolazioni su 38 totali di *S. a. ambrosii,S. a. bianchii* e *S. italicus*. L'allele *Mdh-2* ^{85} compare solo a frequenze basse in due popolazioni, 11% ad AVS e 16,7% ad AMP, collocate all'interno della zona di contatto (fig. 2).

Il locus *Idh-1* presenta un andamento simile al precedente con due varianti elettroforetiche *Idh-1* ^{94,100}. L'allele *Idh-1* ^{100} è sempre presente, fissato in omozigosi in 36 popolazioni su 38 totali. L'allele *Idh-1* ^{94} è presente solo in due popolazioni ICI al 1% e IFO al 7%, nella zona di contatto.

Il locus *Got-1* è poco variabile in quanto l'allele più comune è *Got-1* ^{100} che è fissato in omozigosi in 36 delle 38 popolazioni studiate e presenta la variante *Got-1* ^{110} solo

in due popolazioni di *S. a. ambrosii*, a Cassana (ACA) con il 2,3% e La Spezia (ASP) con il 7,1% .

Il locus *Adk* presenta la variante allelica *Adk* ^{100} fissata in omozigosi in 35 popolazioni su 38, mentre *Adk* ^{110} la troviamo solo in tre popolazioni del transetto in particolare a Porneta (APO) al 18,2%, a Pian della Fioba (APF) al 1,9%, e infine a Tecchia (ATE) al 3,8%.

Il locus *Sod* presenta tre alleli *Sod* ^{88,100,103}. In *S. a. ambrosii* è l'allele *Sod* ^{103} il più comune fissato in sei popolazioni su sette. Mentre l'allele *Sod* ^{88} lo ritroviamo ad una frequenza del 6,2% solo in una popolazione (ASN). Nelle restanti popolazioni è invece la variante allelica *Sod* ^{100} la più comune fissata in omozigosi in tutte le popolazioni di *S. a. bianchi* e *S. italicus* pure e della zona di contatto. Questo locus discrimina abbastanza bene *S. a. ambrosii* da *S. italicus* e *S. a. bianchii.*

Il locus *AP* presenta due alleli: *AP* ^{100} e *AP* ^{108} con un andamento meno regolare dei precedenti loci. La variante più comune è *AP* ^{108} che ritroviamo infatti fissata in omozigosi nelle sette popolazioni di *S. a. ambrosii* e a frequenza sempre molto elevata, dal 66,7% al 100%, in molte delle restanti popolazioni. Da notare la variante *AP* ^{100} che è presente ad una frequenza variabile da un minimo di 2,8% ad APO, con un range che va dal 14-17% (IFI, ICA) fino alla fissazione in alcune popolazioni di *S. italicus* (IMN, IMA, ITR), passando per valori del 25-30% (APU, ISI e IPT) e del 75% (ITO).

Il locus *6-Pgdh* risulta polimorfico per tre varianti alleliche *6-Pgdh* ^{100,103,110} . La variante più comune è quasi sempre *6-Pgdh* ^{100} con una frequenza minima sotto il 50% solo in ATE e ACM e risulta invece fissata in omozigosi in 13 popolazioni. La variante *6-Pgdh* ^{103} la ritroviamo in 11 popolazioni, escluse quelle di *S. a. ambrosii*, e soprattutto nel transetto e in qualche altra popolazione di *S. italicus* ad una frequenza bassa che va dal 2,8% al 16,7% con una punta del 41,3% a IBM. La variante *6-Pgdh*^{110} è presente al 2,3% solo in una popolazione di *S. a. ambrosii* (ACA); a frequenza variabile tra 0 –17% in altre 16 popolazioni (APU, IMN, IFO, ISI, IMA, ISM, ITR, ICA, IFI, IMR, ITO, ISA, IAQ, ACH, IBM, IFR), e tra il 20-60% nelle restanti 14

popolazioni (ABE, AFO, APO, APF, ATE, AVS, AMP, AMU, ACM, IIS, ICI, IVA, ICS, IMV).

Il locus *Got-2* presenta quattro varianti alleliche *Got-2* ^{90,100,105,110}. Le più comuni sono *Got-2* ^{90} e *Got-2* ^{100} a frequenza variabile. La seconda è fissata in omozigosi in tutte le popolazioni di *S. a. ambrosii* ed è sempre presente nelle rimanenti ad una frequenza che tocca valori minimi del 16,7% (AFO) e massimi del 100% in quasi tutte le popolazioni di *S. italicus* e introgresse. La variante *Got-2* ^{105} è presente ad una frequenza del 8,3% solo a IMR, mentre la variante *Got-2* ^{110} è presente a IMN ad una frequenza del 2,5%.

Il locus *Est-4* presenta tre alleli *Est-4* ^{98,100,105}. La variante più comune quasi del tutto fissata in *S. a. ambrosii* è *Est-4* ^{105}, mentre nelle restanti popolazioni la sua frequenza varia in misura variabile dal 4,5% al 83,3% fino a ridursi drasticamente a valori principalmente nulli o sotto l'8%, nelle popolazioni di *S. italicus* e introgresse.

Il locus *Ada-1* ha tre varianti *Ada-1* ^{100,105,107}. La variante *Ada-1* ^{107} è fissata in omozigosi nelle popolazioni di *S. a. ambrosii* mentre si assiste ad un brusco salto nelle frequenze alleliche in *S. a. bianchii* dove è invece fissata la variante allelica *Ada-1* ^{100} con l'eccezione di alcune popolazioni della zona di contatto (ICI, IVA, IBM) in cui è presente la variante *Ada-1* ^{105} ad una frequenza rispettivamente del 2%, 6,67% e 11,9%.

Il locus *Ada-2* presenta tre varianti alleliche *Ada-2* ^{93,100,107}. La più comune è senz'altro *Ada-2* ^{100} in quanto è fissata in omozigosi in quasi tutte le popolazioni tranne in quelle in cui compaiono anche le altre due varianti; cioè *Ada-2* ^{93} alla frequenza del 2,5% e 2,6% in rispettivamente ACA e IFI, e *Ada-2* ^{107} al 4,5% soltanto a Forno (AFO).

Il locus *Mpi* presenta tre varianti *Mpi* ^{90,95,100} con un andamento simile al precedente locus. La variante più comune è *Mpi* ^{100} fissata quasi in tutte le popolazioni in omozigosi o a frequenza più alta qualora compaiono le altre varianti. *Mpi* ^{90} è presente in una sola popolazione del transetto (AMU) ad una frequenza del 2,2%, mentre *Mpi* ^{95} è presente a frequenza che non supera il 37,5% (ICS) soprattutto

nelle popolazioni del transetto e di *S. italicus* introgresse (APO, APF, AVS, AMU, ACM, IIS, ICI, IMN, IVA, IFO, ISI, IMA, ISM) ad una frequenza che varia dal 6,5% al 25%. La popolazione AMU è quindi l'unica a possedere tutte e tre le varianti.

Il locus *Pgi* presenta tre varianti *Pgi* ^{95,100,104}. La variante *Pgi* ^{100} è la più comune, infatti è presente in tutte e popolazioni a frequenza maggiore fissata in omozigosi in 36 popolazioni su 38 totali. In due popolazioni del transetto compaiono le varianti *Pgi* ^{95} e *Pgi* ^{104}. La prima compare solo a Cipollaio (ICI) al 3,4% e la seconda compare sempre a ICI e a IIS ad una frequenza rispettivamente del 50% e del 1,7%.

Sette loci meritano una trattazione più approfondita, poiché discriminano tra *S. a. bianchii* e *S. italicus* e permettono quindi di identificare e descrivere la zona di contatto e ibridazione tra questi due taxa: *α-Gpdh, Ldh-1, Ldh-2, Me-2, Pgm-2, Ck, Nadh-dh.* La descrizione dei pattern delle frequenze alleliche nella zona di contatto verrà inserita nel capitolo relativo (4.1.2).
L'andamento dei sette loci discriminanti nell'areale di *S. a. ambrosii* non ha caratteristiche peculiari e viene qui di seguito illustrato. Il locus *α-Gpdh* è fissato in omozigosi nelle sette popolazioni di *S. a. ambrosii* per la variante *α-Gpdh* ^{95}. Per il locus *Ldh-1* e *Ldh-2* le popolazioni sono fissate rispettivamente per le varianti
Ldh-1 ^{85} e *Ldh-2* ^{108}. Il locus *Me-2* ha un andamento un po' più variabile. La variante *Me-2* ^{96} è fissata al 100% in quattro popolazioni (ASN, ABR, ACA, AGI); la variante *Me-2* ^{100} è fissata in omozigosi a ARG e varia dal 40,5% al 45% a API e ASP rispettivamente.
I loci *Pgm-2* e *Ck* presentano rispettivamente la variante *Pgm-2* ^{100} e *Ck* ^{90} fissata in omozigosi in tutte le popolazioni di *S. a. ambrosii.*
Il locus *Nadh* presenta due delle sue tre varianti alleliche in queste popolazioni, *Nadh* ^{100} che resta a frequenze superiori al 60% in cinque popolazioni su sette (ASN, ABR, ACA, API,AGI) e *Nadh* ^{108} che varia in quattro popolazioni con valori che vanno da 11,5% (ASN) a 75% (ASP).

Differenziamento genetico tra *S. ambrosii ambrosii, S. ambrosii bianchii* e *S. italicus.*

Dalle distanze genetiche di Nei (1972) (App.2) è stato possibile valutare il differenziamento tra taxa. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori medi di distanza genetica di Nei (D_{nei}) calcolata all'interno e tra le specie pure di S. *a*. *ambrosii*, S. *a*. *bianchii* e S. *italicus*.

	S. *a. ambrosii*	S. *a. bianchii*	S. *italicus*
S. *a. ambrosii*	0,03 (0,03)		
S. *a. bianchii*	0,26 (0,03)	0,04 (0,02)	
S. *italicus*	0,48 (0,02)	0,46 (0,03)	0,03 (0,03)

Si può notare come il differenziamento genetico intra-specifico sia paragonabile e relativamente basso, con un valore leggermente maggiore in *S. a. bianchii* (0,04) e minimo tra le popolazioni di *S. a. ambrosii* (0,03). Il maggiore differenziamento tra taxa si nota tra *S. italicus* e *S. a. ambrosii* (D_{nei} 0,48). Inoltre *S. italicus* risulta il taxa più differenziato rispetto agli altri, mentre tra le due sottospecie di *S. ambrosii* si rileva una distanza di Nei (1972) pari a 0,26.
Sulla base delle distanze genetiche è possibile stimare il tempo di divergenza tra i taxa in considerazione mediante la formula di Nei (1975).
($t = 5 \times 10^6 \times D_{nei}$). Nella tabella seguente sono riassunti i valori dei tempi di divergenza in milioni di anni.

	S. *a. ambrosii*	S. *a. bianchii*	S. *italicus*
S. a. ambrosii	0.145		
S. a. bianchii	1.32	0.185	
S. italicus	2.42	2.30	0.165

Dall'UPGMA (fig.3) emerge chiaramente la suddivisione tra i taxa ovvero si identificano ben distinti i due cluster, uno che comprende *S. a. ambrosii* e *S. a. bianchii* (A), e l'altro tutte le popolazioni di *S. italicus* (B). All'interno di A poi si distinguono A1 corrispondente ad *S. a. ambrosii,* e A2 che corrisponde a *S. a. bianchii* a sua volta suddiviso tra le popolazioni pure o debolmente introgresse (A3) e le popolazioni della zona di contatto molto più introgresse (A4). Da notare che le tre popolazioni AMU, ACM e ACH sono le più differenziate rispetto alle altre popolazioni del transetto, in quanto si trovano in prossimità del centro della zona di contatto, come verrà in seguito identificato (vedi fig.1 e tab.1 per la localizzazione del transetto e delle popolazioni introgresse). Nel cluster B la prima suddivisione (B1) è proprio tra le popolazioni del transetto adiacenti ad AMU, ACM e ACH e cioè IIS, ICI e IVA che sono le più differenziate da tutte le altre per gli stessi motivi. Tutte le altre popolazioni di *S. italicus* si suddividono poi in altri due cluster (B2), uno che comprende le popolazioni di *S. italicus* pure e alcune poco introgresse (IMA, IMN) della porzione nord-occidentale dell'areale (B3) e l'altro (B4) che include tutte le popolazioni introgresse e debolmente introgresse di *S. italicus* dai margini del transetto (ad es. ICS, IFO) a quelle più lontane fino a Firenze (IFI). La popolazione di ISM è risultata la più differenziata in *S. italicus*, come era prevedibile a causa delle frequenze alleliche peculiari registrate ad alcuni loci. Un esempio per tutti la fissazione casuale di alcuni alleli tipici di *S. a. bianchii* (ad es. α*-Gpdh* ^{95}*),* già attribuita al basso numero di individui campionati, meno di dieci, e/o all'azione della deriva genetica.

Dall'UPGMA di Wagner (fig.4) emerge ancora più chiaramente come il differenziamento genetico segua una direttiva geografica sia all'interno del cluster riferibile ad *S. a. bianchii* (A2), sia all'interno del cluster riferibile a *S. italicus* (A3). In quest'ultimo le distanze genetiche aumentano a mano a mano che si passa dalle popolazioni introgresse a quelle pure, che invece evidenziano scarso differenziamento genetico tra loro. Il dendrogramma illustra bene l'intergradazione tra *S. a. bianchii* (A2) e *S. italicus* (A3) attraverso le popolazioni introgresse con genoma prevalentemente *ambrosii* (ICM, AMU, ACH) e *italicus* (IIS, ICI e IVA). Queste sono le popolazioni intermedie tra i cluster principali, dove i due pool genici sono maggiormente rimescolati, e quindi in corrispondenza di queste è possibile collocare il fronte di contatto, o centro, della zona di contatto e ibridazione, come verrà successivamente confermato dai parametri di variabilità genetica e dall'andamento delle frequenze alleliche ai loci discriminanti, sempre in queste popolazioni.

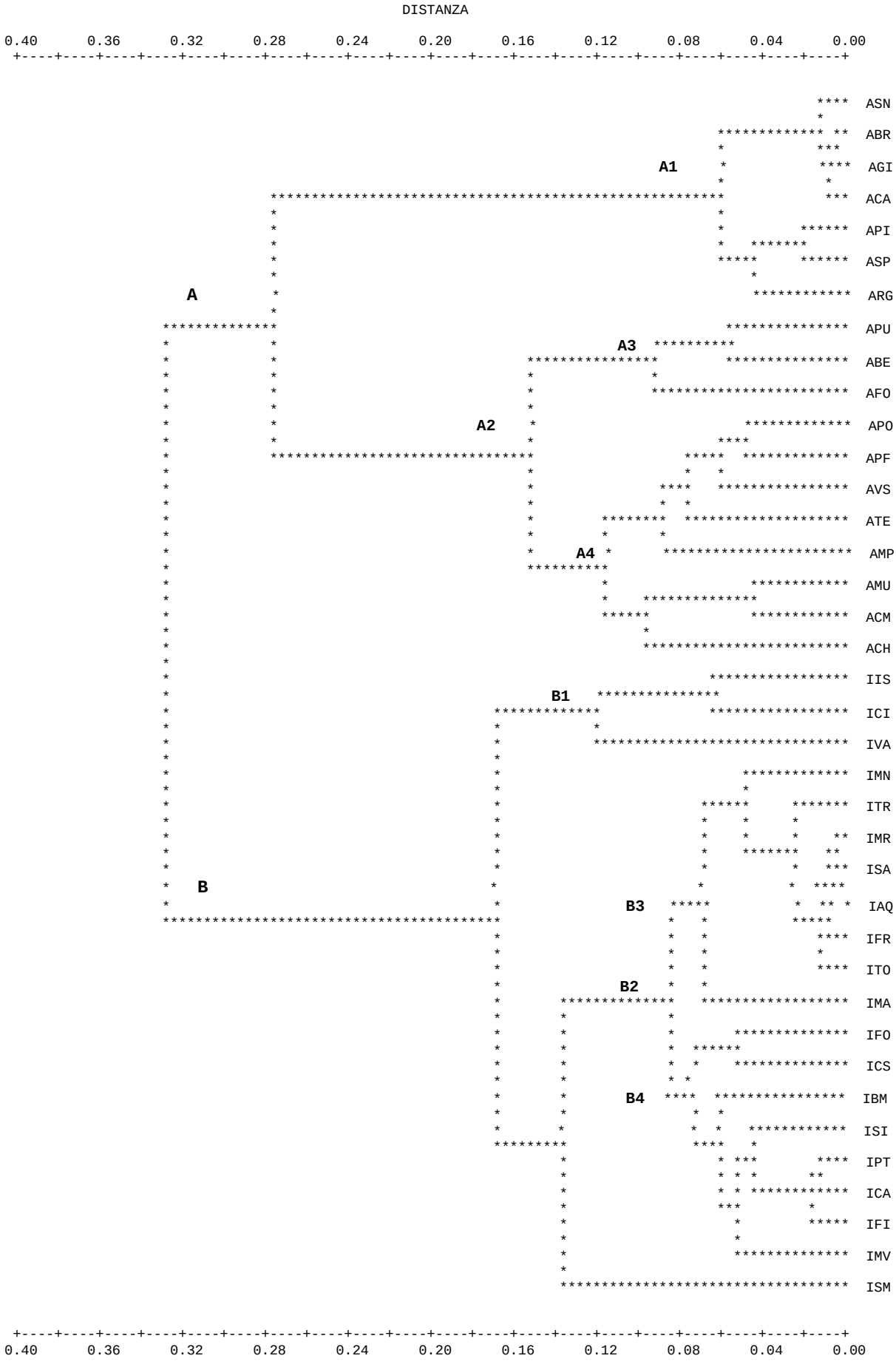


Fig. 3: UPGMA basato sulle distanze genetiche di Rogers (1972)

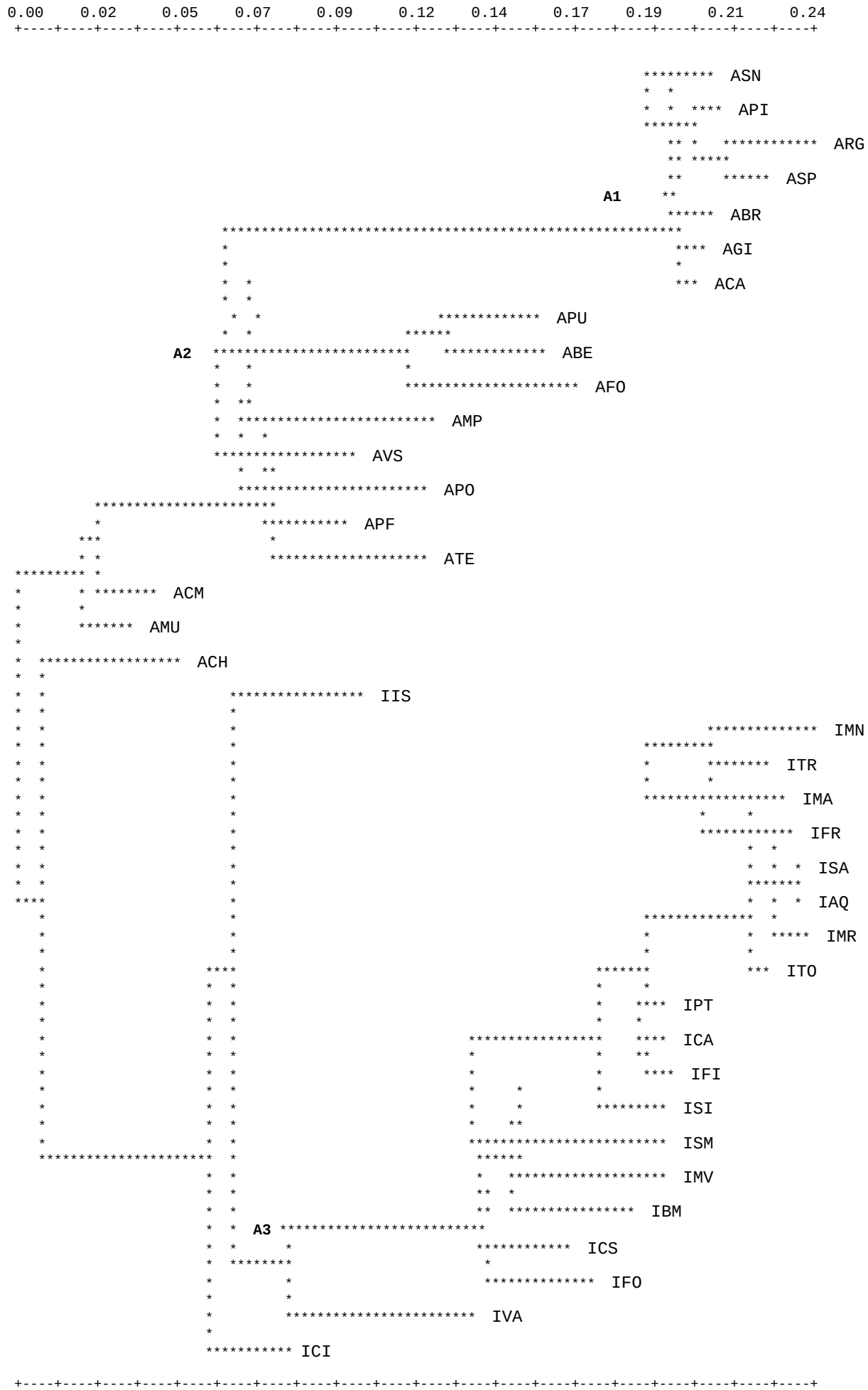


Fig. 4: UPGMA costruito con il metodo di Wagner sulle distanze di Rogers (1972)

Il test di differenziamento genico intra-popolazionale ottenuto mediante il test esatto di Fisher, ha come ipotesi nulla che la distribuzione allelica sia identica in tutte le popolazioni. Dai risultati del test emerge che dei venti loci polimorfici (tab.3), sedici sono responsabili in misura statisticamente significativa del differenziamento genico tra le popolazioni, mentre la distribuzione allelica di soli quattro loci (*Pgi, Ada-2, Idh-1* e *Got-1*) non varia in modo significativo tra le popolazioni. Il test esatto di Fisher per verificare il differenziamento genotipico tra coppie di popolazioni, prevede come ipotesi nulla che la distribuzione genotipica sia identica tra le popolazioni. In tab.4 sono rappresentate le coppie di popolazioni in cui l'ipotesi nulla non può venire rifiutata e quindi coppie in cui la distribuzione dei genotipi non varia in modo statisticamente significativo. Dai risultati emerge una forte omogeneità in alcune popolazioni introgresse della zona di contatto (per es. tra APF, ATE, AVS e AMP) e tra IIS e ICI. Del resto questi campioni sono raccolti a distanze ravvicinate (fig.1) e presentano frequenze alleliche simili per la maggior parte dei loci analizzati. La maggiore omogeneità si riscontra sempre all'interno di *S. italicus*, tra le popolazioni introgresse ai margini del transetto (ad es. IMN, ISI, IFO, ICS, IBM) e tra le popolazioni poco introgresse (ITR, IPT, ISI) con alcune popolazioni pure di *S. italicus* (ad es. IMV, IFR, ITO, IMR). Questo dimostra che tutte queste popolazioni non sono sostanzialmente differenti nella loro distribuzione genotipica sebbene ci siano diversi livelli di introgressione genica soprattutto nelle popolazioni di *S. italicus* introgresse ad est della zona di contatto. In *S. a. bianchii* invece emerge un maggior differenziamento tra popolazioni, per esempio la popolazione di APU che è *S. ambrosii bianchii* pura, ma anche ABE e AFO, debolmente introgresse, risultano statisticamente differenti da tutte le rimanenti, sebbene geograficamente vicine.

Locus	**P-value**	**S.D.**
α-Gpdh	0.00000	0.00000
Ldh-1	0.00000	0.00000
Ldh-2	0.00000	0.00000
Mdh-2	0.01105	0.00112
Me-2	0.00000	0.00000
Idh-1	0.73794	0.00886
PGM-2	0.00000	0.00000
6-Pgdh	0.00000	0.00000
Nadh	0.00000	0.00000
SOD	0.00000	0.00000
Got-1	0.19274	0.01270
Got-2	0.00000	0.00000
CK	0.00000	0.00000
Adk	0.00006	0.00004
Est-4	0.00000	0.00000
AP	0.00000	0.00000
Ada-1	0.00000	0.00000
Ada-2	0.35798	0.01279
Mpi	0.00010	0.00010
Pgi	0.42887	0.01519

Tab. 3: differenziamento genico per locus su tutte le popolazioni studiate. Probabilità del test esatto di Fisher (P-value) e deviazione standard (S.D.).

Coppie di popoazioni	X^2	df	P-value
APF - ATE	23.443	22	0.37707
APF - AVS	29.613	26	0.28395
APF - AMP	25.183	24	0.39589
ATE - AVS	36.082	26	0.09017
ATE - AMP	17.942	22	0.70944
AVS - AMP	18.820	24	0.76151
AMU - ACM	25.253	24	0.39210
AMU - ACH	29.774	22	0.12406
IIS - ICI	39.392	28	0.07482
IMN - ISI	10.709	14	0.70869
IMN - ITR	4.582	12	0.97051
IMN - IFR	3.192	10	0.97655
IMN - ITO	6.924	10	0.73263
IMN - ISA	9.198	8	0.32588
IMN - IAQ	3.022	8	0.93300
IVA - ISI	27.089	26	0.40470
IFO - ISI	13.320	16	0.64921
IFO - ICS	9.449	12	0.66422
IFO - IMA	17.440	14	0.23349
IFO - IMV	18.851	12	0.09218
IBM - ISI	23.413	18	0.17521
ISI - ICS	14.136	14	0.43966
ISI - IMV	10.410	12	0.58001
ISI - ITR	10.530	14	0.72251
ISI - IPT	15.790	16	0.46769
ISI - ICA	16.890	14	0.26211
ISI - IFI	19.892	20	0.46470
ISI - IFR	5.602	12	0.93479
ISI - ITO	7.265	12	0.83959
ISI - ISA	9.222	12	0.68383
ICS - IMV	14.313	10	0.15919
ICS - IFR	19.657	12	0.07386
ITR - IPT	14.650	10	0.14534
ITR - ICA	11.613	8	0.16931
ITR - IFI	14.499	14	0.41321
ITR - IMR	4.660	8	0.79319
ITR - IFR	3.282	6	0.77269
ITR - ITO	1.581	8	0.99129
ITR - ISA	3.619	6	0.72808
ITR - IAQ	0.000	6	1.00000
IPT - ICA	4.478	10	0.92323
IMV - IFI	14.312	14	0.42676
IMV- IFR	10.871	6	0.09244
IMV – ITO	12.225	6	0.05713
IMV - IAQ	10.548	6	0.10339
ITO - ISA	0.000	2	1.00000
ITO - IAQ	0.000	2	1.00000

Tab. 4: Test esatto di Fisher che evidenzia la probabilità non significativa (P-value), con i rispettivi gradi di libertà (df), del differenziamento genotipico a coppie di popolazioni su tutti i loci. Le coppie di popolazioni in tabella non mostrano differenziamento genotipico significativo.

Variabilità genetica

Nella tabella 5 sono riportati i valori relativi ai parametri che quantificano i livelli di variabilità genetica di tutte le popolazioni studiate: numero medio di alleli per locus (*A*), percentuale di loci polimorfici (*P*), eterozigosi media attesa (H_e) e osservata (H_o); con un limite di confidenza del 95%.

Dall'analisi della variabilità risulta che in *S. a. ambrosii* il numero medio di alleli per locus varia da un minimo di 1.0 ad un massimo di 1.2; la *(P)* varia da un minimo di zero (ABR) ad un massimo di 12,5 (ASP); l'eterozigosi osservata va da 0 a un valore massimo 3,9% sempre a ASP, mantenendosi nelle altre popolazioni comunque su valori abbastanza bassi tra 1,5% e 1,7%, tutti valori uguali o inferiori all'eterozigosi attesa.

In *S. a. bianchii* puro e debolmente introgresso (APU, ABE, AFO), il numero medio di alleli per locus resta sempre intorno a 1.1-1.3, però aumenta *(P)* in maniera progressiva secondo una direttrice geografica da APU (P=12,5) a AFO (P=16,7). Anche l'eterozigosi osservata aumenta rispetto a *S. a. ambrosii* con un valore massimo del 7,9% a AFO.

Le popolazioni del transetto sono le più variabili sia in termini di numero medio di alleli per locus, da 1.4 a 1.8, sia per valori di *(P)* che vanno da un minimo del 29,2% (ATE) ad un massimo del 50% (ICI, IVA). Anche l'eterozigosi osservata (H_o) subisce un brusco aumento con valori minimi del 14,4% (AMP) e massimi 19% (AVS). Questo risultato è coerente con il fatto che queste popolazioni appartengono ad una zona di contatto ed ibridazione ed è da attribuirsi alla coesistenza più massiccia, proprio in corrispondenza del transetto, degli alleli caratteristici delle due specie in frequenza variabile in seguito al fenomeno di introgressione genica.

Nelle popolazioni di *S. italicus* sia introgresse che debolmente introgresse, i parametri *(H_o)* e *(P)* mostrano un trend in diminuzione allontanandosi progressivamente dalla zona di contatto, come mostrato nella tabella riassuntiva dei suddetti parametri qui di seguito. Sebbene *(A)* resti più o meno costante intorno ad un range di 1.1-1.3 *(P)* varia considerevolmente tra le popolazioni introgresse, in cui si mantiene ad un range del 12,5%-25%, e quelle pure caratterizzate da scarsa variabilità oscillando tra lo zero, al margine meridionale dell'areale (ISA, IAQ) e l'8,3% al margine settentrionale (IMV). L'eterozigosi osservata resta sempre sotto il

Tab. 5: parametri di variabilità genetica. A: numero di alleli per locus, P: percentuale di loci polimorfici, H_o/ H_e: eterozigosi osservata/attesa

POPOLAZIONE	(A)	(P)	Ho	He
ASN	1.1	8.3	0.015	0.014
	(0.1)		(0.011)	(0.010)
ABR	1.0	0.0	0.000	0.000
	(0.0)		(0.000)	(0.000)
ACA	1.2	4.2	0.017	0.018
	(0.1)		(0.012)	(0.012)
API	1.1	8.3	0.033	0.041
	(0.1)		(0.023)	(0.028)
AGI	1.0	4.2	0.007	0.007
	(0.0)		(0.007)	(0.007)
ARG	1.0	0.0	0.000	0.000
	(0.0)		(0.000)	(0.000)
ASP	1.1	12.5	0.039	0.044
	(0.1)		(0.024)	(0.027)
APU	1.1	12.5	0.049	0.048
	(0.1)		(0.033)	(0.029)
ABE	1.2	20.8	0.046	0.055
	(0.1)		(0.021)	(0.026)
AFO	1.3	16.7	0.076	0.075
	(0.1)		(0.034)	(0.029)
APO	1.7	45.8	0.179	0.163
	(0.2)		(0.051)	(0.042)
APF	1.6	41.7	0.188	0.165
	(0.2)		(0.054)	(0.046)
ATE	1.5	29.2	0.139	0.139
	(0.1)		(0.046)	(0.045)
AVS	1.6	41.7	0.190	0.168
	(0.1)		(0.055)	(0.046)
AMP	1.4	41.7	0.144	0.154
	(0.1)		(0.042)	(0.043)
AMU	1.7	45.8	0.169	0.171
	(0.2)		(0.045)	(0.044)
ACM	1.7	45.8	0.161	0.178
	(0.2)		(0.044)	(0.046)
ACH	1.5	33.3	0.179	0.175
	(0.1)		(0.059)	(0.053)
IIS	1.5	45.8	0.182	0.205
	(0.1)		(0.052)	(0.055)
ICI	1.8	50.0	0.151	0.171
	(0.2)		(0.037)	(0.042)
IVA	1.5	50.0	0.192	0.191
	(0.1)		(0.047)	(0.044)
IMN	1.2	16.7	0.042	0.079
	(0.1)		(0.029)	(0.037)
IFO	1.2	16.7	0.044	0.049
	(0.1)		(0.023)	(0.024)
IBM	1.2	20.8	0.053	0.073
	(0.1)		(0.024)	(0.034)
ISI	1.2	25.0	0.070	0.079
	(0.1)		(0.035)	(0.032)
ICS	1.2	20.8	0.090	0.101
	(0.1)		(0.038)	(0.042)
IMA	1.1	12.5	0.017	0.026
	(0.1)		(0.010)	(0.016)
ISM	1.2	16.7	0.036	0.034
	(0.1)		(0.019)	(0.017)
IMV	1.1	8.3	0.042	0.042
	(0.1)		(0.029)	(0.029)
ITR	1.1	12.5	0.037	0.031
	(0.1)		(0.028)	(0.023)
IPT	1.2	12.5	0.038	0.038
	(0.1)		(0.023)	(0.021)
ICA	1.1	8.3	0.028	0.027
	(0.1)		(0.018)	(0.017)
IFI	1.3	16.7	0.033	0.037
	(0.1)		(0.015)	(0.016)
IMR	1.0	4.2	0.007	0.007
	(0.0)		(0.007)	(0.007)
IFR	1.0	4.2	0.014	0.014
	(0.0)		(0.014)	(0.014)
ITO	1.0	4.2	0.021	0.018
	(0.0)		(0.021)	(0.018)
ISA	1.0	0.0	0.000	0.000
	(0.0)		(0.000)	(0.000)
IAQ	1.0	0.0	0.000	0.000
	(0.0)		(0.000)	(0.000)

* un locus è considerato polimorfico se la frequenza dell'allele più comune non supera 0.95.

10% nelle popolazioni fortemente introgresse della zona di contatto, mentre scende sotto il 5% in quelle pure.

tabella riassuntiva dei parametri di variabilità genetica espressi in tab. 5

P* (Intervallo di variazione)	**N.** (Popolazioni)	***Taxon***	H_o (Intervallo di variazione)
0,0 - 12,5	7	*S. a. ambrosii*	0 – 3,9
12,5 - 20,8	3	*S. a. bianchii*	4,6 – 7,6
29,2 - 45,8	8	*S. a. bianchii* (introgresse transetto)	13,9 – 19,0
45,8 – 50	3	*S. italicus* (introgresse transetto)	15,1- 19,2
8,3 – 25,8	11	*S. italicus* (introgresse transetto)	2,8 – 7,9
0,0 – 8,3	6	*S. italicus*	0,0 – 4,2

∗ Criterio p= 0,05 cioè l'allele più comune non deve superare la frequenza massima di 0,95.

Si può notare come ci sia una corrispondenza tra l'andamento dei parametri della variabilità genetica e il grado di introgressione delle popolazioni. Bisogna comunque notare come *S. a. bianchii* sia in generale più variabile di *S. italicus* (confronto tra popolazioni pure) e come questa differenza si rifletta anche per le popolazioni introgresse *bianchii*, più variabili rispetto a quelle introgresse *italicus.* Da notare che le uniche popolazioni di *S. italicus* con una certa variabilità genetica (H_o tra 3% e 8%) si collocano nell'ambito della zona di contatto e nelle aree immediatamente adiacenti ad essa.

Verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, Linkage disequilibrium e F_{is}

La verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, condotta con il test χ^2 per locus ha messo in evidenza scostamenti significativi in cinque popolazioni. Tali scostamenti permanevano in due popolazioni (ICI, IBM) anche dopo aver effettuato l'exact test di Fisher su ogni locus per tutte le popolazioni (tab.6) e il global test su tutti i loci per popolazione (tab.7). Di queste cinque popolazioni, quattro sono localizzate al centro della zona di contatto (ACM, ACH, ICI e IIS) e la quinta è IBM, popolazione di *S. italicus* introgressa. In particolare sono emersi forti scostamenti a carico della *Pgm-2* per ACM, ICI e IIS, della *α-Gpdh* per ICI e IIS, della *Ck* per ACM, ACH e IIS, e della *6-Pgdh* per IBM. In tutti i casi si è osservato un deficit di eterozigoti. Da notare che i loci non in equilibrio di Hardy-Weinberg nelle quattro popolazioni della zona di contatto sono diagnostici. Il locus *Ck* mostra un deficit di eterozigoti in tre campioni della zona di contatto (ACH, ACM, IIS). Considerato che questo locus ha una pressoché nulla introgressione, rilevabile in sole sette popolazioni, uno scostamento significativo riscontrato in tre popolazioni su sette, tutte localizzate nel centro della zona di contatto è degno di nota.

Il test locus per locus multi-samples (cioè attraverso tutte le popolazioni) ha riconfermato che i loci *Pgm-2, α-Gpdh* e *6-Pgdh* presentano scostamenti significativi nella direzione di una carenza di eterozigoti (tab.6).

Sono stati calcolati i valori di F_{is} per ogni popolazione su tutti e sette i loci discriminanti. Si può notare (tab.8 e fig.5) come solo le popolazioni della zona di contatto e ibridazione mostrino i valori più elevati, sebbene comunque relativamente bassi perché tutti compresi tra 0,15-0,20. Ai margini della zona i valori progressivamente scendono fino a raggiungere i minimi nelle popolazioni pure di *S. italicus* e *S. a. ambrosii* e *S. a. bianchii*.

La stima del Linkage Disequilibrium (LD), cioè l'associazione non casuale tra alleli di loci differenti, è utile per descrivere la distribuzione dei genotipi ibridi. Se le popolazioni che sono venute in contatto sono geneticamente differenziate, come è questo il caso, si possono avere forti linkage disequilibria, anche fra loci non linked, e deficit di eterozigoti. Alla formazione di una zona ibrida questi valori sono in genere massimi ma con il passare delle generazioni possono calare con l'aumentare del "mixing" tra i pool genici, in assenza di selezione, e in assenza di flusso di parentali al centro della zona.

Locus	P-value	S.E.
α-Gpdh	.0133	.0006
Ldh-1	.7658	.0053
Ldh-2	.9038	.0018
Mdh-1	-	-
Mdh-2	1	.
Me-1	-	-
Me-2	.0991	.0024
Idh-1	-	-
PGM-2	.0001	.
6-Pgdh	.0010	.0002
Nadh	.5773	.0078
SOD	-	-
Got-1	1	.
Got-2	.1765	.0022
CK	.1162	.0031
Adk	.8113	.0027
Pgm-1	-	-
Est-4	.6503	.0081
AP	.4190	.0025
Ada-1	1	.
Ada-2	1	.
Mpi	.6031	.0028
Pgi	1	.

Tab. 6 Hardy-Weinberg multi-samples test, dove P-value è la probabilità che gli scostamenti dall'equilibrio di HW siano significativi con relativa deviazione standard (S.E.). Risultato per locus su tutte le popolazioni.

Pop	P-value	S.D.
ASN	1	0.000
ABR	-	-
ACA	.3911	.0068
API	.1515	.0027
AGI	1	0.000
ARG	-	-
ASP	.4598	.0029
APU	.0685	.0014
ABE	.1884	.0024
AFO	.3362	.0029
APO	.8815	.0030
APF	.9729	.0013
ATE	.5569	.0057
AVS	.9746	.0013
AMP	.2672	.0020
AMU	.6612	.0042
ACM	.0796	.0030
ACH	.5455	.0033
IIS	.1335	.0021
ICI	.0093	.0009
IMN	.0692	.0013
IVA	.4275	.0021
IFO	.4588	.0024
IBM	.0015	.0001
ISI	.1423	.0020
ICS	.1269	.0022
IMA	.2007	.0018
ISM	1	0.000
IMV	.8077	.0020
ITR	1	0.000
IPT	.3502	.0023
ICA	1	0.000
IFI	.0802	.0024
IMR	-	-
IFR	-	-
ITO	1	0.000
ISA	-	-
IAQ	-	-

Tab. 7 Hardy-Weinberg multi-locus test. P-value è la probabilità che lo scostamento dall'equilibrio di HW sia significativo con relativa deviazione standard (S.D.) per popolazione.

popolazione	F_{is}
ASN	0.015468
ABR	0.000000
ACA	0.017920
API	0.034161
AGI	0.007246
ARG	0.000000
ASP	0.040994
APU	0.051164
ABE	0.047791
AFO	0.079232
APO	0.187139
APF	0.195707
ATE	0.145306
AVS	0.197961
AMP	0.149845
AMU	0.176112
ACM	0.168335
ACH	0.186335
IIS	0.190058
ICI	0.157146
IMN	0.043478
IVA	0.200483
IFO	0.045549
IBM	0.055460
ISI	0.073188
ICS	0.093944
IMA	0.018116
ISM	0.046739
IMV	0.043478
ITR	0.038164
IPT	0.039545
ICA	0.029456
IFI	0.034507
IMR	0.007246
IFR	0.014493
ITO	0.021739
ISA	0.000000
IAQ	0.000000

Tab. 8: Valori di F_{is} per popolazione, valori medi calcolati su tutti i loci.

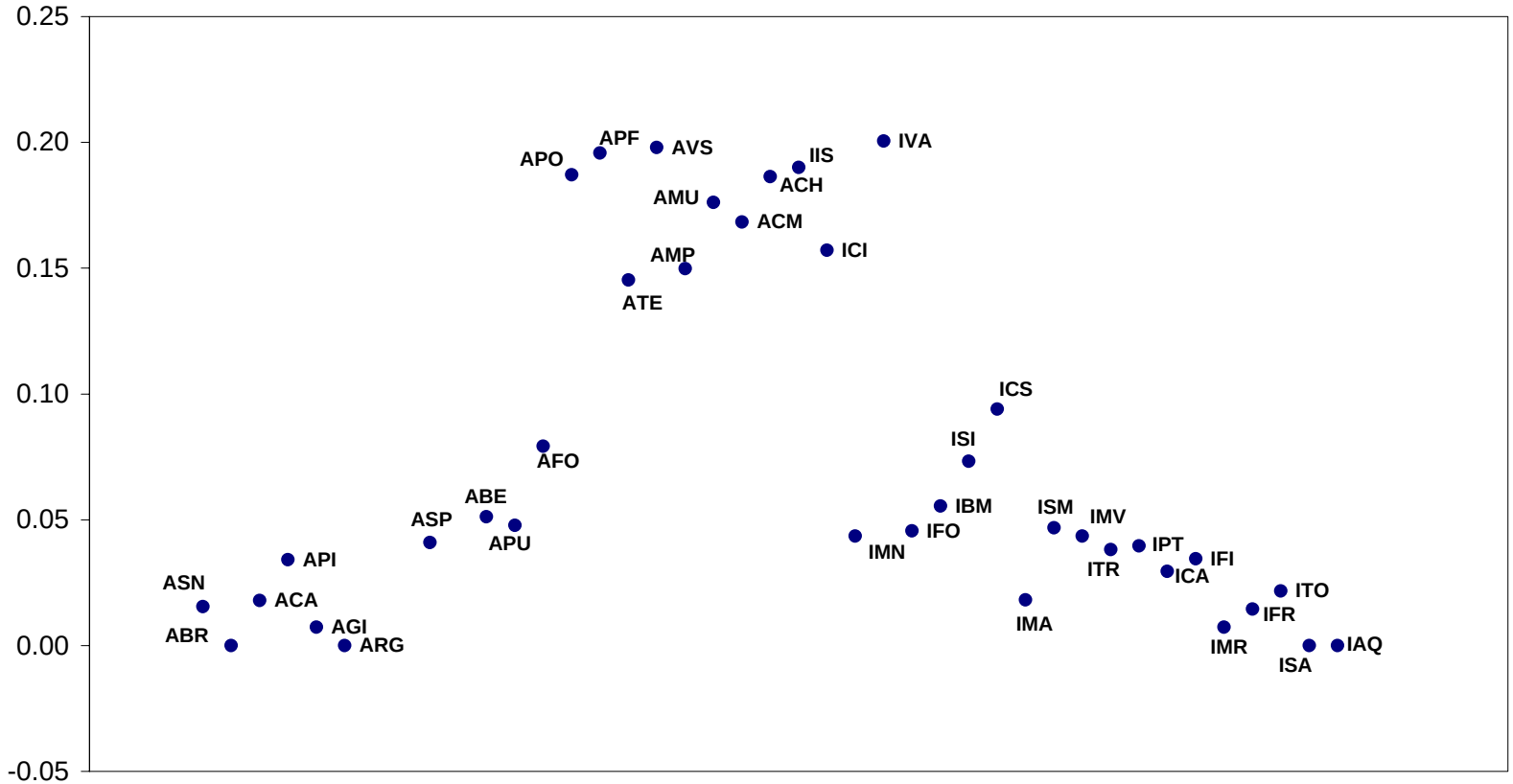


Fig. 5, valori di F_{is} per popolazione nelle 38 popolazioni studiate.

Dall'analisi dei linkage disequilibria per coppia di loci su tutte le popolazioni, è emerso realmente significativo solo quello tra i loci *Ldh-1* e *Ldh-2* con una probabilità altamente significativa. Per inciso, non è stato possibile calcolare il linkage disequilibrium per le popolazioni IIS e ACH dove il locus *Ldh-2* risulta fissato.

Dai risultati del test effettuato per ogni coppia di loci discriminanti emerge che linkage disequilibria, anche tra loci unlinked, sono presenti nelle popolazioni di *S. a. bianchii* introgresso, ovvero a ABE, AFO e nelle popolazioni del transetto, e che aumentano in prossimità del centro della zona e cioè nelle popolazioni di AMU, ACM, IIS, ICI, IVA. Al contrario, sono del tutto assenti disequilibri significativi nelle popolazioni di *S. italicus* introgresse e pure (tab.9). La popolazione ACH che sta nel centro della zona di contatto, mostra solo un LD a parte quello tra *Ldh-1* e *Ldh-2*, in quanto risulta fissata ad un singolo allele per dodici dei venti loci polimorfici presumibilmente a causa del basso numero di individui saggiati elettroforeticamente.

POP /Rij	*aGpdh Ldh-1*	*aGpdh Ldh-2*	*aGpdh Me-2*	*aGpdh Pgm-2*	*aGpdh Nadh*	*aGpdh Ck*	*Ldh1 Ldh-2*	*Ldh1 Me-2*	*Ldh1 Pgm-2*	*Ldh1 Nadh*	*Ldh2 Pgm-2*	*Ldh2 Nadh*	*Me2 Pgm-2*	*Me2 Nadh*	*Pgm2 Nadh*	*Nadh Ck*
AFO							0.99999		0.98332		0.98332					
APF	0.57145						0.77286									
ATE		0.79498					0.61468									
AVS							0.26154	0.97593								0.98304
ACM				0.46414			0.80099		0.3058							
ACH							fixed								0.57761	
AMU			0.46693			0.665	0.9841		0.43316		0.84242					
IIS			0.46207	0.7396			fixed		0.68597					0.60074		0.41026
ICI			0.30865				0.9769						0.12814			
IVA				0.73485	0.97463		0.99999			0.80812		0.80812		0.57143	0.90711	

Tab. 9 coefficiente di correlazione del linkage disequilibrium, R_{ij}, tra coppie di loci (Weir, 1979). Sono indicate solo le popolazioni in cui il linkage disequilibrium è risultato significativo.

4.1.2 Descrizione della zona di contatto e ibridazione

Andamento delle frequenze alleliche ai sette loci discriminanti

Da precedenti studi sui sistemi gene-enzima in *Speleomantes* (Cimmaruta 1993) era emersa la presenza di una zona di contatto e ibridazione tra *S. italicus* e *S. a. bianchii* sulle Alpi Apuane. Il differenziamento genetico tra le specie, precedentemente descritto, è a carico di sette loci riassunti nella tabella sottostante.

Locus diagnostico	**Alleli tipici di *S. ambrosii bianchii***	**Alleli tipici di *S. italicus***
α-Gpdh (α-glicerofosfato deidrogenasi)	95	100
Pgm-2 (Fosfoglucomutasi)	97	100
Me-2 (Enzima malico)	96	100
Nadh-dh (Nadh deidrogenasi)	85	100
CK (Creatinochinasi)	90	100
Ldh-1 (Lattico deidrogenasi)	85	100
Ldh-2 (Lattico deidrogenasi)	108	100

L'andamento delle frequenze medie ai sette loci, permette di distinguere le popolazioni campionate in termini di: i) popolazioni "pure", cioè fissate per alleli alternativi tipici; ii) introgresse; iii) debolmente introgresse, cioè con una percentuale variabile degli alleli tipici dell'altra specie (fig.6).

In quest'ottica la sottospecie *S. ambrosii bianchii*, che occupa un areale di dimensioni molto ridotte, è rappresentata da un'unica popolazione pura, APU, e da due debolmente introgresse, ABE e AFO, in cui la frequenza media degli alleli di *S. italicus* va dal 15% al 20%. Le popolazioni introgresse con genotipo prevalentemente attribuibile a *S. a. bianchii* sono la quasi totalità di quelle localizzate nella zona di contatto e mostrano una frequenza media degli alleli dell'altra specie che va più o meno dal 30% al 50% (APO, APF, ATE, AVS, AMP, ACM, AMU, ACH). In *S. italicus* le popolazioni pure in cui sono fissati gli alleli tipici della specie per i sette loci discriminanti sono localizzate al margine dell'areale dall'estremo sud (IAQ, ISA) a

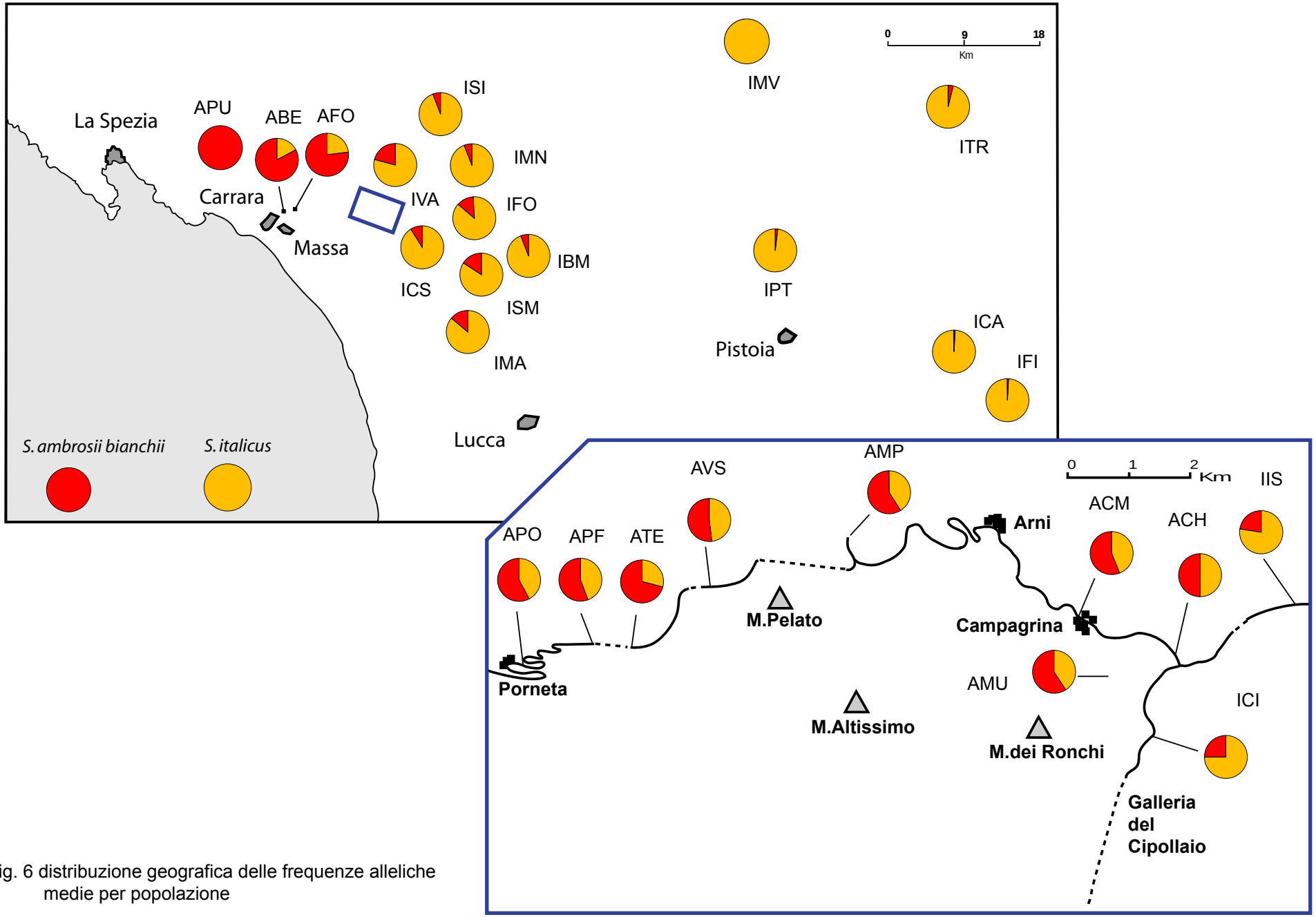


Fig. 6 distribuzione geografica delle frequenze alleliche medie per popolazione

nord-ovest, compresa la popolazione IMV nella provincia di Reggio Emilia (tab.1). Le popolazioni debolmente introgresse sono quattro (IFI, ICA, IPT, ITR), in cui le frequenze medie degli alleli *bianchii* vanno dal 2% al 4% e sono localizzate nell'Appennino tosco-emiliano. Le popolazioni ad est del transetto (IMA, ISM, IBM, ICS, IFO, IVA, IMN, ISI) sono introgresse con un range di frequenze medie degli alleli *bianchii* che va da un minimo del 5% ad un massimo del 20%. Infine le due popolazioni più orientali del transetto (ICI, IIS) sono anch'esse *S. italicus* introgresse, con alleli *S. a. bianchii* che raggiungono il 25%.

Le frequenze medie sono il risultato, la media appunto, dell'andamento delle frequenze ai singoli loci, e non ne riflettono i singoli pattern d'intergradazione quando, come nel caso in esame, loci differenti mostrano pattern d'introgressione diversi. Infatti andando ad esaminare la variazione geografica delle frequenze alleliche di ciascuno dei sette loci discriminanti si osserva che ad alcuni loci il grado di introgressione è molto elevato (*Me–2*) o elevato (α-*Gpdh*, *Nadh-dh*), mentre ci sono loci che presentano scarsa introgressione (*Pgm-2*, *Ldh-1*, *Ldh-2*) o addirittura mostrano coesistenza degli alleli tipici di *S. italicus* e *S. a. bianchii* solo in un'area limitata della zona di contatto (*Ck*). Andiamo allora ad analizzarli in dettaglio.

Il locus *α-Gpdh* (fig.7) presenta la variante *α-Gpdh* ^{95} fissata in omozigosi in due popolazioni di *S. a. bianchii* (APU, AFO), mentre nelle popolazioni di Bedizzano (ABE) e di *S. a. bianchii* introgresse del transetto, varia da un minimo di 83% (ATE) ad un massimo del 100% (AVS). Nella popolazione di IIS la frequenza cala al di sotto del 60% e lo stesso trend in diminuzione continua anche per le restanti popolazioni di *S. italicus* e introgresse con un range di frequenze che va da 38,9% (IVA, ICI) a 3.3% (IPT), fino a scomparire del tutto nelle popolazioni di *S. italicus* debolmente introgresse più meridionali (ICA, IFI). Da notare l'andamento fluttuante della variante *α-Gpdh* ^{95} nelle popolazioni di *S. italicus* introgresse. In generale questa variante non sembra penetrare a fondo in queste popolazioni ma si assiste ad alcune particolarità come ad esempio la fissazione "anomala" in ISM di questa variante che è tipica di *S. a. bianchii* e la presenza ad una frequenza relativamente alta (33%), considerata la posizione geografica, anche ad ITR. Questo fenomeno è probabilmente da attribuirsi alla relativamente piccola dimensione del campione, anche se fenomeni di frammentazione e deriva genetica sono abbastanza frequenti e marcati in questi anfibi. La variante *α–Gpdh* ^{90} è presente in solo due popolazioni di *S. italicus*

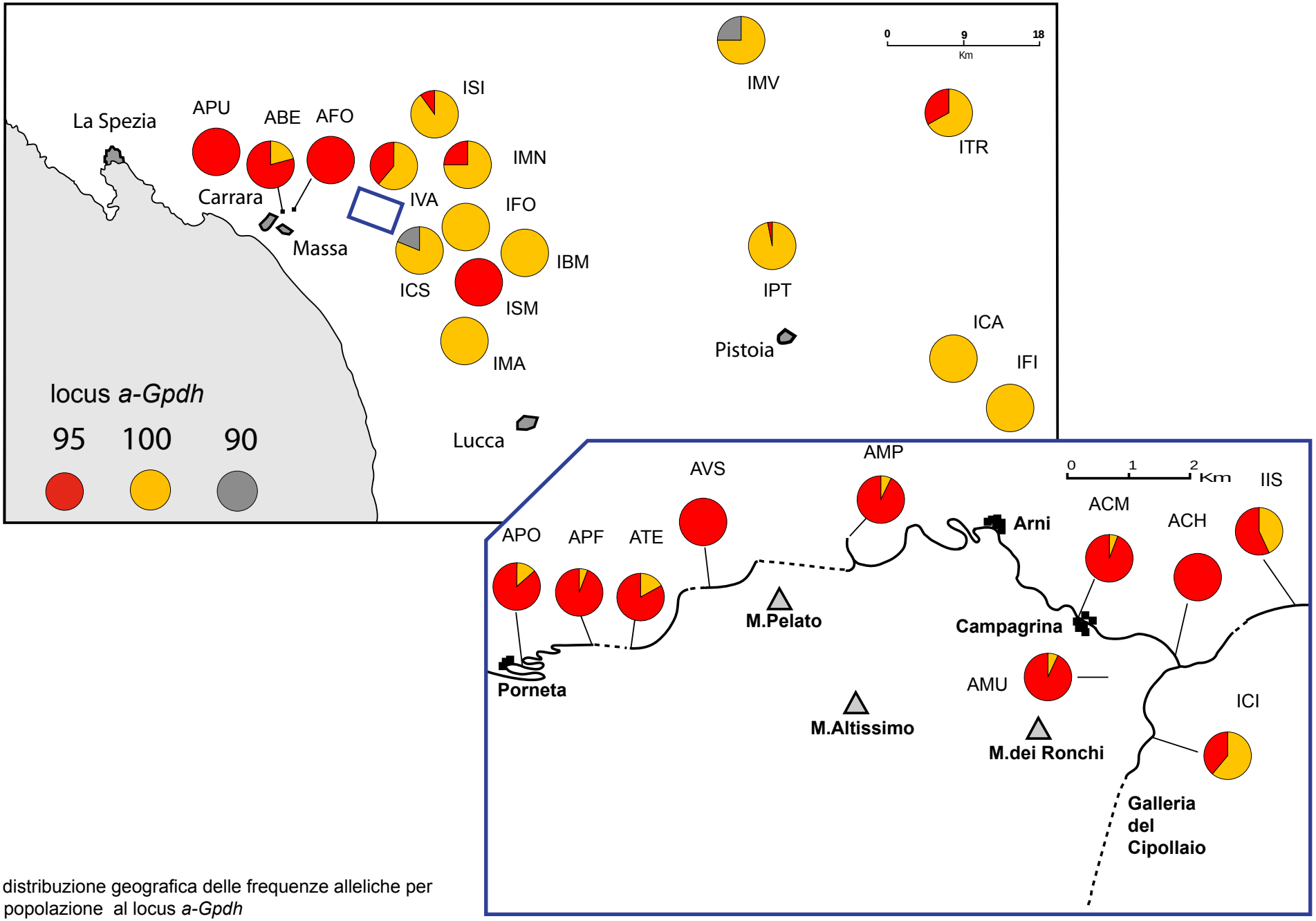


fig. 7 distribuzione geografica delle frequenze alleliche per popolazione al locus *a-Gpdh*

introgresse ICS (18,7%) e IMV (25%), la presenza di un allele raro in sole due popolazioni lontane geograficamente può nuovamente essere spiegata come sopra.

Il locus *Ldh-1* presenta tre varianti alleliche *Ldh-1* ^{85,100,105} (fig.8). La variante tipica di *S. a. bianchii*, *Ldh-1* ^{85} , è fissata in omozigosi a Pulica (APU) e resta ad alte frequenze, sopra il 90%, nelle altre due popolazioni di *S. a. bianchii* debolmente introgresse (ABE, AFO). Nel transetto la sua frequenza è elevata nell'area di Porneta-Monte Pelato, con frequenze di 45-75% (APO, APF, ATE, AVS, AMP), e scende al di sotto del 30% nella zona di Campagrina, Cave Henraux e Vagli (ACM, ACH, IVA) per poi scomparire a IIS. Da segnalare la variante *Ldh-1* ^{105} che si ritrova solo nell'area occidentale del transetto con frequenza bassa (3,6% ad AVS e 4,2% ad ATE) o media nella zona orientale (11,9% ad AMU e 19,6% ad IIS).

Il locus *Ldh-2* ha variazione parallela all'*Ldh-1* ma presenta due sole varianti alleliche: *Ldh-2* ^{100} e *Ldh-2* ^{108} (fig.9). L'andamento delle frequenze alleliche è quindi simile al locus precedente, coerentemente al valore significativo di linkage disequilibrium riscontrato per questi due loci. Si assiste ad una progressiva diminuzione della variante allelica tipica di *S. a. bianchii* e cioè *Ldh-2* ^{100} (fissata a Pulica e che resta a frequenze maggiori del 92% a ABE e AFO), a mano a mano che si passa dalle popolazioni occidentali della zona di contatto, dove la frequenza varia da un minimo di 38,5% a APF e un massimo del 75% AMP, a quelle orientali dove la frequenza va da zero (IIS, ACH) a valori comunque al di sotto del 25% (AMU, ACM, ICI, IVA). Nelle rimanenti 15 popolazioni di *S. italicus* e introgresse resta fissata la variante allelica tipica di questa specie e cioè *Ldh-2* ^{100}.

Il locus *Me-2* mostra un pattern differente rispetto ai due precedenti. Presenta tre varianti alleliche *Me-2* ^{90,96,100} (fig.10). *Me-2* ^{96} è fissata in omozigosi a APU, ABE e AFO e si mantiene a frequenze elevate tra 100% (ATE) e 87% (ICI) per quasi tutte le popolazioni del transetto eccetto che per ACH e IIS dove la frequenza scende intono al 65%. Questa variante penetra molto lontano dalla zona di contatto nelle popolazioni di *S. italicus* introgresse, con un andamento digradante in termini di frequenze alleliche. Infatti *Me-2* ^{96} è presente nelle popolazioni di *S. italicus* introgresse ai margini del transetto con una frequenza che va dal 78,6% di IFO al 16.7% di IPT fino al 5,6% di IFI. Le frequenze basse (6,2% di ISM) o nulle (IMA, ISI,

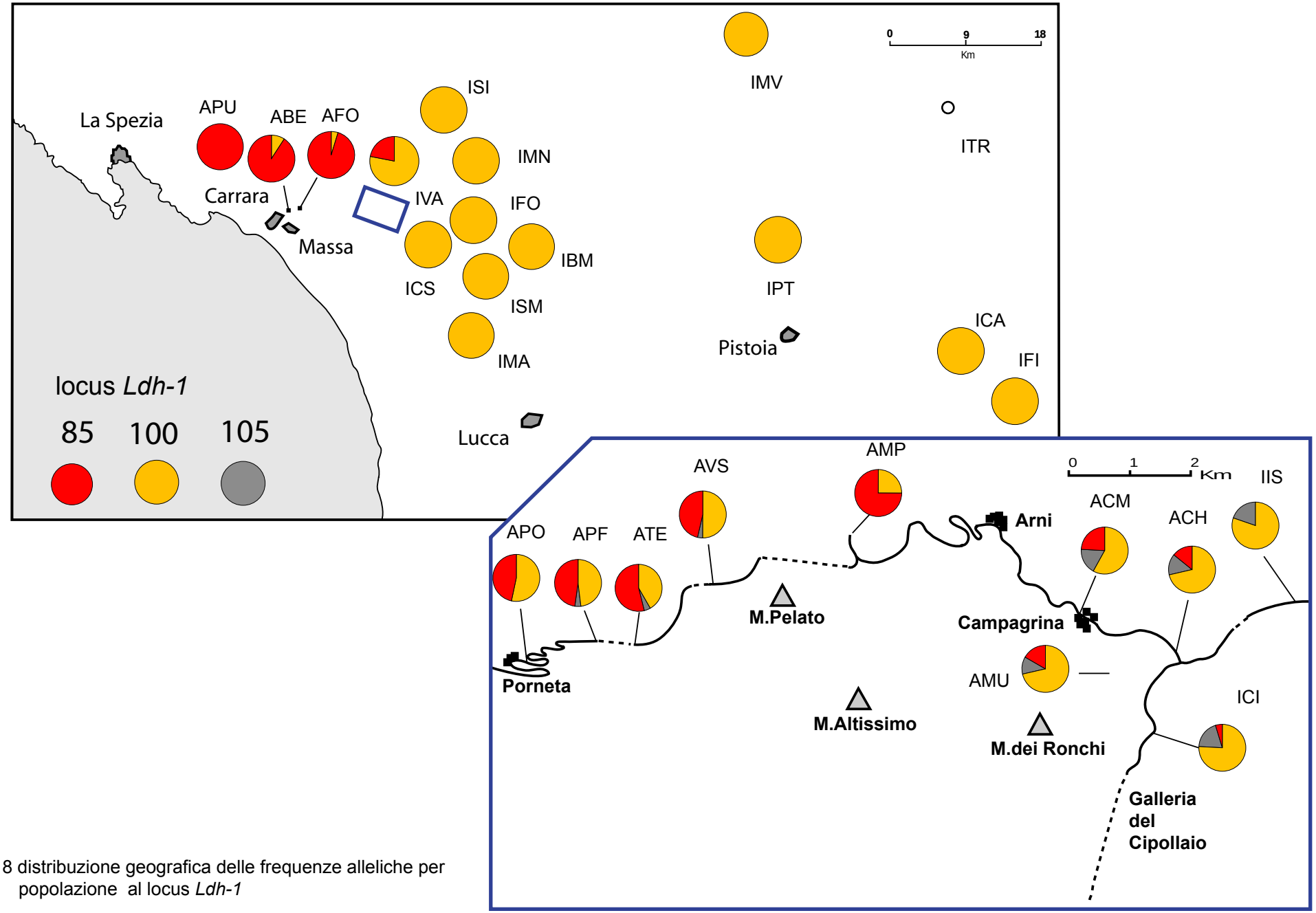


fig. 8 distribuzione geografica delle frequenze alleliche per popolazione al locus *Ldh-1*

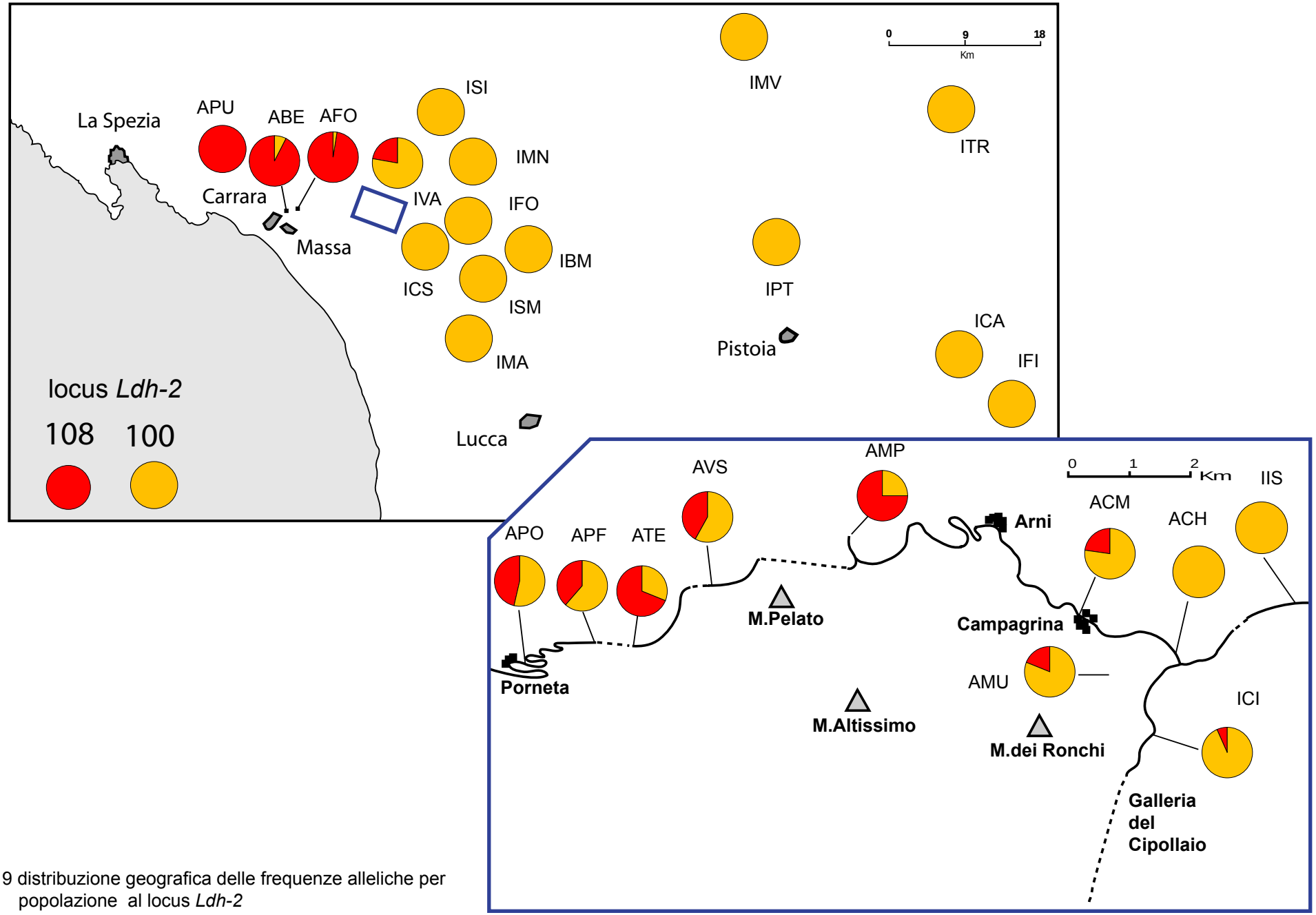


fig. 9 distribuzione geografica delle frequenze alleliche per popolazione al locus *Ldh-2*

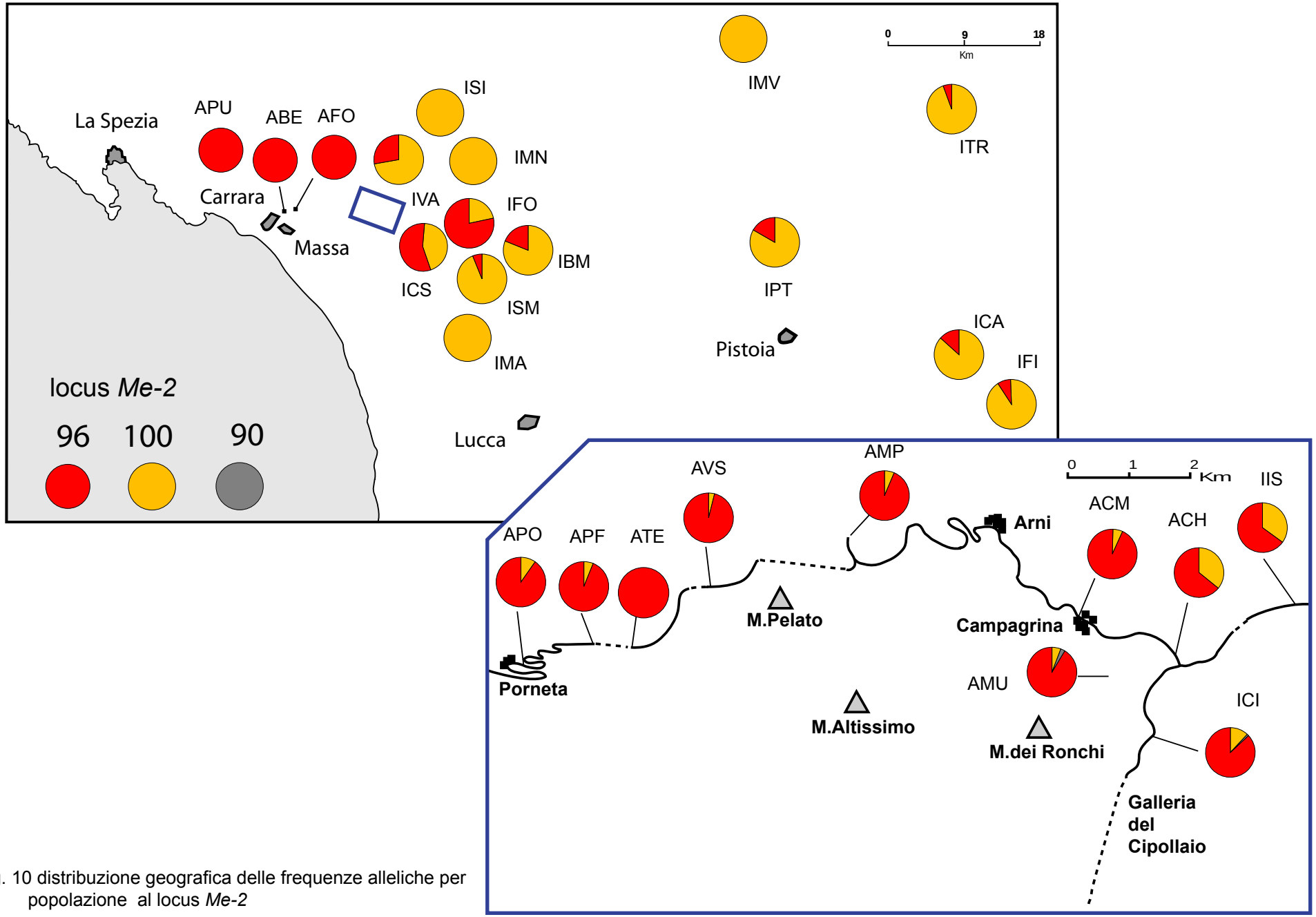


fig. 10 distribuzione geografica delle frequenze alleliche per popolazione al locus *Me-2*

IMN) in alcune popolazioni adiacenti la zona di contatto vera e propria sono da imputarsi al bassissimo numero di esemplari studiati per questo locus. La variante *Me–2* [100] è fissata nelle popolazioni di *S. italicus* pure.

Il locus *Pgm-2* è molto diverso dal precedente (fig.11). Presenta tre varianti alleliche *Pgm-2* [97,100,103]. La variante allelica tipica di *S. a. bianchii Me-2* [96] è fissata a APU ed ABE e si mantiene a frequenza allelica elevata nelle popolazioni del transetto con valori che vanno dal 50% (AVS, AMP) al 95%-100% (ATE). Solo a IIS e ICI la frequenza comincia a scendere sotto il 50% (40,9% e 36% rispettivamente). La penetrazione in *S. italicus* al di fuori delle zona di contatto è a dir poco scarsa in quanto questa variante è presente solo in due popolazioni di *S. italicus* introgresse, e cioè a una frequenza del 50% a IVA e del 10% a ISI. In tutte le altre popolazioni è fissata la variante *Pgm-2* [100] tipica di *S. italicus.* la variante *Pgm-2* [103] è presente solo in tre popolazioni, due nel transetto (con frequenza bassa 1,8% a APO e 2,9% a APF), e poi molto più lontano a IMA al 18,7%. Ancora una volta l'eterogeneità genetica riscontrata nelle frequenze alleliche suggerisce una possibile azione della deriva.

Il locus *Nadh* ha un andamento intermedio rispetto ai loci ad elevata e bassa introgressione. Presenta tre varianti alleliche *Nadh* [85, 100,108] (fig.12). *Nadh* [85] è fissata in omozigosi sia ad APU che ad ABE, mentre ad AFO scende al 65%. Nelle popolazioni del transetto la variazione nella frequenza allelica va dal 35% (ACH) al 79% (ATE). Nelle popolazioni di IIS e ICI scende sotto il 30%. Questa variante penetra in sette popolazioni di *S. italicus* introgresse immediatamente adiacenti al transetto, con una frequenza che va da un minimo di 46% (AMU) ad un massimo di 73,1% (APO). Le popolazioni rimanenti presentano fissata in omozigosi la variante *Nadh* [100] . L'allele *Nadh*[108] è presente in quattro popolazioni del transetto di cui tre a frequenza bassa e cioè ad APO (1,3%), AVS (7,1%) e ACM (1,4%); mentre a ACH raggiunge il 21,4%.

Il locus *Ck* fra tutti i loci finora esaminati è senz'altro quello che meglio discrimina tra le due specie in quanto l'introgressione delle sue due varianti alternative, e cioè *Ck* [90] (tipica di *S. a. bianchii*) e *Ck* [100] (tipica di *S. italicus*) presentano una pressoché nulla introgressione nelle popolazioni delle due specie l'una rispetto all'altra (fig.13). Infatti

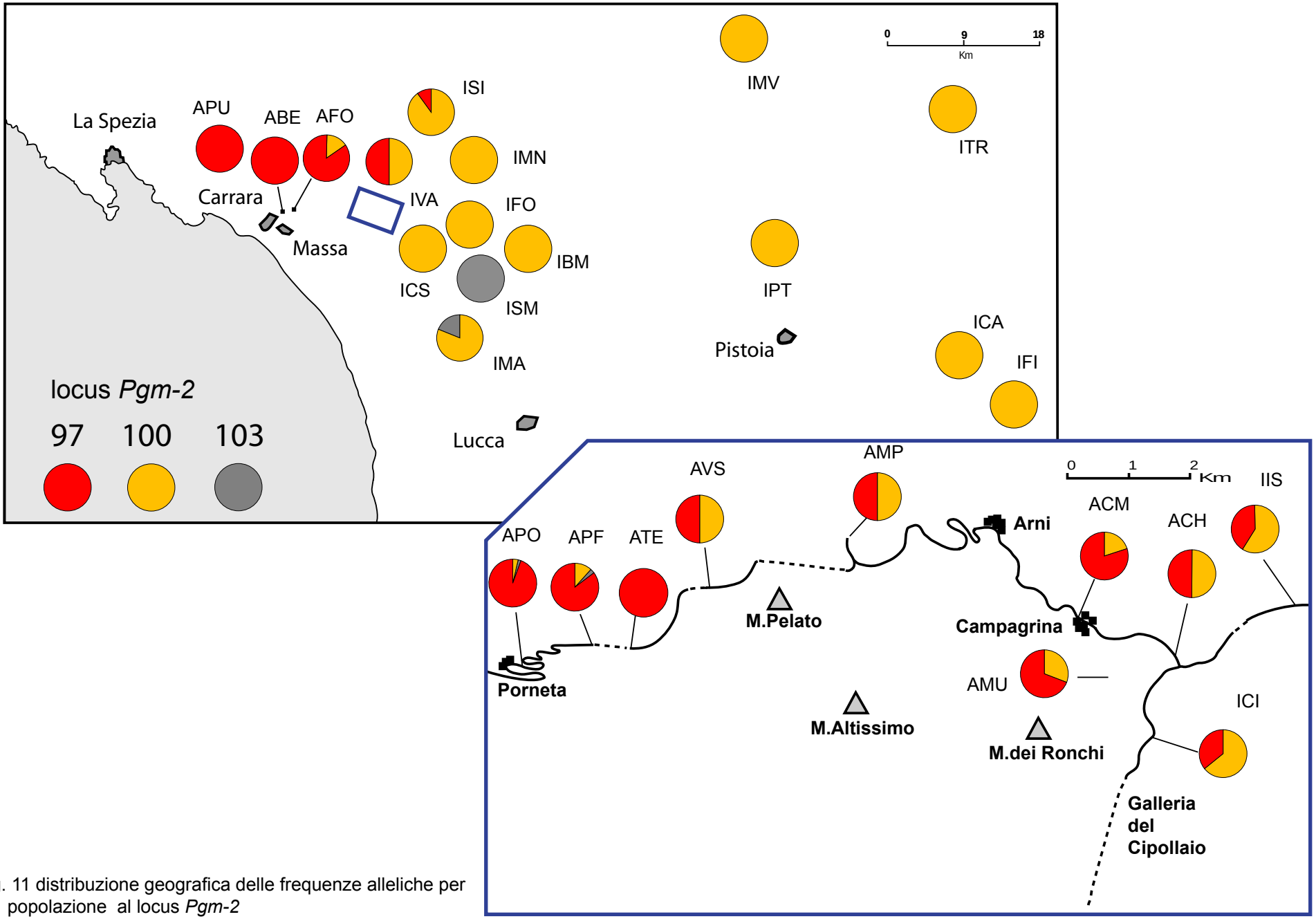


fig. 11 distribuzione geografica delle frequenze alleliche per popolazione al locus *Pgm-2*

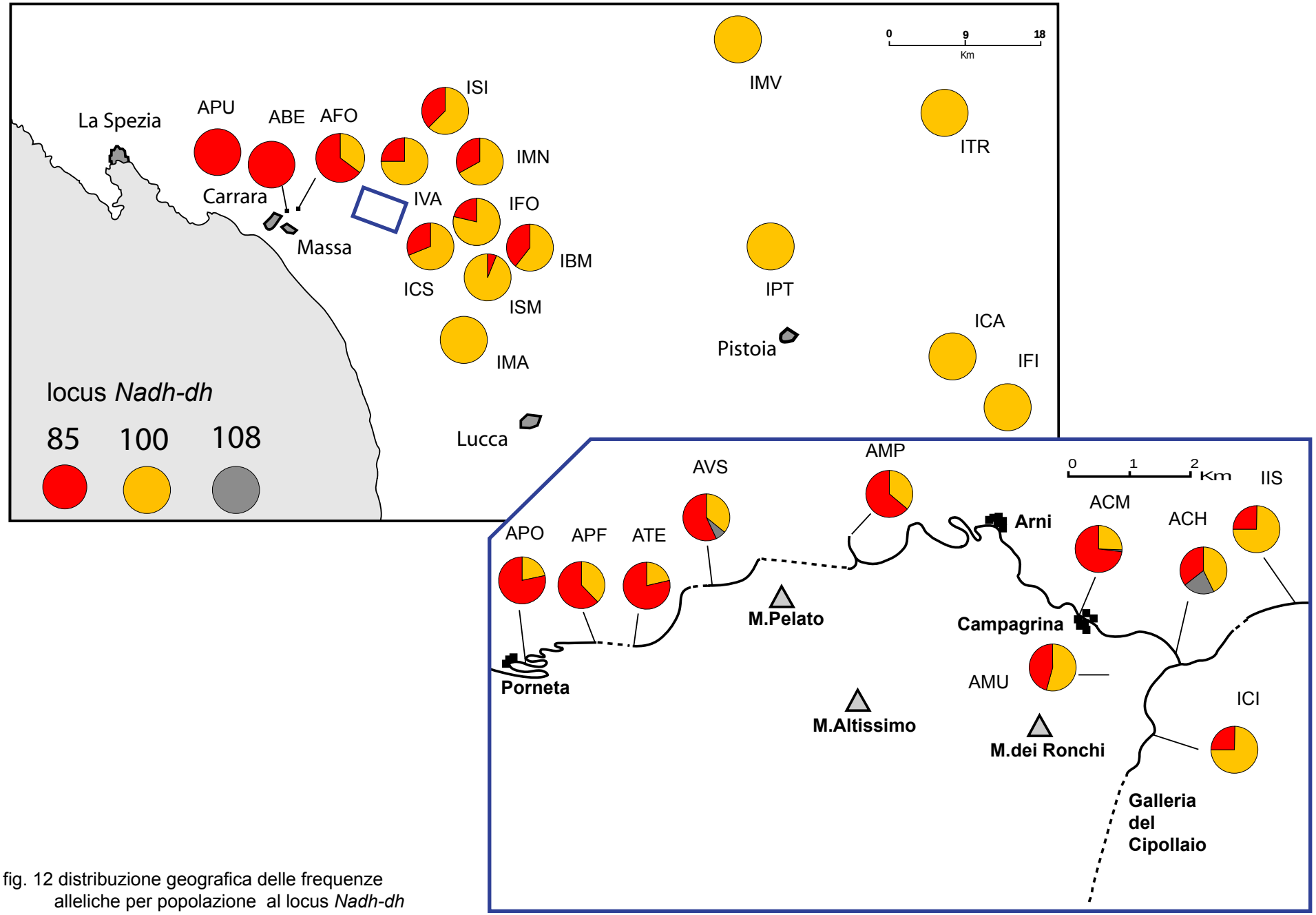


fig. 12 distribuzione geografica delle frequenze alleliche per popolazione al locus *Nadh-dh*

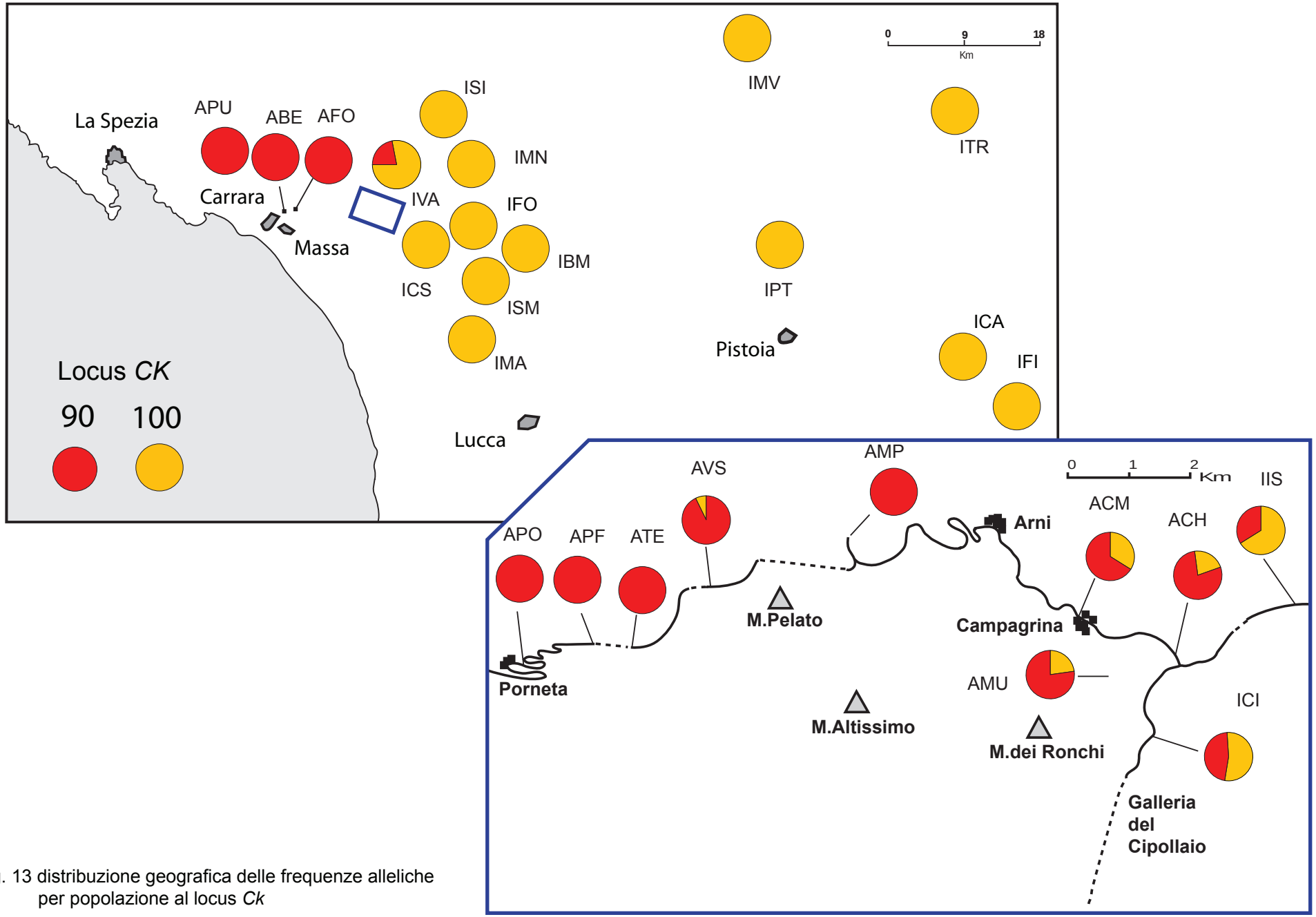


fig. 13 distribuzione geografica delle frequenze alleliche per popolazione al locus *Ck*

CK ^{90} è fissata in omozigosi a APU, ABE e AFO e anche in quattro delle popolazioni del transetto (APO, APF, ATE, AMP) mentre nelle restanti popolazioni del transetto la sua frequenza varia da un minimo di 66,2% (ACM) a 93% (AVS). Nelle popolazioni IIS e ICI la frequenza si abbassa al 35%-45% rispettivamente e non è presente nelle rimanenti popolazioni di *S. italicus* (eccetto ad IVA al 22%), in cui è fissata la variante alternativa *Ck* ^{100}. Quest'ultima penetra solo in quattro popolazioni di *S. a. bianchii* introgresse del transetto ma resta ad una frequenza che va da un minimo di 7,1% (AVS) ad un massimo del 33,8% (ACM). Si può affermare quindi che l'introgressione delle reciproche varianti alleliche delle due specie è limitata a poche popolazioni all'interno della zona di contatto.

Descrizione dell'ampiezza, centro, e del pattern di introgressione

E' possibile definire la collocazione geografica e l'ampiezza del fronte di contatto tra le due specie analizzando l'andamento delle frequenze alleliche lungo un transetto geografico. Per convenzione si stabilisce l'ampiezza di una zona di contatto considerando come estremi della zona stessa le popolazioni che presentano una frequenza media degli alleli delle due specie del 20% e 80% e viceversa (Endler 1977). Quindi dalla fig. 6 si può dedurre che la zona di contatto tra S. a. bianchii e S. italicus si estende da Bedizzano (ABE) in cui le frequenze sono 83% (contributo alleli *bianchii*) vs. 17% (contributo alleli *italicus*) ad IIS, ICI e IVA nel transetto, in cui le frequenze si invertono con valori pari a 21%-25% per gli alleli *bianchii* e 75%-79% per gli alleli *italicus*. L'ampiezza della zona è quindi abbastanza ristretta, una ventina di chilometri in linea d'aria. Questi "confini" sono confermati anche dai valori di variabilità genetica precedentemente descritti per le popolazioni di questa zona, che infatti risultano le più variabili a causa della coesistenza di alleli di entrambi i pool genici.

Il centro della zona è definito, sempre per convenzione (Endler 1977), come il punto in corrispondenza del quale si invertono, intorno ad un valore del 50%, i contributi medi delle varianti alleliche alternative dei loci discriminanti. Sempre dalla figura 6 si nota che nel transetto la popolazioni AMU, ACM e AMP hanno frequenze pari al 41%-59% mentre le stesse frequenze si invertono a 25% e 75% nelle popolazioni di IIS e ICI. La popolazione nel mezzo, ACH, presenta il 50% degli alleli delle due specie, pertanto si può collocare in corrispondenza di questa popolazione il centro della zona.

Le rimanenti popolazioni risentono di una più debole introgressione media a mano a mano che ci si allontana dalla zona contatto. Le code di introgressione sono comunque asimmetriche, risultando di scarsa entità per *S. a. bianchii* e di notevole estensione in *S. italicus*. Inoltre l'introgressione osservata per le popolazioni di *S. italicus* non è imputabile in eguale misura a tutti i loci discriminanti dato che, come già evidenziato, solo per alcuni di essi ritroviamo alleli *bianchii* in popolazioni *italicus* lontane dalla zona di contatto: *Me-2*, *Nadh* e *α-Gpdh,* che fra tutti mostrano i più alti livelli di introgressione. In particolare *Nadh* penetra nel pool genico di *S. italicus* fino a Firenze (IFI) e cioè a una sessantina di km di distanza dal fronte di contatto; mentre *Me-2* penetra per una ventina di chilometri sia a nord-est che ad est dalla zona di

contatto (fig.10). Anche il locus *α-Gpdh* presenta una elevata introgressione, sebbene l'andamento delle frequenze alleliche sembri meno lineare tra le popolazioni, con l'allele *bianchii* che penetra fino a ITR ad una settantina di km di distanza dal transetto.
Gli altri quattro loci hanno una scarsa (*Ldh-1*; *Ldh-2*; *Pgm-2*) o si può dire nulla (*Ck*) coda di introgressione, cioè la compresenza in misura variabile, nelle stesse popolazioni, di alleli alternativi delle due specie, è limitata solo alla zona di contatto o a qualche popolazione limitrofa (*Pgm-2*).

Indice di Ibridazione (*HI*) e analisi delle classi genotipiche per popolazione.

L'analisi dell' indice di ibridazione permette di quantificare il numero di alleli caratteristici di una o dell'altra specie nel genotipo dei singoli individui. Non essendo ammissibili "missing data", sono stati inclusi nell'analisi solo gli individui che presentavano genotipo completo ai sette loci discriminanti.
E' stato assegnato arbitrariamente il valore +1 ad ogni allele tipico di *S. a. ambrosii* e –1 ad ogni allele tipico di *S. italicus*. I valori di HI per ogni locus e per ogni individuo si sommano dando il valore di HI individuale (tab.10). E' stata effettuata poi la media ponderata per popolazione (vedi ad esempio Szymura & Barton 1986).
Si può notare l'andamento abbastanza regolare del pattern dalla figura dei valori medi dell'indice ibrido per popolazione (fig.14). Il passaggio da popolazioni "pure" di *S. a. bianchii*, che assumono il massimo valore di HI (14), a popolazioni "pure" di *S. italicus* (HI = -14), risulta avvenire in modo graduale. A mano a mano che ci si avvicina al centro della zona ibrida si assiste alla sempre maggiore coesistenza di alleli di entrambe le specie nei singoli genotipi, come testimonia l'indice di ibridazione vicino al valore zero. Quanto appena detto è meglio evidenziabile dalla fig.15 in cui è stata messa in evidenza la distribuzione geografica dei valori di HI per popolazione. Da notare come le popolazioni a maggior tasso di ibridazione/introgressione siano proprio in corrispondenza della zona di contatto, AMU, ACM, ACH, IIS, ICI e IVA.
Un discorso a parte meritano gli individui appartenenti alla classe "zero"; il valore zero può essere rappresentativo di individui con genotipo eterozigote a tutti i loci discriminanti, quindi individui F1 ovvero ibridi di prima generazione. Per ogni locus infatti il valore +1, attribuito all'allele *ambrosii*, viene compensato dal valore –1,

POP/HI	14	12	10	8	6	4	2	0	-2	-4	-6	-8	-10	-12	-14	TOT
APU	19															19
ABE	10	2	6													18
AFO	3	5	1													9
APO	3		5	9	3	5	1									26
APF		1	4	3	5	1	1									15
ATE					1											1
AVS				2	3		1	1								7
AMP			2		1											3
AMU				1	1	2	7	1	1							13
ACM			1	3	3	3	1	3	2	1	1					18
ACH					2		2		1	2						7
IIS								3		3			2			8
ICI							2	2	6	5	7	3	4			29
IMN														1		1
IVA				1				1				2	2	1		7
IFO												3	2	1	1	7
IBM												3	9	7	10	29
ISI														2		2
ICS												2	3	2	1	8
IMA												2	4			6
ISM											2	6				8
IMV														2	2	4
ITR														2		2
IPT													1	2	6	9
ICA														3	8	11
IFI														3	14	17
IMR															10	10
IFR															4	4
ITO															4	4
ISA															5	5
IAQ															4	4

Tab. 10: numero di individui per popolazione che ricadono nella classe di indice ibrido (HI) osservata.

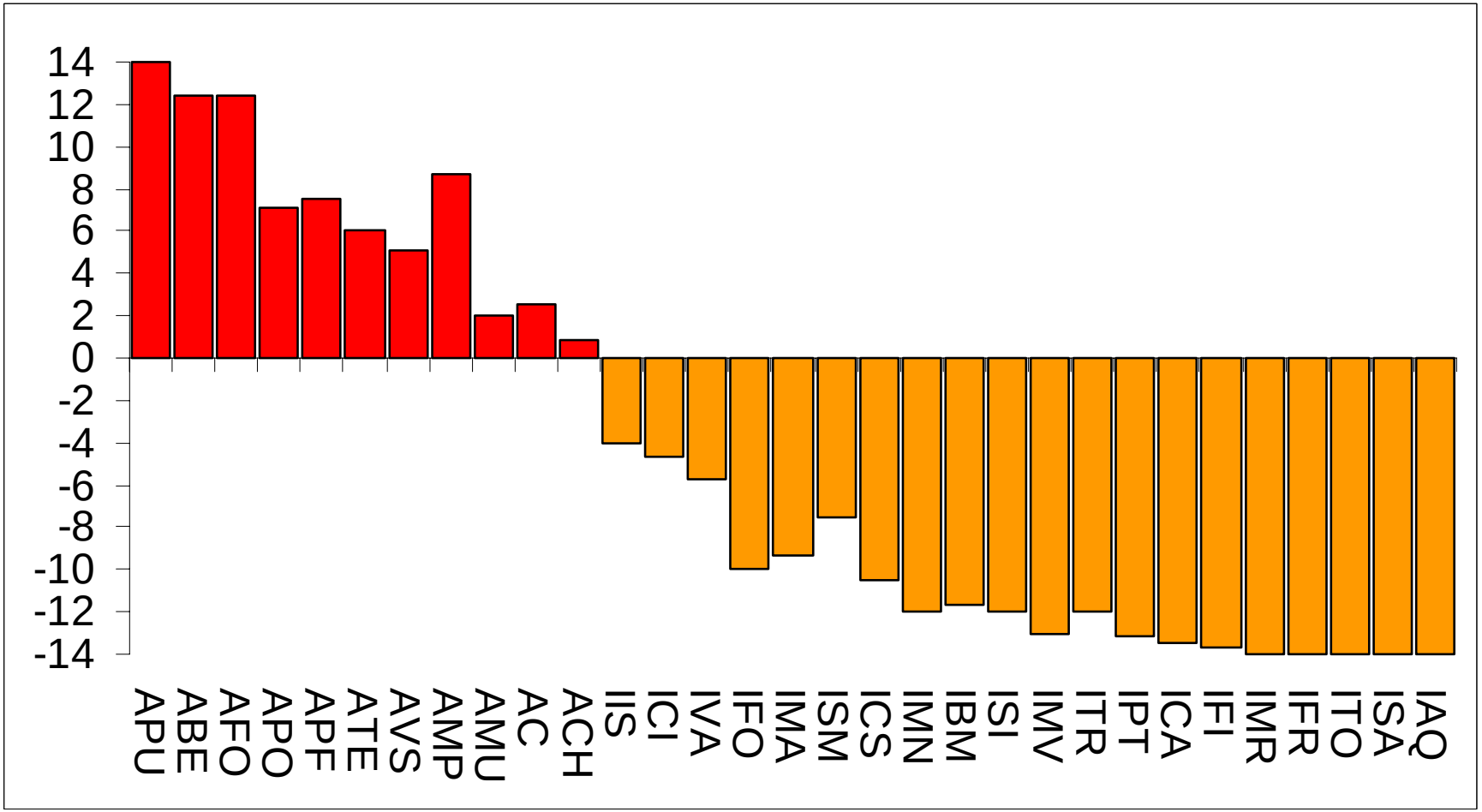


Fig. 14 valori di indice ibrido medio (HI) per popolazione

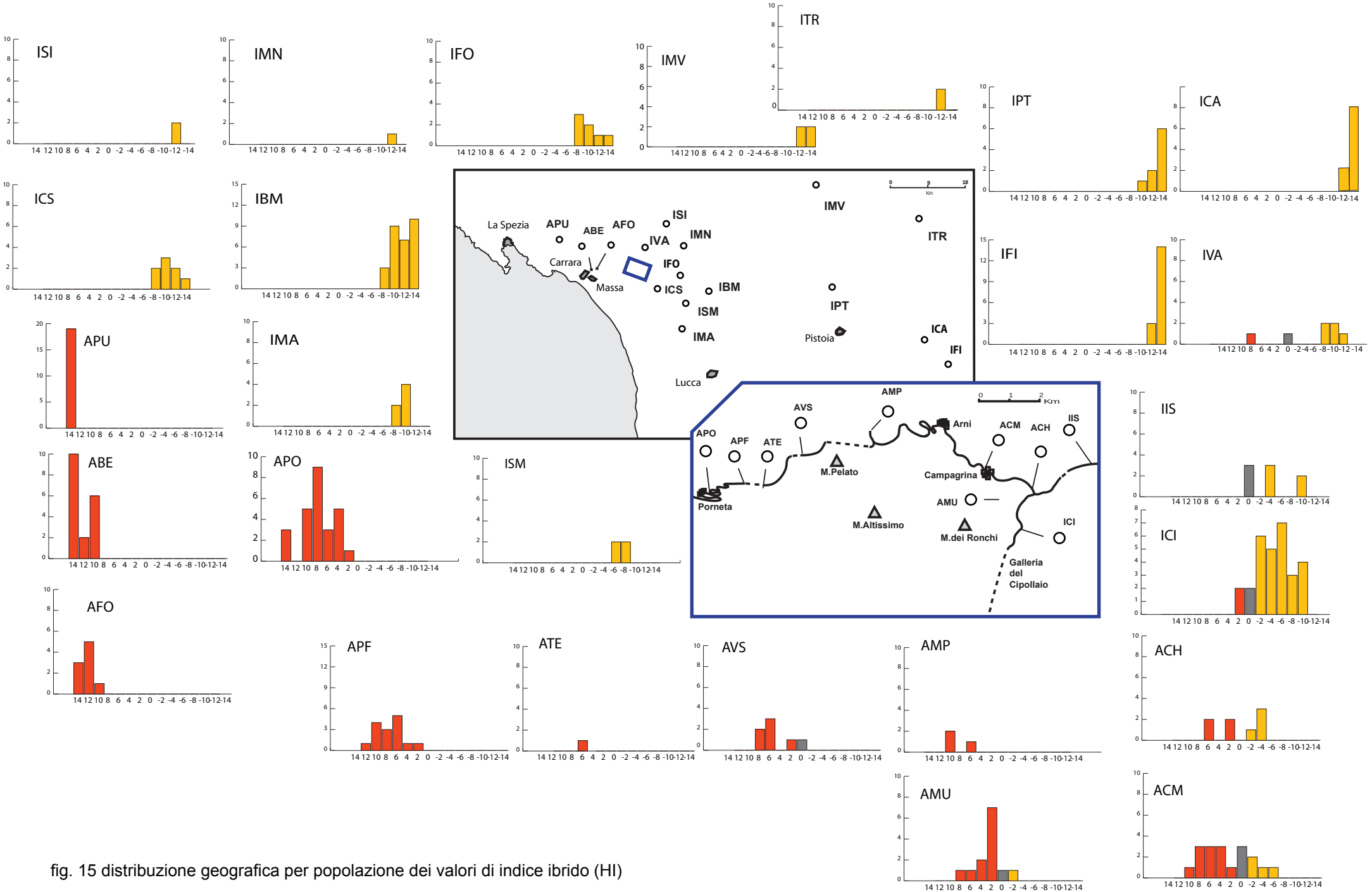


fig. 15 distribuzione geografica per popolazione dei valori di indice ibrido (HI)

attribuito all'allele *italicus*, cosicché la somma risulta zero. Nelle popolazioni del centro della zona di contatto e maggiormente introgresse (transetto) sono presenti, in numero limitato, individui con indice d'ibridazione uguale a zero (AVS, AMU, ACM, ICI, IIS e IVA). Essi però non rappresentano ibridi di F1 in quanto non sono eterozigoti a tutti i loci differenziati ma, per uno stesso individuo, i loci con genotipo omozigote *bianchii* vengono perfettamente eguagliati dai loci con genotipo *italicus,* dando come somma zero. Questo risultato è spiegabile in quanto l'introgressione per i sette loci discriminanti che caratterizza le popolazioni comprese nella zona ibrida, e in particolare quelle del centro, presentano pool genici più fortemente ibridi, caratterizzati quindi dalla coesistenza degli alleli delle due specie venute in contatto. Questo risultato è coerente con quanto ritrovato, sempre per queste popolazioni, per i parametri di variabilità genetica, tra i più alti, e distanza genetica, in quanto queste popolazioni si collocano ad una distanza intermedia tra le due specie nell'UPGMA (fig. 3,4).

E' degno di nota sottolineare il fatto che dall'analisi dell'indice ibrido emerge la completa assenza in tutte le popolazioni studiate di individui ibridi di prima generazione assieme all'assenza di individui parentali di una specie o dell'altra nelle popolazioni più introgresse appartenenti al centro della zona di contatto. Scendendo verso sud-sud-est, all'interno dell'areale di *S.italicus*, si può notare come sia graduale la diminuzione degli alleli di *S. a. bianchii* nelle popolazioni di *S. italicus* a mano a mano che ci si allontana dalla zona di contatto; lo stesso vale per le popolazioni introgresse di *S. a. bianchii* a mano a mano che ci si allontana dal transetto. Dalla fig.15 si conferma chiaramente l'assenza di sintopia in tutte le popolazioni studiate, cioè non è mai stata riscontrata la presenza di individui con genotipi parentali puri di entrambe le specie all'interno della stessa popolazione.

Dalla distribuzione delle classi di HI in tutte le popolazioni studiate si evidenzia come le popolazioni di *S. a. bianchii* introgresse presentino genotipi intermedi simili alla specie pura e la stessa cosa è riscontrabile per le popolazioni di *S. italicus* introgresse. Solo le popolazioni del centro della zona sono caratterizzate dalla presenza di genotipi fortemente ricombinanti simili ad una specie o all'altra in misura uguale, per esempio ad ICI. In pratica nonostante la presenza di ibridazione ed introgressione i due pool genici rimangono abbastanza ben separati non appena ci si allontana dal centro della zona di contatto.

La valutazione qualitativa delle classi genotipiche in cui sono suddivisi gli individui nelle singole popolazioni è stata possibile grazie al software New Hybrid (Anderson & Thompson 2002). In tab.11 sono riassunte per ogni popolazione le probabilità di assegnazione a posteriori degli individui a determinate classi genotipiche. Sono indicate nella prima colonna la percentuale degli individui che presentano la probabilità massima di appartenere a una determinata classe genotipica, nella colonna a fianco è indicata la probabilità di assegnazione a posteriori (P) media alla relativa classe e la rispettiva deviazione standard (SD). In questo caso non sono state mostrate le probabilità di assegnazione a posteriori riferite alle altre classi genotipiche testate e cioè F1, Bx1, Bx2, Bx3, Bx4, perché non c'erano individui che presentavano i requisiti coerenti con il criterio di rappresentazione, cioè probabilità massima di assegnazione riferita a queste classi. Inoltre non è stato trovato nemmeno un individuo assegnato alla classe F1, anche con probabilità trascurabili, in accordo con quanto precedentemente illustrato in relazione all'indice ibrido.

Se confrontiamo il dato prodotto da New Hybrid con le frequenze alleliche medie e l'indice di ibridazione, salta subito agli occhi che la popolazione pura di *S. a. bianchii* (APU) e quelle debolmente introgresse (ABE e AFO), presentano il 100% degli individui con una probabilità che va dal 96% al 98% di essere attribuiti a *S. a. bianchii* appunto, con APU che presenta ovviamente il valore massimo, cioè 98%, e la SD minore (fig.16). Per le popolazioni occidentali nella zona di contatto (APO, APF, ATE e AVS), che risultano fortemente introgresse dalle frequenze medie, la situazione non è molto diversa, in quanto il 100%, eccetto APO (93%), degli individui presentano una probabilità massima di essere attribuiti *S. a. bianchii* relativamente alta dal 92% al 95% (fig.17). L'indice di introgressione di alleli *italicus* (I_{it}) è infatti abbastanza basso non superando il 14% (AVS).

Dai genotipi sappiamo però che gli individui della zona di contatto e ibridazione e anche quelli appartenenti alle popolazioni di *S. italicus* introgresse non sono comunque individui "puri". Il software New Hybrid tende ad assegnare con un'alta probabilità alla specie pura corrispondente, individui che sono dei backcrosses avanzati di n-generazioni (Bx), in quanto le frequenze alleliche delle rispettive classi genotipiche tendono ad assumere valori simili. L'assegnazione alla classe F2 non è univoca, nel senso che il software New Hybrid non considera sei loci discriminanti un numero sufficiente per distinguere con facilità gli individui F2 rispetto ai backcrosses (Bx) di prima, seconda, terza o quarta generazione, soprattutto se i Bx sono più

popolazione	specie *a. bianchii*		specie *italicus*		Fn		I_{it} (SD)	I_a (SD)
	%	P (SD)	%	P (SD)	%	P (SD)		
APU	100%	0,98 (0,003)					1% (0,00)	
ABE	100%	0,97 (0,033)					2,8% (0,03)	
AFO	100%	0,96 (0,076)					4,4 (0,07)	
APO	93,3%	0,93 (0,106)			6,7%	0,39 (0,087)	11,3 (0,17)	
APF	100%	0,92 (0,111)					8,5% (0,11)	
ATE	100%	0,95 (0,035)					5,5 % (0,03)	
AVS	100%	0,92 (0,099)					14,3 % (0,23)	
AMP	67%	0,92 (0,085)			33%	0,33 (0,165)	21,1 (0,277)	
AMU	100%	0,85 (0,147)					52,96% (0,44)	
ACM	61%	0,81 (0,137)			39%	0,73 (0,202)	19,23% (0,37)	
ACH	58%	0,85 (0,11)			43%	0,96 (0,00)	22% (0,11)	
IIS			25%	98% (0,00)	75%	0,82 (0,19)		71% (0,45)
ICI	10%	0,61(0,11)	20%	84% (0,15)	70%	0,91 (0,08)		80% (0,34)
IVA	17%	0,93 (np)	29%	81% (0,20)	44%	0,90 (0,07)		70% (0,40)
ISI			100%	98% (0,02)				2,2% (0,03)
IMN			100%	99%				–
IFO			100%	0,92 (0,078)				8,1 % (0,078)
IBM			100%	0,98 (0,027)				2,9% (0,028)
ICS			100%	0,97 (0,020)				3% (0,021)
IMA			100%	0,95 (0,046)				4,6% (0,045)
ISM			100%	0,81 (0,119)				18,8 % (0,118)
IPT			100%	0,99 (0,006)				1,1 % (0,006)
ICA			100%	0,98 (0,005)				1 % (0,006)
IFI			100%	0,99 (0,005)				1% (0,005)
ITR			100%	0,98 (0,009)				1,7 % (0,009)

Tab. 11.% di individui per popolazione con una data probabilità di assegnazione a posteriori (P) e relativa deviazione standard (SD). I_{it} e I_b: introgressione di alleli *italicus* e *bianchii*

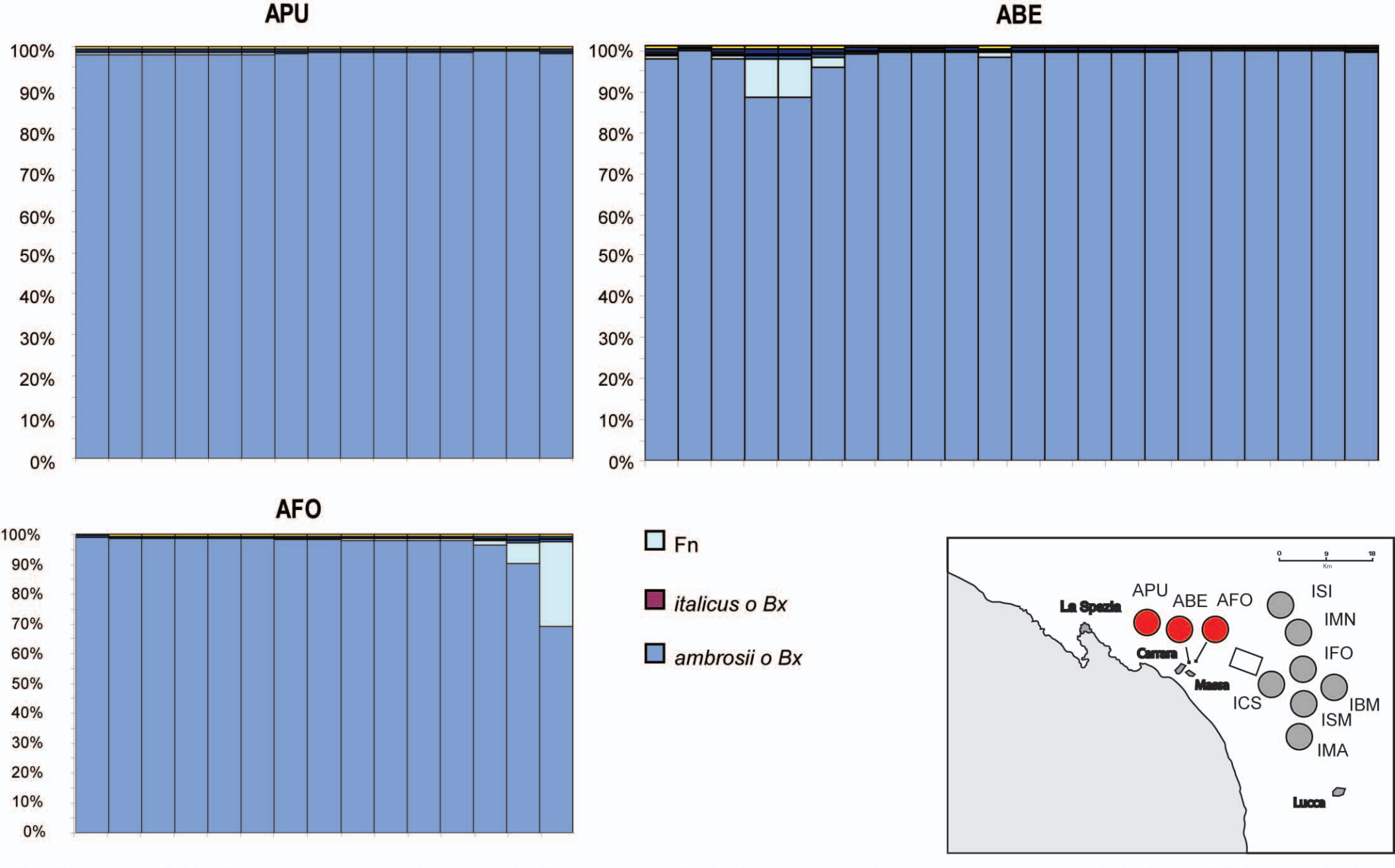


fig. 16 Classi genotipiche di assegnazione a posteriori. Fn: individui fortemente ibridi, Bx: backcrosses avanzati di ennesima generazione o individui puri di *italicus* o *ambrosii*. Ogni istogramma rappresenta un individuo a cui è assegnata la probabilità (%) a posteriori.

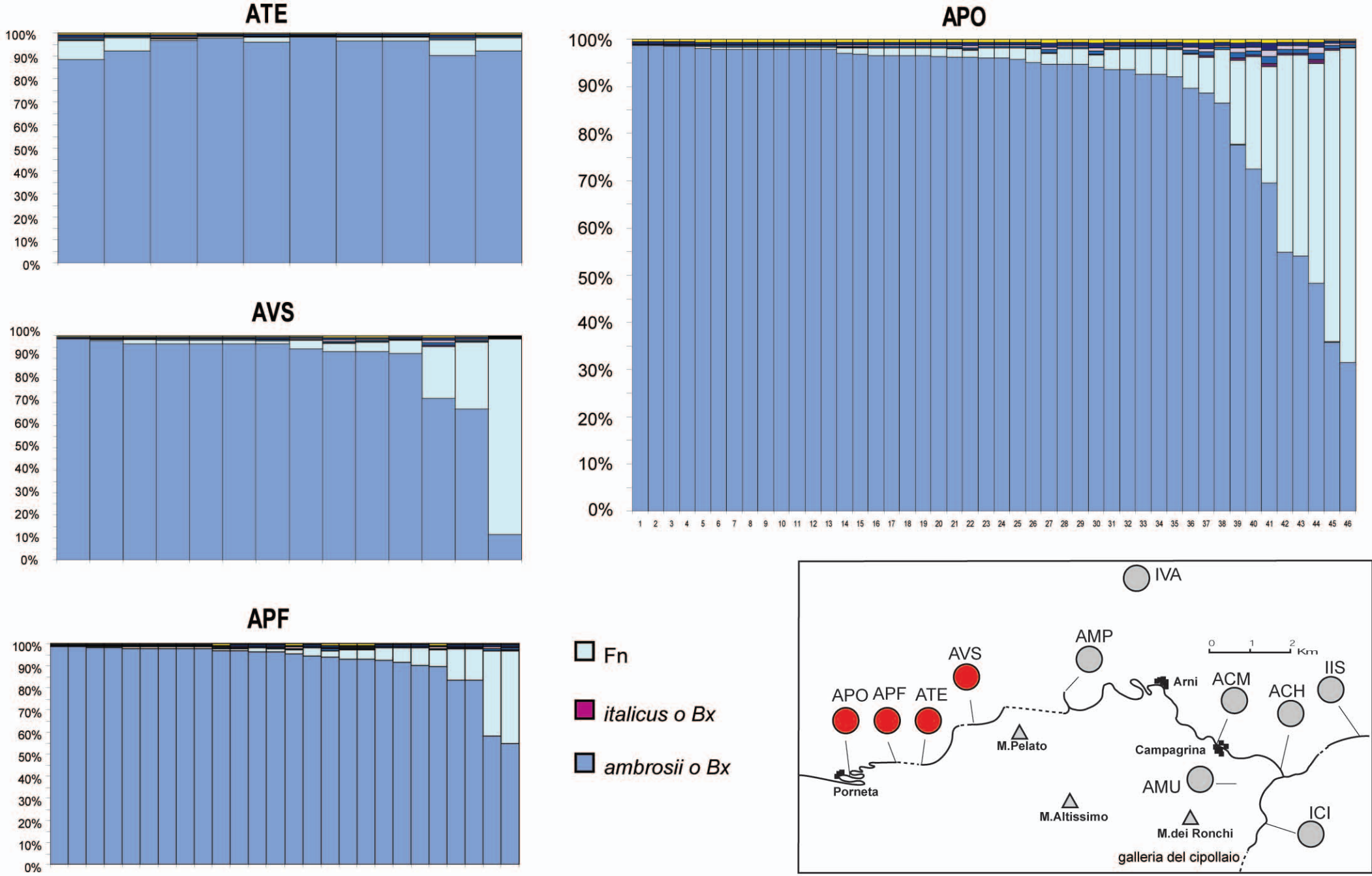


fig. 17 Classi genotipiche di assegnazione a posteriori. Fn: individui fortemente ibridi, Bx: backcrosses avanzati di ennesima generazione o individui puri di *italicus* o *ambrosii.* Ogni istogramma rappresenta un individuo a cui è assegnata la probabilità (%) a posteriori

avanzati della quarta generazione; il software richiederebbe infatti un numero molto maggiore di dati in termini di loci discriminanti (Anderson & Thompson 2002) e quindi gli individui assegnati come F2 sono individui altamente ricombinanti non attribuibili né a Bx con *bianchii* né con *italicus,* e saranno indicati come F_n. Nonostante queste limitazioni l'applicazione di New Hybrid conferma che gli individui della zona di contatto e ibridazione sono con molta probabilità tutti individui fortemente ibridi (F_n) o Bx avanzati, in accordo con tutte le caratteristiche della zona di contatto evidenziate finora come l'andamento dell'indice ibrido e l'assenza di F1 e parentali nella zona di contatto vera e propria.

Dai risultati precedenti (frequenze alleliche, variabilità genetica e differenziamento genetico) era emerso che il centro della zona di contatto si trova in corrispondenza della popolazione ACH e le popolazioni AMP, AMU, ACM sono le più vicine ad ovest. Queste ultime (fig.18) presentano dal 61% al 100% degli individui con una P ancora alta (tra 85% e 92%) di attribuzione a Bx di "*ambrosii"* e il 33% (AMP) e 39% (ACM) degli individui con P inferiore, variabile tra 33% e 73% rispettivamente, di essere fortemente ibride (F_n). Questo si spiega in termini di una maggiore introgressione di alleli *italicus* infatti I_{it}, l'indice di introgressione di alleli *italicus* aumenta considerevolmente, dal 19% al 52%. Queste popolazioni adiacenti al fronte di contatto sono verosimilmente di derivazione *S. a. bianchii* ma risentono di una forte introgressione che fa aumentare la percentuale di individui fortemente ibridi (F_n). Anche la popolazione ACH, che dalle frequenze alleliche medie presenta uguale apporto di alleli di entrambe le specie, risulta infatti molto introgressa con una percentuale di individui fortemente ibridi che arriva al 43%. La restante parte della popolazione, purtroppo solo quattro individui, è costituita da Bx con *S a. bianchii* con probabilità a posteriori pari a 85%*.* Nell'indice di ibridazione infatti (fig.15), quattro individui appartengono a classi di indice ibrido a prevalenza di alleli *bianchii* (classi 2 e 6) e tre a classi fortemente introgresse da *italicus* (classi -2 e -4). L'apparente discrepanza tra i valori delle classi di indice ibrido e delle classi genotipiche è spiegabile dal fatto che, mentre l'indice ibrido è una semplice somma di alleli di una specie e dell'altra per uno stesso individuo, quindi si basa su un criterio di presenza e assenza, il test di assegnazione relaziona mediante un algoritmo i genotipi individuali con le frequenze delle classi genotipiche attese secondo le leggi mendeliane di segregazione indipendente dei geni.

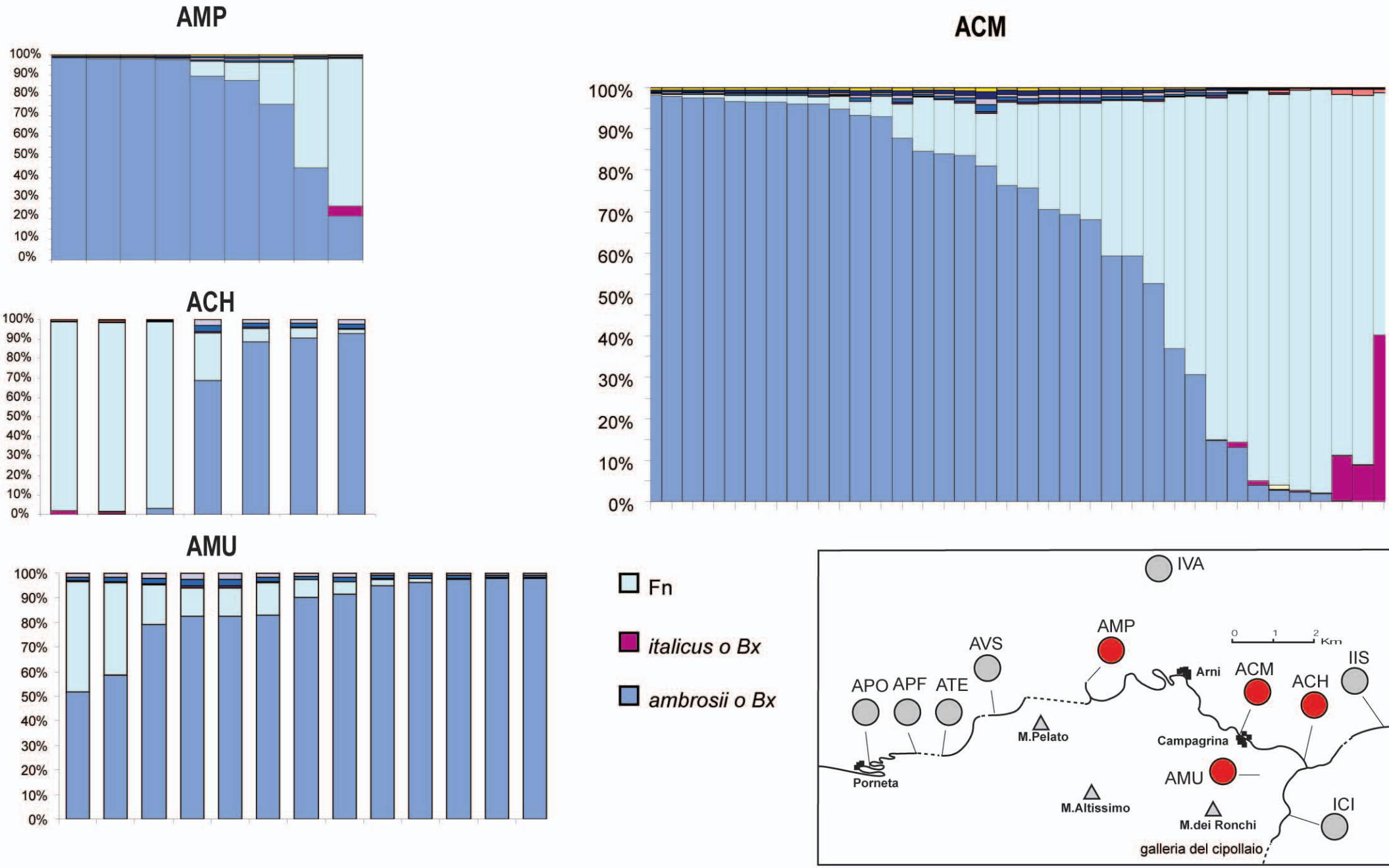


fig. 18 Classi genotipiche di assegnazione a posteriori. Fn: individui forte mente ibridi, Bx: backcrosses avanzati di ennesima generazione o individui puri di *italicus* o *ambrosii*. Ogni istogramma rappresenta un individuo a cui è assegnata la probabilità (%) a posteriori.

Le popolazioni del fronte di contatto ICI e IVA sono le uniche in cui sono rappresentate tutte e tre le classi genotipiche (Bx delle rispettive specie e individui fortemente ibridi indicati come F_n) (fig.19). Il 10% a ICI e il 17% degli individui di IVA, e zero ad IIS, quindi una percentuale nulla o bassa degli individui rispetto al totale della popolazione, hanno una probabilità massima del 61% o 93% di essere attribuiti a Bx di "*ambrosii*" rispettivamente. Invece la maggior parte degli individui, dal 44% al 75%, hanno probabilità abbastanza alte di appartenere alla classe fortemente ibrida di F_n, dall' 82% al 91%. Infine ad IVA, ICI e IIS una percentuale bassa degli individui, dal 20% al 29%, presentano una P abbastanza alta (81-98%) di appartenere alla classe di Bx di *S. italicus.* L'assegnazione alla classe F_n in questo caso denota come questi genotipi siano fortemente ibridi, risultato in accordo con la localizzazione di queste popolazioni sul fronte di contatto con *S. a. bianchii*. E' quindi evidente che il "mixing" maggiore si è avuto proprio in queste tre popolazioni per cui l'indice di introgressione (I_b) è infatti molto elevato, dal 70% all' 80%.

Le popolazioni di *S. italicus* fortemente e debolmente introgresse (fig.20), presentano tutti gli individui assegnati a *S. italicus*, oppure a classi di Bx di *italicus* dopo parecchie generazioni, con P abbastanza alte (da 81% a 99%). I valori di introgressione di alleli *bianchii* sono variabili (tab.11), e vanno dal 3% (ICS) al 18,8% (ISM) e calano bruscamente intorno all' 1%-2% nelle popolazioni debolmente introgresse (IPT, ICA, IFI e ITR). Le popolazioni di *S. italicus* pure più meridionali hanno tutte una probabilità di assegnazione massima (P> 99%) alla classe di *S. italicus* puro, come è evidente dai genotipi individuali omozigoti per gli alleli *italicus* a tutti i loci.

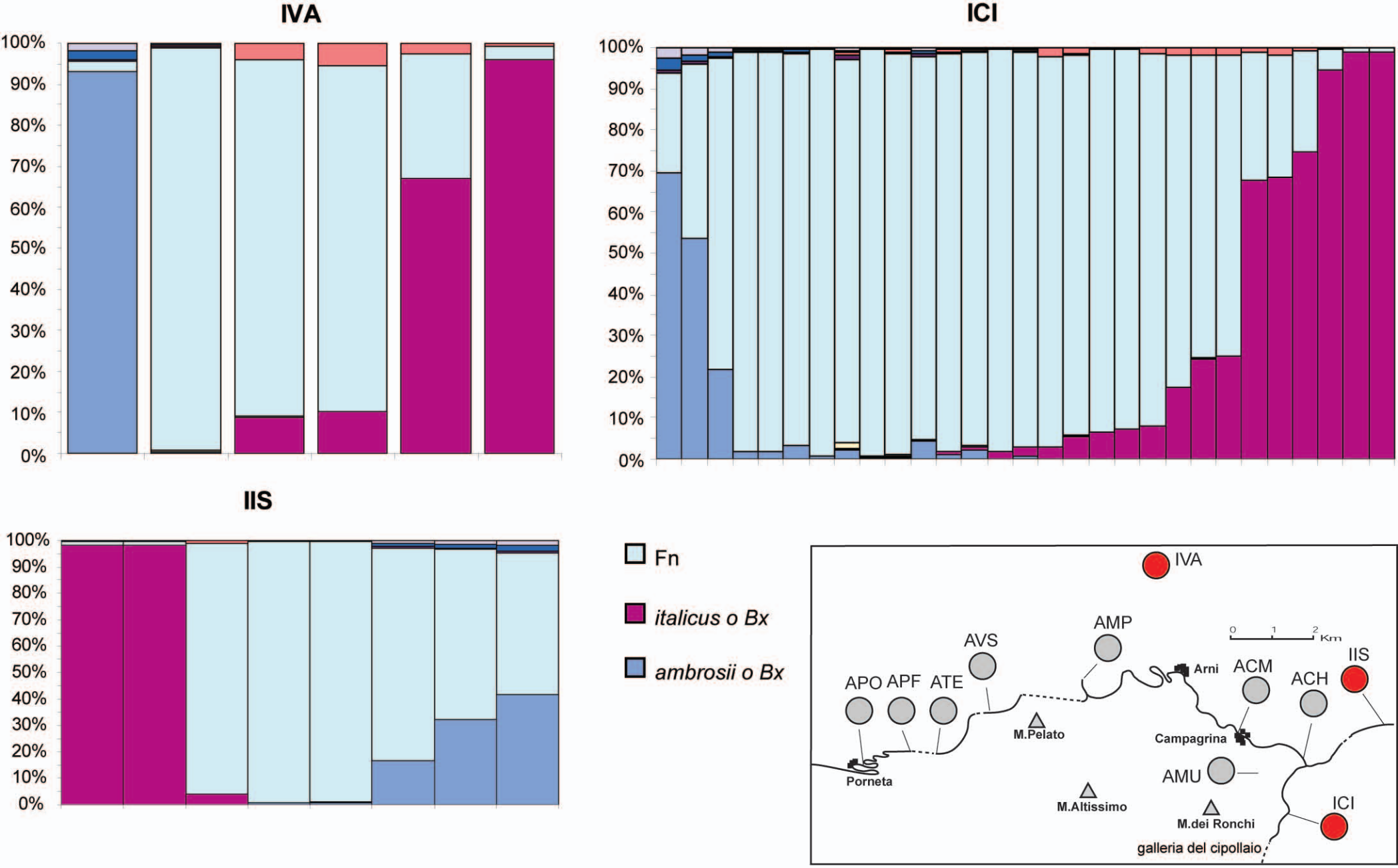


fig. 19 Classi genotipiche di assegnazione a posteriori. Fn: individui fortemente ibridi, Bx: backcrosses avanzati di ennesima generazione o individui puri di *italicus* o *ambrosii*. Ogni istogramma rappresenta un individuo a cui è assegnata la probabilità (%) a posteriori.

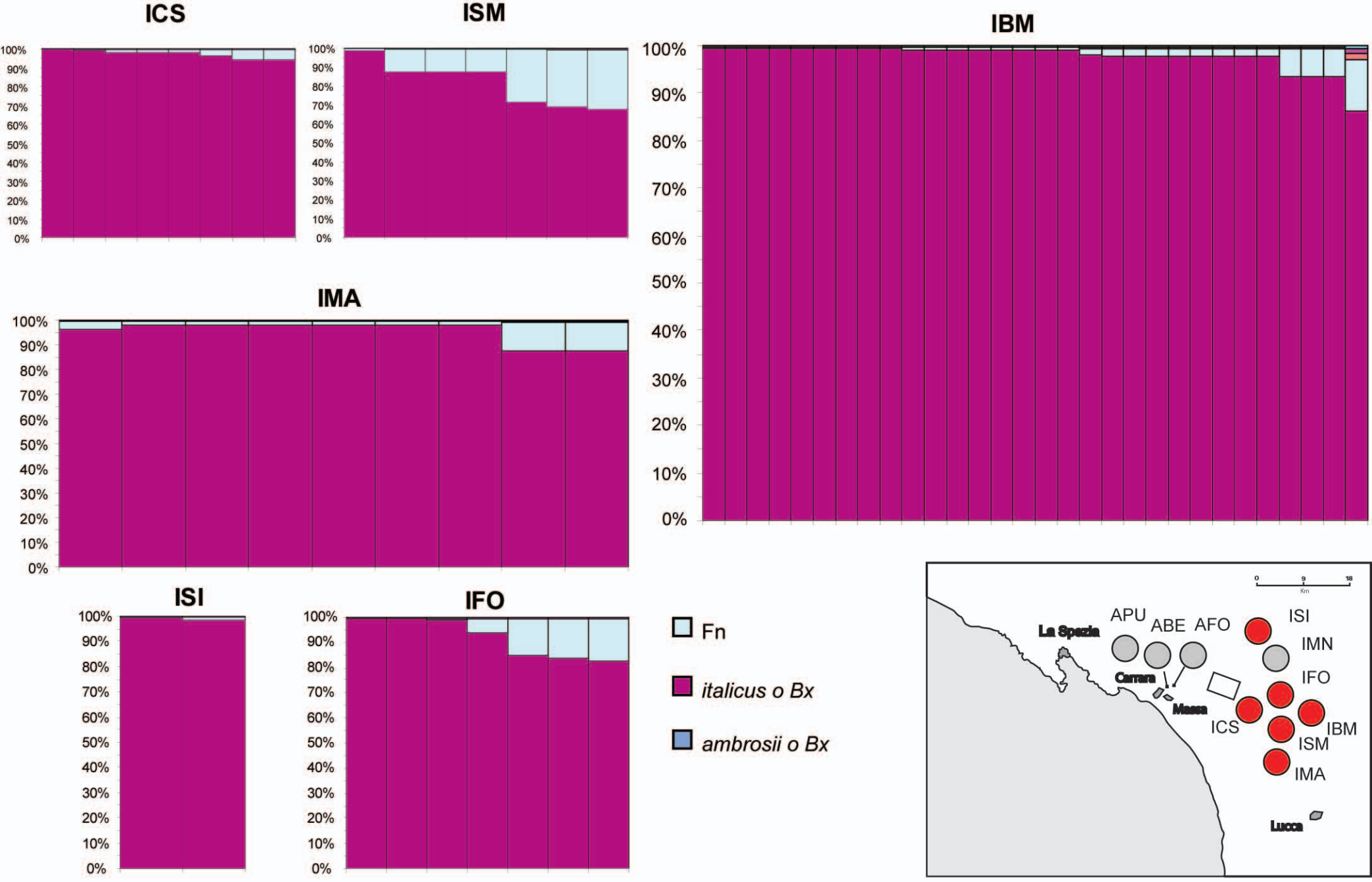


fig. 20 Classi genotipiche di assegnazione a posteriori. Fn: individui fortemente ibridi, Bx: backcrosses avanzati di ennesima generazione o individui puri di *italicus* o *ambrosii*. Ogni istogramma rappresenta un individuo a cui è assegnata la probabilità (%) a posteriori.

4.2 Analisi della regione mitocondriale citocromo b

4.2.1 RFLP

Sono stati analizzati 300 individui mediante RFLP appartenenti a 36 popolazioni su 38 totali. I pattern di digestione ottenuti, rappresentati nella tabella sottostante, hanno dato origine a sei aplotipi.

HaeIII	SSPI	RsaI	MboI	aplotipi
B	C	A	A	**AP 1**
B	C	A	B	**AP 2**
B	D	A	B	**AP 3**
A	A	A	A	**H 1**
A	C	A	A	**H 2**
B	B	B	B	**AA 1**

Il numero di individui per ciascun aplotipo in ogni popolazione, è variabile da parecchie decine, come ad esempio ad ICI e IIS, a poche unità soprattutto all'interno di *S. italicus*, in cui per alcune popolazioni non è stato possibile analizzare più di un esemplare (AMU, ICA, IMN) (tab.12). Questo sembra non aver influito in modo significativo sui risultati ottenuti che mostrano una certa coerenza tra gruppi di popolazioni, andiamo a descrivere in dettaglio la distribuzione geografica degli aplotipi.

Dalla fig.21, si può subito notare come gli aplotipi RFLP siano efficaci nel discriminare la specie pura di *S. ambrosii bianchii* (APU), che presenta un aplotipo caratteristico (AP1), e *S. italicus* sia puro che a vari gradi di introgressione, che presenta l'aplotipo (H1) in tutto il suo areale di distribuzione. Nella zona di contatto, che va da AFO ad ICI, comprendendo tutte le popolazioni del transetto, la situazione è particolare.

A partire da AFO compare un aplotipo (AP3), qui a frequenza del 40% ma solo in cinque esemplari su undici, che risulta caratteristico di quasi tutte le popolazioni della zona di contatto, soprattutto di *S. a. bianchii* fortemente introgresse.

POP/APL	AA1	AP1	AP2	AP3	H1	H2	totale
ASN	5						5
ABR	6						6
API	4						4
AGI	2						2
ARG	9						9
APU		31					31
ABE		10					10
AFO			6	5			11
APO				23			23
APF				6			6
ATE				9			9
AVS				12			12
AMP				14			14
AMU				1			1
ACM				16			16
ACH				4			4
ICI						42	42
IIS				22	2		24
IVA				3			3
IMN					1		1
ISI					3		3
IFO					3		3
IBM					9		9
ICS					6		6
IMA					1		1
ITR					6		6
IFI					2		2
IPT					12		12
ICA					1		1
IMV					3		3
IMR					6		6
ITO					3		3
IGM					4		4
ISA					3		3
IAQ					3		3
IFR					2		2

Tab. 12: numero di individui che presentano ciascuno dei sei aplotipi (RFLP) osservati in ogni popolazione

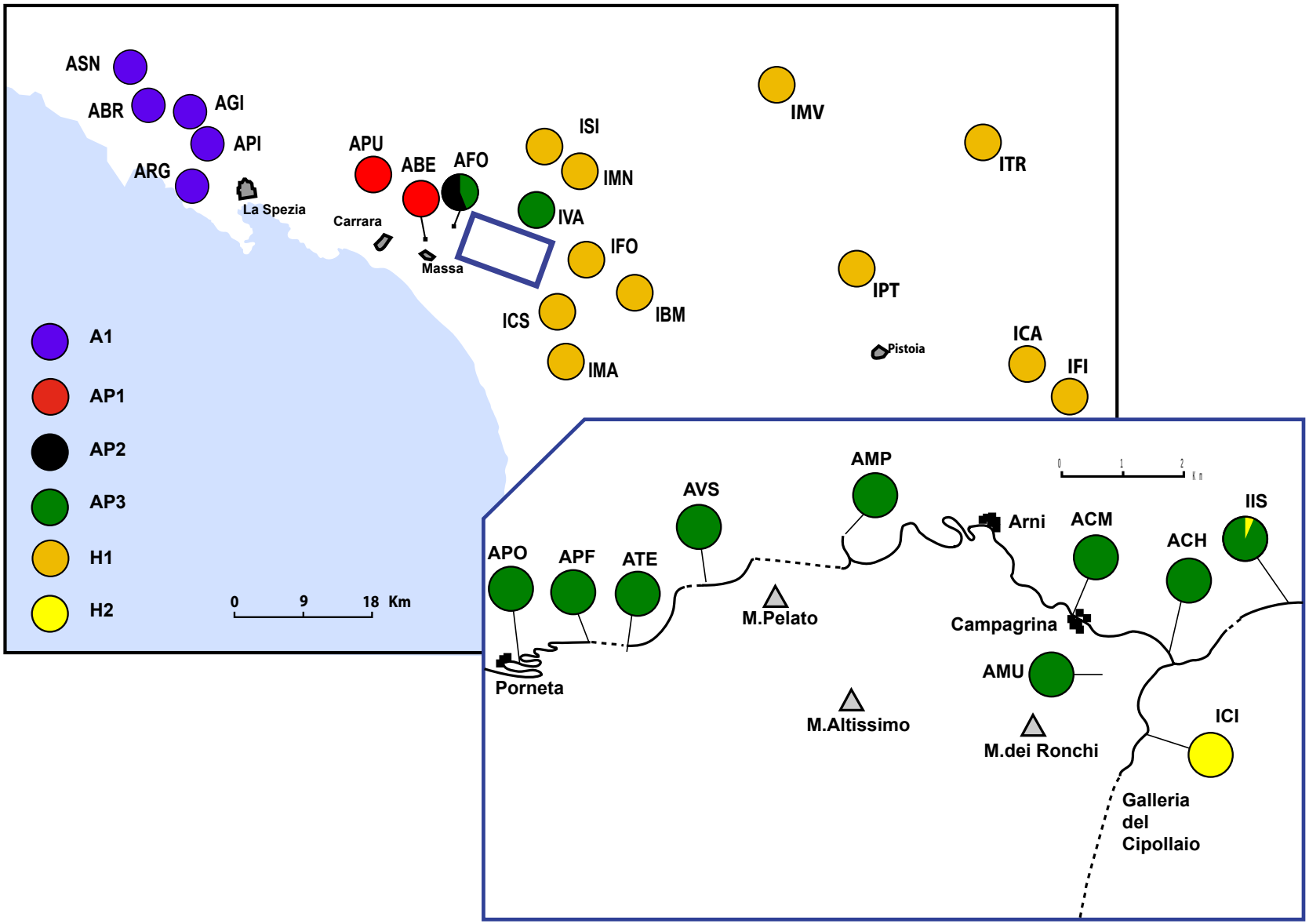


fig. 21 distribuzione geografica degli aplotipi RFLP

La situazione cambia alla volta del centro della zona di contatto e ibridazione. Le popolazioni di IIS, ICI e IVA, che si trovano nel fronte di contatto tra le due entità, sulla base dell'analisi degli allozimi, mostrano infatti un'inversione brusca di tendenza. Nelle popolazioni di *S. italicus* IIS e IVA è pressoché fissato l'aplotipo (AP3), mentre la popolazione di ICI presenta un suo caratteristico aplotipo (H2). E' riscontrabile una scarsissima, pressoché nulla, compresenza nella stessa popolazione degli aplotipi trovati, eccetto che ad IIS in cui su un totale di 42 individui "digeriti" con enzimi di restrizione, due sono risultati avere l'aplotipo (H2) tipico di ICI. Questo risultato esclude problemi legati al campionamento dato l'elevato numero di individui saggiati sia a IIS che a ICI. Da notare l'omogeneità che evidenzia il marcatore RFLP in *S. italicus*, all'interno del suo areale tra l'altro molto più vasto rispetto a quello di *S. a. bianchii*. Mentre all'interno di *S. a. bianchii* è rimarcabile una struttura genetica più frammentata e differenziata a vari gradi. Infatti basti notare che la popolazione AFO, sita a qualche km da APU e ABE, presenta due aplotipi, uno suo caratteristico (AP2) e l'altro (AP3) che invece si diffonde per una decina di chilometri nella zona di contatto appunto.

Bisogna ricordare che gli RFLP presentano l'indubbio vantaggio di essere economici e quindi è possibile saggiar un numero elevato di individui e per questo vengono utilizzati per un primo screening che rilevi un differenziamento genetico delle popolazioni, con lo scopo di discriminare i vari taxa anche su larga scala; e questo risultato è stato infatti ottenuto. Tuttavia gli enzimi di restrizione sottostimano la variabilità genetica in quanto rilevano mutazioni tra individui solo in prossimità di porzioni discrete del DNA mitocondriale e cioè in corrispondenza dei siti di restrizione, tralasciando di dare informazione sulla restante parte della sequenza amplificata. Infatti non sono emersi differenziamenti statisticamente significativi tra i vari aplotipi RFLP in termini di diversità aplotipica, sebbene gli stessi riescano a discriminare tra le due entità venute in contatto. Quindi sono state ottenute le sequenze complete della porzione di citocromo-b precedentemente analizzata con gli RFLP con un duplice scopo. Da una parte verificare i pattern di digestione trovati e rilevati visivamente dalla corsa elettroforetica dei frammenti di digestione, e dall'altra con lo scopo più ampio di indagare su scala più fine la struttura genetica della zona di contatto, soprattutto per evidenziare all'interno delle popolazioni appartenenti ai rispettivi gruppi, un maggior differenziamento genetico.

4.2.2 Diversità nucleotidica e aplotipica

All'interno del genere *Speleomantes* e precisamente nelle popolazioni di *S. ambrosii ambrosii*, S. *ambrosii bianchii*, *S. italicus* e popolazioni della zona di contatto tra S*. italicus* e S. *a. bianchii*, sono state ottenute 162 sequenze il cui numero per popolazione è variabile così come riscontrato per gli aplotipi RFLP (tab.13).
Queste 162 sequenze corrispondono a venti aplotipi con il marcatore citocromo b.
Nel genere *Speleomantes* in riferimento alle specie studiate, le posizioni nucleotidiche studiate sono 838, corrispondenti a 261 codoni aminoacidici. I siti variabili dell'ingroup sono 75 (App. 3).
I siti polimorfici informativi per la parsimonia sono 55 (App. 4). Il rapporto empirico stimato medio tra transizioni e trasversioni è 5.2. Sono state osservate 63 mutazioni sinonime e 15 non sinonime. La diversità nucleotidica totale (P_i) è 0.030 (SD 0.003). La distanza media, calcolata con la distanza di Kimura-2-parametri, tra tutti gli aplotipi è 0.03.
Le popolazioni sono state raggruppate come segue: S. *ambrosii ambrosii*, S. *ambrosii bianchii* che comprende S. *ambrosii bianchii* puro e introgresso; *S. italicus*, che comprende *S. italicus* puro e introgresso. La distribuzione geografica degli aplotipi trovati è in fig. 22

In *S. ambrosii ambrosii* (ASN, ARG, API, AGI, ABR) gli aplotipi identificati sono tre (AA1, AA2, AA3), definiti da sei siti variabili di cui nessuno informativo. Le sostituzioni aminoacidiche sono tutte sinonime. La diversità nucleotidica (P_i) è 0.005 (S.D. 0.002). La diversità aplotipica è 1,00 (SD 0.272). La distanza aplotipica media (Kimura-2-parametri) fra gli aplotipi è 0.007.
Le frequenze nucleotidiche medie sono

T(U)	C	A	G
34.0	21.9	31.5	12.6

In *S. a. bianchii* sono stati trovati nove aplotipi (da AP1 ad AP9) (fig.22).
In *S. a. bianchii* puro (APU) gli aplotipi trovati sono tre (AP1, AP2, AP3).
I siti variabili sono due di cui nessuno informativo, sono due sostituzioni sinonime. La diversità nucleotidica è (P_i) 0.002 (SD 0.001). La diversità aplotipica è 1,0 (SD

Aplotipo località	AA1	AA2	AA3	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8	AP9	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	tot
ASN	4																				**4**
ABR	6																				**6**
API	3	1																			**4**
AGI	2																				**2**
ARG			9																		**9**
APU				3	1	13															**17**
ABE						2	3														**5**
AFO								5	3			1									**9**
APO									1	7											**8**
APF									3	1											**4**
ATE									5												**5**
AVS									5												**5**
AMP									3	1											**4**
AMU										1											**1**
ACM									2	7											**9**
ACH										1	2										**3**
ICI																				15	**15**
IIS										3	1									1	**5**
IVA									1												**1**
IMN																			1		**1**
ISI													1								**1**
IFO													1					2			**3**
IBM															2						**2**
ICS																2	2				**4**
IMA																			1		**1**
ITR													1	4							**5**
IFI													2								**2**
IPT													3	1							**4**
ICA													1								**1**
IMV														2							**2**
IMR													6								**6**
ITO													2								**2**
IGM													4								**4**
ISA													3								**3**
IAQ													3								**3**

Tab.13: numero di individui che presentano ciascuno degli aplotipi (sequenze) osservati.

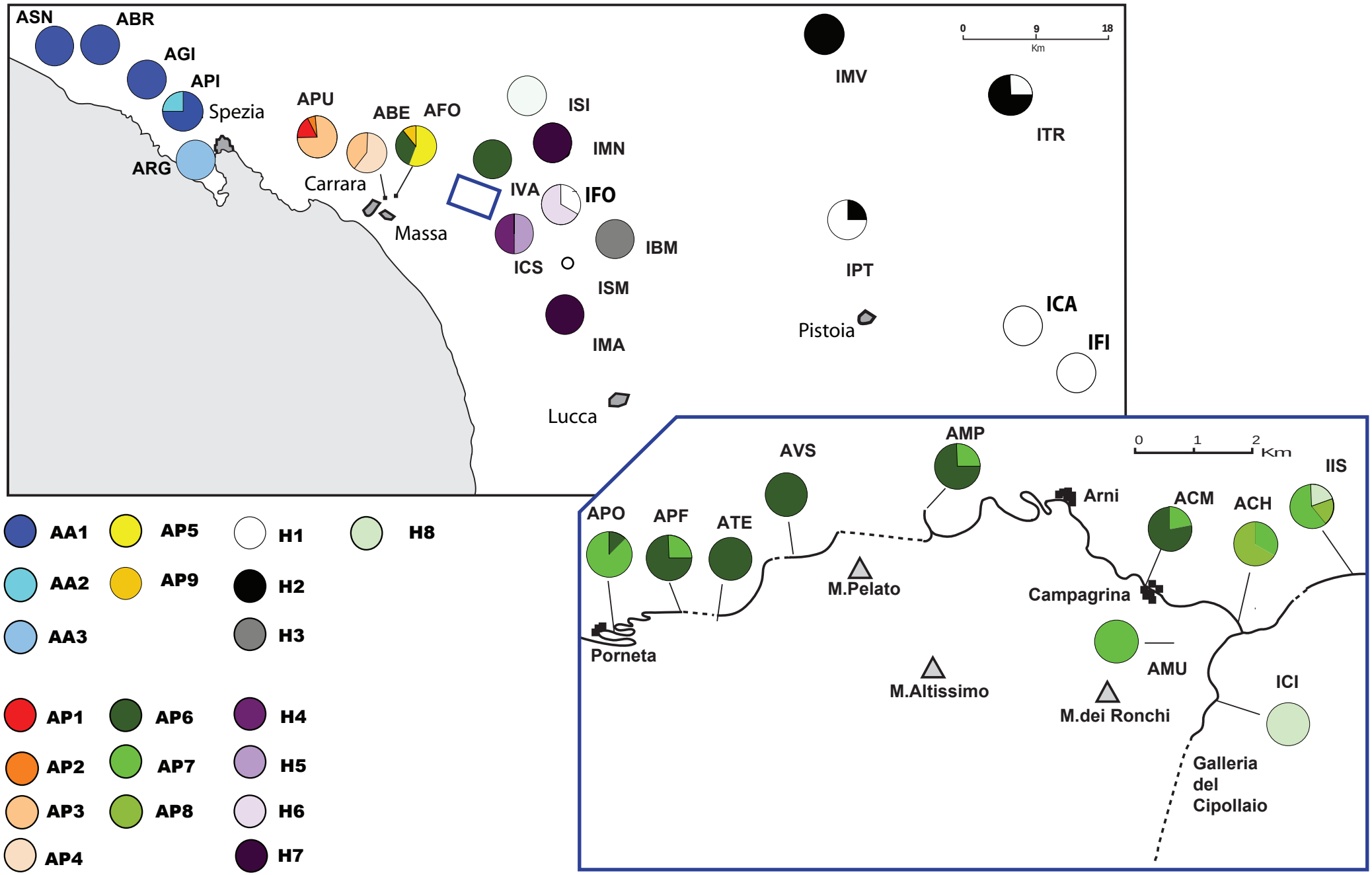


fig. 22 Distribuzione geografica degli aplotipi trovati del Cyt-b (838bp) in tutte le popolazioni studiate di *S a. ambrosii, S. a. bianchii* e *S. italicus*. Sono stati raggruppati in legenda gli aplotipi con meno del 1% di distanza di Kimura-2-parametri (K2P).

0.272). La distanza aplotipica media (K2P) è 0.0, che sta a sottolineare una certa omogeneità fra gli aplotipi tipici di *S. a. bianchii.*

Le frequenze nucleotidiche medie sono

T(U)	C	A	G
33.7	22.4	31.4	12.5

Le popolazioni di *S. a. bianchii* introgresso sono ABE, AFO, tutte le popolazioni del transetto tranne ICI. Gli aplotipi trovati sono sei (AP5, AP6, AP7, AP8, H8). L'aplotipo H8 è presene anche nella popolazione di IIS in un esemplare (vedi fig.22) per questo è stato incluso nel gruppo, mentre per il resto l'aplotipo H8 è completamente fissato ad ICI.

I siti variabili sono 15 di cui 4 informativi. La diversità nucleotidica è Pi = 0.008 (SD 0.001) e anche la distanza media tra gli aplotipi è 0.008. La diversità nucleotidica è 1,00 (SD 0.126). La distanza media (K2P) tra gli aplotipi è 0.01.

In *S. italicus* (fig.22) gli aplotipi identificati sono otto (da H1 a H8), definiti da 30 siti variabili di cui 8 informativi. I siti nucleotidici in cui sono avvenute sostituzioni aminoacidiche (siti non sinonimi) sono sette. La diversità nucleotidica (Pi) è 0.012 (SD 0.005). La diversità aplotipica è 1,00 (SD 0.063). La distanza aplotipica media in tutto *S. italicus* è 0.013.

Le frequenze nucleotidiche medie sono

T(U)	C	A	G
34.0	21.9	31.5	12.6

Se consideriamo le popolazioni di *S. italicus* puro. Gli aplotipi trovati sono solo due (H1 e H2). Gli aplotipi sono definiti da un sito variabile tra l'altro sinonimo. La diversità nucleotidica (Pi) è 0.001 (SE 0.000). La diversità aplotipica è 1,00 (SD 0.500). La distanza aplotipica media in tutto *S. italicus* è 0.001, paragonabile a quella di *S. a. bianchii* puro.

Le frequenze nucleotidiche medie sono

T(U)	C	A	G
33.5	22.0	31.2	12.5

Se consideriamo *S. italicus* introgresso invece la variabilità è molto maggiore rendendo conto infatti della variabilità all'interno di *S. italicus.* In questo gruppo è compresa anche la popolazione ICI che a sua volta contribuisce in misura maggiore ad aumentare il differenziamento all'interno di *S. italicus* introgresso, che altrimenti non considerando questa popolazione, avrebbe avuto una diversità nucleotidica (Pi) di 0.005 (SD 0.002), paragonabile a quella delle popolazioni di *S. a. bianchii* della zona di contatto.

Gli aplotipi trovati sono sei (da H3 a H8), definiti da 29 siti variabili di cui sei informativi. Delle 29 mutazioni sette non sono sinonime. La diversità nucleotidica (Pi) è 0.015 (SE 0.006). La diversità aplotipica è 1,00 (SD 0.096). Così come la distanza aplotipica media (K2P) è la maggiore (0.013).

Le frequenze nucleotidiche medie sono

T(U) C A G

34.5 21.5 31.7 12.3

Qui di seguito sono riassunti i parametri di diversità aplotipica e nucleotidica e distanza media di Kimura-2-parametri precedentemente descritti.

gruppi di aplotipi	**Diversità nucleotidica (Pi – SD)**	**SD della diversità aplotipica (H=1,00)**	**Distanza aplotipica media (K-2-P)**
S. a. ambrosii	0.005 (S.D. 0.002)	1 +- 0.27	0.007
S. a. bianchii puro	0.002 (S.D. 0.001)	1 +- 1,27	0.000
S. a. bianchii introgresse	0.008 (SD 0.001)	1 +- 0.13	0.010
S. italicus puro	0.001 (SD 0.000)	1 +- 0.06	0.001
S. italicus introgresse	0.015 (SD 0.006)	1 +- 0.50	0.013

4.2.3 Neighbour Joining e network degli aplotipi

L'albero Neighbour Joining (NJ) è stato costruito sulla base delle distanze trovate di Kimura-2-parametri (fig.23). Si nota come l'albero rispecchi la suddivisione in gruppi precedentemente descritta. La specie utilizzata come outgroup è *Eurycea bislineata.* La principale suddivisione, sostenuta dal massimo valore di bootstrap, è fra *S. a. ambrosii* e tutte le altre popolazioni di *S. a. bianchii* e *S. italicus*. Tra questi ultimi due taxa corrispondono due gruppi ben distinti di aplotipi. Uno che comprende gli aplotipi

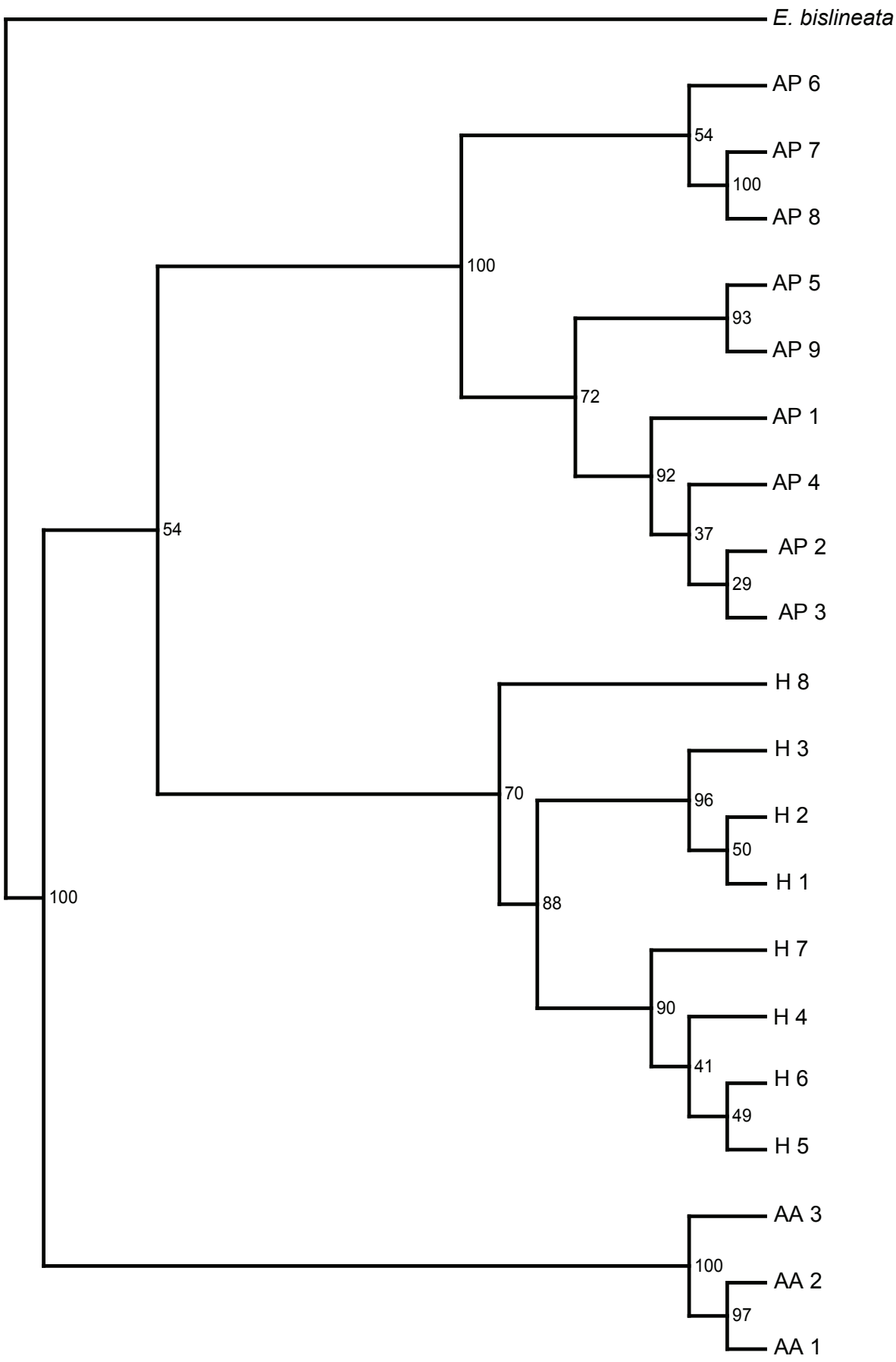


Fig. 23 Neighbour Joining con le distanze genetiche di Kimura-2-parametri per la regione Citocromo-b (838bp) tra tutte le popolazioni di *S. a. bianchii* e *S. italicus* e *S. a. ambrosii*

tipici di *S. a. bianchii* e le popolazioni introgresse della zona di contatto, e cioè da AP1 a AP9 e l'altro che comprende le popolazioni di *S. italicus* (da H1 a H8). E' degno di nota come gli aplotipi di *S. a. bianchii* puro (APU) che sono AP1, AP2 e AP3, "clusterizzino" insieme anche ad AP4 che è tipico della popolazione adiacente di ABE. La popolazione AFO è più differenziata rispetto alle due precedenti ed è collocata in una posizione intermedia tra le due precedenti e la zona di contatto. Presenta infatti tre aplotipi di cui due (AP5, AP9) più simili e il terzo AP6 che invece si diffonde, insieme agli altri due aplotipi (AP7, AP8), per tutta la zona di contatto fino al fronte di contatto, comprendendo anche IIS e IVA. Gli aplotipi tipici delle popolazioni di *S. a. bianchii* introgresso della zona di contatto, quindi geograficamente vicine (AP6, AP7 e AP8) costituiscono un unico cluster in quanto molto simili tra loro. Bisogna far notare infatti che tutti gli aplotipi che si trovano insieme all'ultimo e penultimo livello di clustering, come per esempio oltre al cluster AP6-AP7-AP8 anche i cluster AP5-AP9; da AP1 a AP4; da H1 ad H3 e da H5 a H7; presentano una distanza di K2P molto bassa, inferiore all'1%, come è rilevabile dalla matrice (tab.14); questo testimonia una bassa divergenza tra gruppi di aplotipi vicini geograficamente. Fino ad ora è evidente come l'albero NJ evidenzi una corrispondenza geografica con i vari cluster di aplotipi che tra l'altro sono abbastanza ben supportati dai valori di bootstrap. La popolazione IIS presenta compresenza degli aplotipi AP7, AP8 mentre l'aplotipo H8, in solamente un esemplare, che è tipico e fissato nella popolazione adiacente di ICI. Questo è l'unico caso di compresenza di aplotipi tipici di *bianchii* e di *italicus* nella stessa popolazione della zona di contatto ed in particolare nel fronte di contatto. Tra l'altro è da notare come non sempre la vicinanza geografica degli aplotipi rispecchi una reale somiglianza tra gli stessi, soprattutto in *S. italicus*. Infatti l'elevato differenziamento aplotipico tra la popolazione di ICI e tutte le altre *italicus*, dal 3% al 4% di distanza K2P (tab.14), non è di facile interpretazione considerando che ICI dista meno di dieci km dalle altre popolazioni di *S. italicus* introgresse, mentre la distanza tra *S. italicus,* introgresso e puro, è solo dell'1% per tutto il suo molto più ampio areale. E' da sottolineare però che non è stato possibile realizzare un transetto fine, quanto quello della zona di contatto, anche per le popolazioni di *S. italicus* introgresse da ICI in poi, e quindi non si può affermare con certezza che l'aplotipo H8 sia esclusivo di questa popolazione o che invece non si siano trovati aplotipi intermedi tra H8 e il gruppo di aplotipi tipici di *S. italicus* introgresso (da H3 ad H7).

Tab. 14: matrice di distanze di Kimura due parametri tra tutti gli aplotipi trovati in *S. italicus*, *S. a. ambrosii* e *S. a. bianchii*

	AA1	AA2	AA3	AP6	AP7	AP8	AP3	AP4	AP1	AP2	AP9	AP5	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
AA1																				
AA2	0.00																			
AA3	0.01	0.01																		
AP6	0.05	0.05	0.05																	
AP7	0.05	0.05	0.05	0.01																
Ap8	0.04	0.04	0.04	0.01	0.00															
AP3	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01														
AP4	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01	0.00													
AP1	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00												
AP2	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00											
AP9	0.04	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01										
AP5	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00									
H1	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04								
H2	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00							
H3	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00	0.00						
H4	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01					
H5	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00				
H6	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00			
H7	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00		
H8	0.07	0.06	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	

Le popolazioni di *italicus* puro e solo tre popolazioni di *italicus* introgresso (IBM, ISI, IFO) presentano come abbiamo detto aplotipi molto simili (cluster da H1 a H3). Gli aplotipi H2 ma soprattutto H1, sono poi caratteristici delle popolazioni debolmente introgresse (ICA, IFI, IPT) e pure di *S. italicus*. L'aplotipo H3 è stato trovato soltanto ad IBM ma è molto simile, distanza di K2P 1%, al cluster a cui è direttamente legato ovvero quello che comprende gli aplotipi caratteristici delle popolazioni di *S. italicus* introgresse e cioè da H4 ad H7. Questi ultimi sono fra loro molto simili ed infatti le popolazioni che li possiedono sono ancora una volta geograficamente vicine. Bisogna notare la maggior variabilità in termini di numero di aplotipi differenti si riscontra nella zona delle Alpi Apuane e nell'Appennino tosco-emiliano settentrionale, quindi per le popolazioni di *S. a. bianchii* puro ed introgresso e *S. italicus* introgresso e debolmente introgresso. Al contrario nell'areale di *S. italicus*, che si spinge quindi fino alla porzione più meridionale abruzzese, si assiste ad una maggiore omogeneità genetica anche dal punto di vista aplotipico così come era stato riscontrato descrivendo i pattern allozimici.

Il network degli aplotipi (fig.24) collega gli aplotipi che verosimilmente, cioè con il 95% di probabilità, differiscono per una mutazione. Il massimo numero di mutazioni tra gli aplotipi che sono considerate valide per creare una connessione parsimoniosa tra aplotipi con probabilità del 95%, sono undici. Quindi si può subito notare come l'aplotipo H8 che resta slegato dal network non soddisfi questa condizione, indicando un differenziamento maggiore rispetto agli altri network su una scala temporale non rilevabile dall'algoritmo di Templeton *et al.* (1992) che è stato creato appunto per ricostruire le relazioni intraspecifiche ma ad una basso livello di divergenza genetica. In quest'ottica è facile notare come i gruppi di aplotipi che soddisfano le condizioni suddette, siano tutti gli aplotipi di *S. a. bianchii* sia pur che introgresso, da una parte e all'altra tutti gli aplotipi tipici di *S. italicus* sia puro che introgresso che formano un network a parte rispettivamente (fig.24). *S. a. ambrosii* mostra un network scisso dagli altri due con l'aplotipo AA3, tipico della parte meridionale del suo areale nello "spezzino", che risulta il più differenziato in quanto presenta almeno quattro ipotetici aplotipi mancanti indicati dai circoletti vuoti (fig.24). All'interno di *S. a. bianchii* è da notare una certa frammentazione tra il gruppo di aplotipi tipici delle popolazioni di APU e ABE, vicine geograficamente, che comprende AP1, AP2, AP3 e AP4, e la popolazione di AFO che risulta più differenziata in quanto all'interno della stessa popolazione sono presenti aplotipi che differiscono per almeno quattro aplotipi

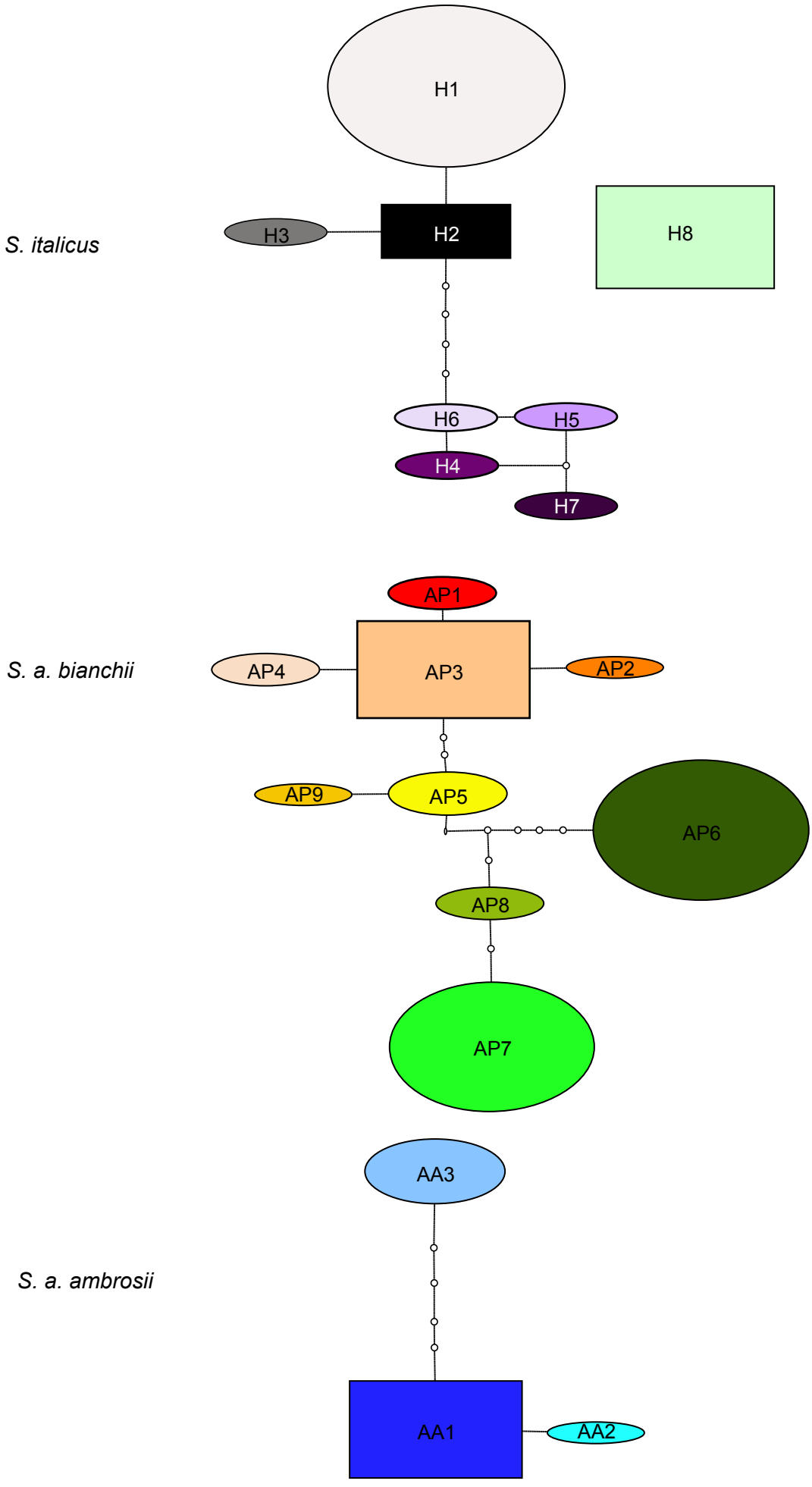


fig. 24 Network di parsimonia tra tutti gli aplotipi del Cyt-b (838bp) osservati (Templeton, 1992).

mancanti e cioè AP5 e AP9 con AP6. Quest'ultimo aplotipo è tra l'altro tipico e molto diffuso nella zona di contatto come accade per gli aplotipi AP7 e AP8 che sembrano derivare dall'aplotipo AP5 tipico solo della popolazione di AFO. Anche in questo caso così come si riscontrava per il NJ, c'è una direttiva geografica che sembra rendere conto del differenziamento aplotipico all'interno di *S. a. bianchii.* Un discorso simile vale anche per il network che connette gli aplotipi di *S. italicus.* Risulta qui più evidente l'omogeneità delle popolazioni pure di *S. italicus*, i cui aplotipi sono l'uno di derivazione dell'altro e cioè da H2, che è considerato l'aplotipo ancestrale, derivano da una parte H3 e H1 che poi si diffonde nell'areale di *S. italicus* puro, suggerendo una direttiva geografica di spostamento delle popolazioni che va dall'Appennino tosco-emiliano verso sud. Da notare come ci sia una frammentazione genetica tra le popolazioni pure o poco introgresse di *S. italicus* e il gruppo di aplotipi tipici delle popolazioni di *S. italicus* introgresse che va da H4 a H7, molto più omogeneo. Questo ultimo gruppo sembra derivare, sebbene con quattro aplotipi mancanti, direttamente da H2. Il numero di aplotipi mancanti non è da escludere però che possa essere legato al campionamento, la cui correttezza è fondamentale perché il network sia attendibile in quanto il network stesso lavora correlando le distanze geografiche con quelle genetiche (Templeton 1998). In questo caso il fatto che le popolazioni che presentano gli aplotipi H1, H2 e le popolazioni di *S. italicus* introgresse (H4-H7), sono distanti decine di chilometri va preso in considerazione. Per le ragioni sopra descritte la popolazione di ICI, essendo più differenziata, non si lega al network di *S. italicus* e non è da escludere che sia dovuto a "buchi" di campionamento, non sottovalutando però le implicazioni biogeografiche che potrebbero aver causato comunque un maggior differenziamento di questa popolazione rispetto alle altre *italicus*. Il fatto che il numero di mutazioni che separano gli aplotipi di *S. a. bianchii* da quelli di *S. italicus* sia sicuramente maggiore di undici conferma ulteriormente che esiste un differenziamento genetico tra i due taxa venuti in contatto più marcato a livello mitocondriale, sia dagli RFLP ma ancor più dalle sequenze, di quanto non emerga a livello nucleare. Questo differenziamento è sottolineato dalla mancata compresenza di aplotipi specifici nelle stesse popolazioni nemmeno nel fronte di contatto, a parte un caso unico ad IIS.

CAP. 5 DISCUSSIONE

I geotritoni sono animali le cui esigenze ecologiche sono strettamente legate alla presenza di rifugi ipogei, caratterizzati da condizioni di temperatura ed umidità costanti. Le specie continentali del genere *Speleomantes* infatti presentano caratteristiche ecologiche simili sebbene alcune specie siano più euriece rispetto ad altre (es. *S. ambrosii ambrosii*; Cimmaruta *et al*. 1999) e tutte sono caratterizzate da una bassa vagilità. In *Speleomantes* il differenziamento genetico è relativamente svincolato dall'evoluzione morfologica, come è ormai noto nei Pletodontidi (Wake 1966, 1981, 1991; Bullini 1983; Wake *et al.* 1983; Wake & Larson 1987; Wake *et al*. 1983; Roth & Wake 1983; Parra Olea & Wake 2001), e viene accumulato soprattutto in allopatria (Forti *et al*. 1997; Nascetti *et al*. 1996). Per queste caratteristiche, soprattutto bassa vagilità e habitat costante, la dinamica di popolazione di questi animali è determinata in massima parte dagli eventi climatici e, su scala geologica, da quelli paleoclimatici come l'alternanza dei periodi glaciali e interglaciali.

Il differenziamento genetico che intercorre tra *S. a. bianchii* e *S. italicus* è in termini di distanza di Nei (1972) pari a 0,46. E' plausibile che un tale differenziamento genetico si sia raggiunto in seguito ad uno o più periodi di isolamento geografico (durante le glaciazioni), in cui le popolazioni si sono frammentate ed isolate nei rispettivi rifugi; come è accaduto per molti organismi della fauna e flora italiana ed europea (Hewitt 1995, 2004). All'interno del genere *Speleomantes* in particolare l'alternanza di periodi glaciali ed interglaciali ha avuto un'influenza decisiva nell'evoluzione della presente distribuzione del genere nella nostra penisola (Lanza *et al.* 1995; Lanza 1999a; Cimmaruta *et al.* 1998, 2002; Lanza *et al*. in prep.; Forti *et al.* 1998). Le esigenze ecologiche dei geotritoni (vedi cap.1) fanno verosimilmente pensare che i periodi glaciali abbiano determinato la frammentazione e l'isolamento delle popolazioni, dato che questi periodi sono caratterizzati da basse temperature e da un clima tendenzialmente secco (Bertolani-Marchetti 1985). Inoltre durante i periodi glaciali l'abbassamento dei piani vegetazionali confina le popolazioni in associazione con i boschi relitti alle basse latitudini o lungo la costa, inducendo comunque la frammentazione delle popolazioni (Forti *et al.* 1998). Durante i periodi interglaciali invece il clima più caldo e umido permette e promuove la riespansione delle popolazioni ad altitudini più elevate, sempre seguendo l'innalzamento dei piani

vegetazionali (Pignatti 1994). Se la dinamica dello spostamento delle popolazioni di *Speleomantes* segue i criteri sopra elencati, è verosimile ipotizzare che le dinamiche dette di "flush and crash" (espansione e frammentazione) siano i principali meccanismi che hanno portato alla formazione delle specie note e che hanno modulato la struttura genetica delle popolazioni a livello intraspecifico. Degli esempi di quanto detto a livello specifico sono la formazione delle specie sarde di *Speleomantes* (Cimmaruta *et al.* 1998) per le quali i periodi di "crash", corrispondenti alle glaciazioni del tardo Pliocene, sono stati i responsabili della divergenza tra le specie della Sardegna orientale. La struttura genetica a livello intra-specifico è influenzata d'altro canto dall'alternanza dei periodi glaciali ed interglaciali che caratterizzano il periodo plio-pleistocenico. Ad esempio in *Speleomantes strinatii* esistono gruppi di popolazioni ben differenziate nella parte occidentale del suo range, in particolare il gruppo del "finalese" che risulta il più differenziato e vive in un'area piccola e isolata dalle montagne relativamente alte che hanno costituito una barriera geografica durante i periodi glaciali (Forti *et al.* 1998). Il tempo di divergenza di questo gruppo rispetto alle altre popolazioni di *S. strinatii*, è datato alle glaciazioni pleistoceniche di Günz e Mindel (Cimmaruta *et al.* 2005).

S. ambrosii è attualmente suddiviso in due sottospecie allopatriche (Lanza *et al.* in prep.), i cui rifugi sono identificati per *S. ambrosii ambrosii* nell'Appennino ligure meridionale e per *S. ambrosii bianchii* nelle Alpi Apuane. Questo scenario è concorde con altri studi che identificano queste aree geografiche quali rifugi per altri organismi sia animali che vegetali (La Greca 1970; Mariotti 1984; Pignatti 1994; Kropf *et al*. 2002).

Quindi durante i periodi interglaciali le popolazioni precedentemente isolate nei rispettivi rifugi, tornano in contatto secondario e qualora non si siano evolute delle efficaci barriere prezigotiche in allopatria, si formano delle zone di contatto e ibridazione, quale questa oggetto di studio e alcune micro-zone di contatto caratterizzate da alti livelli di variabilità come quelle osservate tra alcune popolazioni di *S. strinatii* in Liguria (Cimmaruta *et al*. 2005). Inoltre il differenziamento in allopatria tra taxa è molto diffuso nei pletodontidi (Garcìa Parìs *et al*. 2000) e ci sono molti esempi di contatti secondari riferiti ad altri organismi con distribuzione parapatrica che formano ristrette zone di ibridazione nella nostra penisola: *Pontia daplidice*/*P.edusa* (Porter *et al*. 1997); *Chrysolina rossia/C. gypsoplylae* (Cianchi *et al*. 1986); *Zyginidia pullulai/Z. scutellaris* (Mazzoglio & Arzone 1993).

Molto verosimilmente anche la zona di contatto qui studiata è frutto di un contatto secondario che può essersi verificato a partire da 2,3 milioni di anni fa, cioè dal tardo pliocene, secondo la datazione del tempo di divergenza basato sulle distanze di Nei (1972) tra *S. italicus* e *S. a. bianchii*.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati dei modelli matematici semplici che simulano, considerando più condizioni di partenza, i due possibili scenari circa l'origine di una zona ibrida: contatto primario o secondario (Mayr 1942, 1963; Harrison 1990). Le condizioni di partenza del modello si basano sui pattern di variazione a due loci nel tempo, uno sotto selezione in due tessere ambientali differenti, e un altro neutro ma linked al primo. I pattern prodotti dal contatto primario o secondario sono indistinguibili a meno che non si osservi la zona di intergradazione solo dopo qualche centinaio di generazioni di contatto secondario. Se la zona ibrida è il risultato di un contatto secondario sarà inizialmente caratterizzata da un set di clini coincidenti per i caratteri che si sono differenziati durante i periodi di isolamento in allopatria. Al contrario non ci si aspetta clini coincidenti in un processo di intergradazione primaria a meno che molti caratteri indipendenti rispondano nello stesso modo ad un singolo gradiente o mosaico ambientale (Durret *et al.* 2000). Ci sono molti esempi di zone ibride in cui i transetti attraverso la zona rivelano variazione clinale di alleli a più loci o frequenze aplotipiche (Szymura & Barton 1986, 1991; Harrison & Bogdanowicz 1997; Phillips *et al*. 2004).

Dall'analisi della struttura genetica della zona di contatto è evidente un buon differenziamento genetico tra taxa. *S. italicus* risulta ben differenziato rispetto alle sottospecie di *S. ambrosii* rispetto alle quali mostra valori di D_{nei} paragonabili (vedi tabella a pag.39), mentre tra le due sottospecie di *S. ambrosii* si rileva una distanza di Nei pari a 0,26. Il differenziamento genetico tra i taxa è evidente dall'UPGMA che mostra due cluster principali, uno che comprende *S. a. ambrosii* e *S. a. bianchii*, e l'altro *S. italicus*. Le popolazioni della zona di contatto si raggruppano o con *S. a. bianchii*, tutta la parte occidentale della zona di contatto, o con *S*. *italicus*, le popolazioni della parte orientale della zona di contatto. I valori di variabilità genetica mostrano che in generale *S. a. bianchii,* puro e introgresso, è più variabile di *S. italicus*, quasi il doppio, sia in termini di percentuale di loci polimorfici che di eterozigosi osservata. Inoltre il test di differenziamento genotipico fra popolazioni, mette in evidenza come le popolazioni di *S. a. bianchii* pure o poco introgresse siano più differenziate dal punto di vista della distribuzione genotipica di quanto lo siano le

popolazioni di *S. italicus,* sia introgresse che pure, per quanto il loro areale sia molto più ampio. Una maggior omogeneità in *S. a. bianchii* si riscontra tuttavia per alcune popolazioni introgresse della zona di contatto geograficamente vicine. La struttura genetica delle popolazioni di *S. a. bianchii* puro e introgresso, che si collocano sulle Alpi Apuane, nota area di rifugio, potrebbe essere verosimilmente il risultato di più episodi di isolamento/frammentazione e riespansione locale conseguenza dell'alternanza dei periodi glaciali ed interglaciali riferibili al Pleistocene.

Per quanto riguarda *S. italicus* e soprattutto le popolazioni poco introgresse e pure, sembra invece verosimile ipotizzare una dinamica di espansione più recente dall'Appennino tosco-emiliano verso sud fino in Abruzzo. Hewitt (1995) cita alcuni esempi di studi basati sugli allozimi riferiti a svariate specie europee (es. *Titurus cristatus*) che forniscono evidenza di recenti espansioni delle popolazioni a partire dai loro rifugi glaciali accompagnate da perdita di diversità genetica. Queste dinamiche di espansione quindi portano ad una perdita di alleli e ad una omogeneità genetica nella maggior parte del range della specie. Sembra proprio quello che sarebbe accaduto all'interno di *S. italicus* in cui una dinamica di espansione recente verso sud avrebbe portato la specie ad una sostanziale omogeneità genetica, causando una diminuzione della variabilità e dell'eterozigosi osservata nelle popolazioni che progressivamente si spingevano verso sud.

Il differenziamento genetico tra le specie rilevato con gli allozimi è sostanzialmente confermato dal marcatore mitocondriale citocromo-b, analizzato mediante sia RFLP che aplotipi. Infatti dal NJ e dal network degli aplotipi emerge che i due taxa hanno sostanzialmente genomi unici in quanto presentano distinti gruppi di aplotipi specifici. Il maggior differenziamento infatti è tra taxa (distanza aplotipica media del 4%) piuttosto che all'interno dei singoli taxa, cioè all'interno *S. italicus* e *S. a. bianchii* dove la distanza aplotipica è paragonabile e relativamente bassa, intorno all'1%. Dal NJ emergono chiaramente tre cluster principali che corrispondono uno ad *S. a. ambrosii*, che risulta il più differenziato, e gli altri due comprendono uno tutte le popolazioni *S. a. bianchii* e l'altro tutte le popolazioni di *S. italicus*. C'è, come evidenziato anche dall'UPGMA per gli allozimi, una corrispondenza geografica nella distribuzione degli aplotipi e nel grado di reciproco differenziamento. Inoltre in *S. italicus* poco introgresso e puro, riscontriamo come già descritto per gli allozimi, una sostanziale omogeneità e basso numero degli aplotipi caratteristici: soltanto due con una diversità nucleotidica dello 0.1%. La diversità in *S. italicus* è maggiore solo nelle

popolazioni introgresse adiacenti alla zona di contatto in cui è riscontrabile un gruppo di aplotipi tipici molto simili tra loro (da H3 a H7) che sembrano derivare proprio dall'aplotipo più comune che caratterizza le popolazioni pure di *S. italicus* (H1 e H2). Gli aplotipi mancanti che separano questi due gruppi è verosimile che dipendano o dal mancato campionamento delle popolazioni geograficamente intermedie o che siano il risultato di una passata frammentazione delle popolazioni di *S. italicus* introgresse (Templeton 1998). Comunque una bassa diversità aplotipica accompagnata da una altrettanto modesta divergenza aplotipica sembra risultare da eventi di colonizzazione da singole "source" che sono connesse alle nuove popolazioni colonizzatrici da un basso flusso genico. Questo scenario potrebbe essere plausibile per le popolazioni di *S. italicus* introgresse e pure caratterizzate appunto da bassa diversità e divergenza aplotipica. Diversamente una bassa diversità aplotipica e una moderata divergenza aplotipica, come riscontriamo tra la popolazione di ICI e le restanti popolazioni di *italicus*, sembrano essere il risultato di processi di colonizzazione da più popolazioni di partenza geneticamente distinguibili e tra cui comunque c'è flusso genico (Fuerst & Austin 2004).

L'ipotesi di un'espansione verso sud a partire dalle popolazioni dell'Appennino tosco-emiliano di *S. italicus* sembra verosimile. Ci sono diversi casi documentati in cui una bassa divergenza aplotipica tra popolazioni che occupano una vasta area geografica suggerisce una recente espansione, come nel caso di *Salamandra atra* nella regione alpina (Riberon *et al.* 2001) oppure come in *Ambystoma tigrinum* (Shaffer & McKnight 1996).

In *S. a. bianchii* si riscontra un maggiore differenziamento genetico, con la presenza di diversi aplotipi, anche in popolazioni molto vicine geograficamente come APU, ABE e AFO (fig.22). Dal network degli aplotipi sembra che dalla popolazione di AFO, che presenta tre aplotipi diversi di cui uno è tipico anche di molte popolazioni della zona di contatto, sia avvenuta un'espansione della popolazione che ha portato *S. a. bianchii* in contatto con *S. italicus*. Anche dal NJ basato sui risultati del sequenziamento risulta evidente che la zona di contatto presenta aplotipi tipici, come era sommariamente emerso dagli RFLP, che però non avevano permesso di capire che gli aplotipi delle popolazioni di *S. a. bianchii* della zona di contatto deriverebbero da un'espansione a partire dalla popolazione di AFO.

Il grado di espansione delle popolazioni dai loro rifugi nei pressi della costa verso le montagne durante gli interglaciali, dipende dal tasso di dispersal e dall'orografia delle

montagne. Se le popolazioni che restano isolate dalle barriere geografiche sono ampie, possono sopravvivere molti genomi ed alleli, ma se sono di piccole dimensioni possono andare incontro ad una serie di colli di bottiglia (Hewitt 1995), così come è avvenuto per esempio per le popolazioni del "finalese" di *S. strinatii* in Liguria (Forti *et al*. 1998).

Nel nostro caso non ci sono segni di evidenti colli di bottiglia, rilevabili da un elevato differenziamento interpopolazionale e sembra che le dinamiche di espansione e contrazione delle popolazioni, come conseguenza delle oscillazioni climatiche dei periodi glaciali, abbiano permesso il flusso genico. Infatti ripetuti eventi di estinzione e colonizzazione generano un flusso genico che minimizza i processi di differenziamento locale (Lande 1992). Il processo di estinzione e ricolonizzazione potrebbe essere molto verosimilmente uno dei mezzi attraverso il quale si è realizzato il flusso genico in questi animali dalla vagilità notoriamente bassa. Inoltre, è stato proprio grazie a queste dinamiche di estinzione e ricolonizzazione ("flush & crash") che si è presumibilmente formata la zona di contatto secondario. Il rimescolamento dei pool genici avviene in una zona di contatto di per sé relativamente ridotta in dimensioni che si estende per una ventina di chilometri in linea d'aria. Il fronte di contatto è pure molto ristretto: è ampio circa due chilometri in larghezza e 7-8 chilometri in lunghezza tra le popolazioni di ICI e IVA; Il centro è invece collocato in corrispondenza della popolazione di ACH intermedia tra popolazioni di *S. a. bianchii* introgresse ad ovest e tra popolazioni di *S. italicus* introgresse ad est.

Il livello di divergenza genetica tuttavia non dà un'indicazione univoca del livello di speciazione raggiunto e quindi dell'evoluzione dei meccanismi di isolamento riproduttivo. Per esempio sulla base del differenziamento allozimico a parità di distanze di Nei molto basse (< 0,05) come accade nelle zone di contatto tra *Gryllus firmus* e *Gryllus pennylvanicus* (Harrison & Boganowicz 1997) e tra morfotipi della specie *Littorina saxatilis* (Rolàn Alvarez *et al*. 1997), si sono evolute delle forti barriere di isolamento pre-zigotiche basate sul comportamento assortativo, sebbene in *Littorina* ci sia produzione di 11-29% di ibridi in natura. Dato che identificare il comportamento assortativo attraverso esperimenti di laboratorio non è sufficiente per predire il vero tasso di ibridazione in natura, solo una zona di contatto e ibridazione naturale, considerata appunto una tappa intermedia tra conspecifico e specifico all'interno di un processo lungo di divergenza genetica ed evolutiva, permette di

valutare lo stato tassonomico dei taxa che si sono differenziati e inferire sul livello di isolamento riproduttivo raggiunto.

Dopo venti anni di studi sulle zone ibride, si è tentata una classificazione proprio alla luce delle considerazioni sopra citate in zone unimodali o bimodali (Jiggins & Mallet 2000a).

Gli autori sostengono che le zone di contatto si possano classificare tenendo in particolare attenzione la frequenza dei genotipi ibridi, cioè intermedi tra le forme parentali. La classificazione si basa infatti sul valore dell'indice ibrido che rappresenta la struttura genetica della zona ibrida evidenziando proprio le classi di individui con genotipo intermedio. Nelle zone bimodali le popolazioni sono costituite soprattutto da genotipi intermedi che assomigliano ad un genotipo parentale o all'altro. Nelle bimodali non c'è ampio rimescolamento dei pool genici in quanto sono abbastanza forti le barriere pre-mating e i gruppi "bimodali" continueranno a divergere nell'ecologia e nel comportamento riproduttivo. Dato che la ricombinazione non permette il decadimento dei linkage disequilibria, che riflettono il coadattamento del genoma, la mancanza o la scarsità di genotipi intermedi sarà evidente ai singoli loci con deficit di eterozigoti, e su più loci con forti correlazioni e disequilibria tra i loci stessi. Tuttavia nelle zone bimodali si riscontra una considerabile variabilità nella frequenza relativa dei genotipi ibridi e nell'abbondanza relativa di individui di F1 o backcrosses. Ad esempio nella zona ibrida tra le farfalle *Heliconius himera* e *Heliconius erato* in cui c'è comportamento assortativo nella scelta del compagno, in natura c'è il 10% di progenie ibrida con F1 e backcrosses e le barriere post-mating sono di carattere ecologico-mimetico (Jiggins *et al*. 1997). Oppure nella zona ibrida tra *Triturus cristatus* e *T. marmoratus* la progenie ibrida diminuisce al 1.3-14.3%, ma sono evidenti barriere post-zigotiche più forti come la sterilità dei maschi di prima generazione e la riduzione al 73% nel tasso di schiusa delle uova (Arntzen & Wallis 1991).

Nelle zone unimodali invece prevalgono i genotipi intermedi, un esempio è la zona di contatto tra *Bombina bombina* e *B. variegata* che si è formata in Europa centrale e si estende dall'Austria, dal lato meridionale della Valle del Danubio, fino al Mar Nero passando per i Carpazi. Sono state studiate meglio le zone di contatto situate in Polonia e in Croazia. Le popolazioni della zona di contatto differiscono nella distribuzione dei genotipi intermedi. La zona di contatto in Polonia (Szymura & Barton 1991) presenta una distribuzione unimodale, e sebbene le due specie abbiano

raggiunto un differenziamento a più caratteri (morfologici, ecologici, molecolari) non si sono evolute delle efficaci barriere pre-mating. Le popolazioni ibride tuttavia mostrano linkage disequilibria tra loci unliked e scostamenti non elevati dagli equilibri di Hardy-Weinberg con un debole deficit di eterozigoti. Nella seconda zona in Croazia invece sia le deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg sia i linkage disequilibria sono molto più forti e, rispetto alla Polonia, gli animali mostrano preferenze ecologiche più marcate e le popolazioni della zona di contatto mostrano una distribuzione genotipica che tende alla bimodalità e che segue un andamento a mosaico, cioè che è correlata con le differenti tessere ambientali (MacCallum *et al.* 1998). Quindi non è univoca la suddivisione tra uni e bi-modalità. Inoltre sembra che decidere se una zona sia uni- o bimodale dipenda dalla scala di campionamento (Schilthuizen 2000). Per esempio una zona bimodale su scala ridotta potrebbe essere classificata come unimodale se si considerano tutte le popolazioni anche al di fuori del fronte di contatto, cosa che potrebbe succedere soprattutto per animali con una bassa vagilità, come accaduto nella zona di contatto tra *Albinaria hippolyti hippolyti* e *A. hippolyti harmonia* a Creta (Schilthuizen & Lombaerts 1995), in cui a causa della bassa vagilità, gli individui parentali non riuscivano ad incrociarsi all'interno di tutta la zona di contatto ma soltanto in una zona di "overlap" molto più ristretta. L'attribuzione alla uni o bimodalità richiede quindi che le popolazioni che costituiscono la zona di contatto siano panmittiche localmente, e questo dipende dalla capacità di dispersal degli animali. Probabilmente la zona di contatto tra *Albinaria hippolyti hippolyti* e *A. hippolyti harmonia* dovrebbe essere considerata unimodale in quanto l'unimodalità caratterizza le popolazioni su scala spaziale fine e cioè le popolazioni di individui parentali che sono venute effettivamente in contatto (Jiggins & Mallet 2000b). Anche le due zone di contatto tra *B. bombina* e *B. variegata* in Polonia e in Croazia sono comunque state classificate come unimodali in quanto sebbene differiscano per l'abbondanza relativa di individui ibridi e "habitat choice", non ci sono comunque delle forti barriere pre-mating ma solo delle incompatibilità postzigotiche (Jiggins & Mallet 2000a). Quindi il fattore che gioca il ruolo più importante per caratterizzare le zone bimodali è l'assortative mating e un tipo di selezione soprattutto ambientale (selezione esogena) così come si verifica nella zona di contatto di *Littorina* che coincide proprio con un ecotono tra due habitats differenti, confermando che la fitness differenziale dei morfotipi simpatrici è la causa principale della formazione della zona stessa. Nelle bimodali, così come

nelle unimodali, è poi variabile il tipo di incompatibilità post-mating perché comunque gli ibridi si possono formare in misura variabile come citato precedentemente.
Al contrario le zone unimodali si formano quando due taxa vengono in contatto e non hanno sviluppato vere ed efficaci barriere di isolamento pre-copula e sono caratterizzate da barriere post mating di selezione contro gli ibridi e relativi reincroci, molto diverse in grado e tipologia a seconda della zona considerata.
Comunque da tutte le zone unimodali meglio studiate emerge che i taxa che sono venuti in contatto differivano per più caratteri: allozimici, morfologici e mitocondriali (*Bombina)*, oppure morfologici e cariotipici, come tra *Chorthippus parallelus* e *Chorthippus erythropus* sui Pirenei (Hewitt 1993).
Per poter classificare la zona di contatto tra *Speleomantes* qui descritta bisogna quindi decidere qual è la scala spaziale che va considerata. Come accadeva per *Albinaria,* il basso tasso di migrazione dei geotritoni che impone alle popolazioni di essere strutturate geneticamente su scala geografica, porta in contatto i parentali solo nel momento della formazione della zona stessa e un continuo afflusso di parentali al centro della zona non è verosimilmente possibile, in quanto le popolazioni parentali sono separate dal centro della zona dalle popolazioni intermedie che hanno subito introgressione. A questo proposito anche il marcatore mitocondriale suggerisce dinamiche di espansione con conseguente differenziamento delle popolazioni a partire dalle popolazioni pure. Quindi se consideriamo la distribuzione delle classi genotipiche su larga scala riferendoci a tutta la zona di contatto, ovvero considerando l'indice ibrido medio per ogni popolazione, la zona sembra avere una distribuzione bimodale perché le popolazioni ad ovest del centro presentano indici ibridi intermedi ma più simili a *bianchii* mentre per le popolazioni ad est del centro accade il contrario. Qualora ci si riferisse ad una scala più fine che permette di identificare le popolazioni dei due taxa che sono state panmittiche, dovremmo considerare i valori di indice ibrido per le singole popolazioni e limitare la nostra classificazione alle popolazioni del fronte di contatto e limitrofe in cui prevalgono classi di genotipi intermedi, risultato emerso sia dall'indice ibrido che dal test di assegnazione alle classi genotipiche.
E' verosimile alla luce di queste considerazioni pensare che la zona di contatto fra *Speleomantes* sia unimodale, risultato di un contatto secondario dopo un periodo di divergenza in allopatria che ha permesso soprattutto l'accumulo di divergenza genetica più che morfologica o ecologica, in quanto i geotritoni hanno esigenze

ecologiche simili e inoltre è ormai noto che l'evoluzione molecolare nei pletodontidi proceda indipendentemente da quella morfologica caratterizzata da estesa omoplasia (vedi cap. 1).

Come sostenuto da Barton & Hewitt (1981) una prova del contatto secondario tra taxa che hanno accumulato divergenza su vari caratteri, è la formazione nella zona di contatto di clini che possono o meno essere coincidenti e paralleli. Ricordiamo che un cline è il cambiamento graduale nello spazio di un carattere fenotipico o, per esteso, delle frequenze alleliche. Nel nostro caso sono evidenti clini alle frequenze alleliche che variano nella forma, posizione del centro e ampiezza, che presentano un andamento sigmoidale tipico dei clini di molte zone ibride frutto di un contatto secondario (Szymura & Barton 1986) (cap risultati).

I clini si formano per dispersione dei genotipi parentali all'interno della zona e dei genotipi ibridi verso le parti più interne dell'areale. Quando alla dispersione dei genotipi parentali all'interno della zona si contrappone una selezione di varia entità contro gli ibridi si genera una così detta "zona di tensione" (Barton 1979).

La selezione che agisce sulle zone ibride, tende a mantenere la divergenza ancestrale e può essere classificata come esogena o endogena. La prima agisce mantenendo gli alleli in differenti habitats, quindi la fitness dei genotipi è "environmental-dependent" determinata cioè da un gradiente ecologico. Per poter stimare l'effetto di una selezione esogena sull'evoluzione di una zona ibrida sono necessari studi ecologici accanto a studi genetici, ma soprattutto i taxa che vengono in contatto dovranno divergere sostanzialmente nell'ecologia oltre che nella genetica e/o in altri caratteri. Le zone che sono caratterizzate principalmente da selezione esogena possono avere una struttura genetica e spaziale frammentata anche se ci possono essere "micro-variazioni" clinali di markers genetici e morfologici al confine fra le varie tessere ambientali. La concordanza dei clini non è costante nel raffronto di markers o transetti diversi collocati dentro diverse regioni della zona. Gli ibridi non mostrano bassi livelli medi di fitness ma solitamente mostrano fitness differenziale. Un esempio di zona ibrida in cui la selezione esogena svolge un ruolo primario è quella tra *Bombina bombina* e *Bombina variegata* in Croazia, in cui si riscontra una forte associazione tra habitat e frequenze alleliche a quattro marker nucleari piuttosto che variazione clinale delle frequenze alleliche (Vines *et al*. 2003).

Un esempio invece di zona di contatto e ibridazione in cui entrambe le forze selettive hanno agito contemporaneamente, è la zona ibrida che si è formata artificialmente

tra due specie che hanno evoluto indipendentemente per cinque milioni di anni e poi sono state rese simpatriche dall'uomo: *Ambystoma tigrinum mavortium* è stata infatti introdotta nel range nativo di *A. t. californiense* una sessantina di anni fa. La frequenza dei genotipi ricombinanti è strettamente connessa a differenti ambienti così che la zona ibrida mostra una struttura a mosaico che dipende dall'idrologia ed ecologia delle specie. Si riscontrano linkage disequilibria tra maker molecolari unlinked nelle varie tessere ambientali testimoniando che ci sono degli impedimenti nell' "admixture" e che l'ibridazione è influenzata da complesse interazioni genotipo-ambiente determinate sia da selezione esogena che endogena. Il pattern di distribuzione geografica dei genotipi ricalca la fitness differenziale dei genotipi ibridi piuttosto che mostrare una fitness mediamente bassa degli ibridi, suggerendo che è l'ecologia delle specie che gioca il ruolo primario nella dinamica del contatto secondario tra queste salamandre.

La selezione endogena tende invece a mantenere gli alleli in background genetici differenti, cioè se la fitness dei genotipi ibridi è definita da interazioni interne al genoma indipendenti dall'ambiente, la selezione endogena favorirà il mantenimento delle combinazioni geniche parentali e quindi agirà contro gli ibridi per esempio si instaurerà selezione contro gli ibridi, o perlomeno alcuni genotipi ibridi (Barton 2000), e il centro della zona di contatto sarà caratterizzato da linkage disequilibria e deficit di eterozigoti, espressi dal parametro F_{is}, anche fra loci non linked. E' questo tipo di selezione che agisce principalmente nelle zone di tensione.

La forma del cline però non varia sostanzialmente se la selezione è endogena o esogena anche in clini multilocus (Kruuk *et al*. 1999), e dipende da più fattori: dal grado di selezione contro gli ibridi, dalla capacità di dispersal dell'animale, dall'epoca in cui è avvenuto il contatto (Endler 1977). I clini rappresentano una barriera al libero flusso genico tra taxa differenziati, infatti la forma del cline dà delle indicazioni sulla forza della selezione che agisce sugli ibridi. Se il "mixing" tra i taxa venuti in contatto è neutrale e il dispersal è ampio, i clini ai caratteri differenziati risultano ampi, mentre nel caso limite opposto, cioè se agisce una forte selezione contro gli ibridi accoppiata ad un dispersal relativamente basso, la variazione clinale ai caratteri differenziatisi avverrà in brevi distanze, in genere qualche chilometro, e i clini risultanti saranno stretti e ripidi. Infatti l'ampiezza di un cline è data dal rapporto tra dispersal (misurabile con esperimenti di marcaggio e ricattura) e la radice quadrata della selezione che agisce sul cline. Ma oltre che la forma va considerata anche la

coincidenza tra i clini ai loci discriminanti per stabilire la forza della barriera la flusso genico. Per esempio nella zona ibrida che si è formata tra *Ensatina escholtzii xanthopica* e *E e. platensis* (Alexandrino *et al*. 2005) nella Sierra centrale californiana, i due taxa differiscono per otto loci enzimatici e per il DNA mitocondriale, oltre che per il pattern di colorazione. La zona è stretta 730 mt e lunga 2,2 km. Sono stati rilevati scostamenti significativi dall'equilibrio di Hardy-Weinberg per sei loci su otto e i clini ai loci discriminanti sono coincidenti nel centro e paralleli nella forma con un'ampiezza tra 500-960 mt. Al centro del transetto sono evidenti i linkage disequilibria, la presenza sebbene ridotta di ibridi di prima generazione, e valori di F_{is} maggiori.

Queste sono caratteristiche di una forte selezione contro gli ibridi e quindi di una forte barriera al flusso genico che caratterizza le zone di tensione e che può essere riassunta nei seguenti punti:

1- deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg ai loci diagnostici dovute a comportamento assortativo e/o a selezione contro gli ibridi, quindi deficit di eterozigoti che corrispondono ad F_{is} maggiori;

2- associazioni statisticamente significative tra loci unlinked per alleli alternativi (LD) dovuti o al dispersal dei parentali nella zona e/o alla rimozione selettiva di genotipi ricombinanti;

3- clini stretti e ripidi piuttosto che ampi per diffusione neutrale.

Queste sono caratteristiche anche della zona di tensione tra *Bombina bombina* e *B. variegata* in Polonia, i clini sono coincidenti con uno scarto dal centro che varia di 820 mt ad ovest e 720 mt ad est, infatti la variazione clinale avviene nel raggio di sei km. La forza della selezione ai vari loci, che è stata misurata sulla base del valori di dispersal calcolato da precedenti esprimenti di marcaggio e ricattura (Szymura & Barton 1986), è inferiore rispetto a *Ensatina*, 22% contro 46-75%, i clini agiranno da barriera al flusso genico in misura minore e quindi l'introgressione sarà differente ai vari loci. L'introgressione risulta asimmetrica con una maggiore penetrazione di alleli *variegata* in *bombina*. In un atro caso, nella zona di contatto tra le salamandre del genere *Chioglossa* in Spagna (Sequeira *et al.* 2005), il differenziamento genetico è a carico di quattro loci enzimatici e del DNA mitocondriale. Non è stata rilevata una forte selezione contro gli ibridi, in quanto sono stati rilevati scostamenti significativi dagli equilibri di Hardy-Weinberg e nemmeno significativi linkage disequilibria nelle popolazioni ibride. I clini ai loci discriminanti non sono coincidenti né paralleli, in

quanto il centro ha uno scarto di due km, e l'ampiezza di quattro chilometri. Infatti gli autori sostengono che il "mixing" tra le popolazioni sia neutrale, che la struttura genetica della zona di contatto sia il risultato della complessa storia biogeografica delle popolazioni e che la zona stessa non sia assimilabile al modello di una zona di tensione.

Da questi esempi emerge che qualora la selezione contro gli ibridi non sia abbastanza forte da agire contro tutti gli eterozigoti a tutti i loci, agirà di conseguenza in maniera differenziale sui singoli loci rendendo i clini non coincidenti per forma e ampiezza.

Passando quindi ad analizzare le caratteristiche della zona di contatto qui studiata in funzione di una sua definizione o meno come zona di tensione, possiamo esaminare la struttura dei clini (punto 3 a pag.77). Nella nostra zona di contatto i clini non sembrano coincidenti se paragoniamo i nostri risultati con i casi precedentemente descritti. Dei sette loci diagnostici, quattro sono a scarsa o nulla penetrazione (*Pgm-2, Ldh–1, Ldh-2, Ck*), e per questi quattro clini lo scarto dal centro è di quattro km ad ovest e uno ad est. Ai tre loci ad ampia penetrazione (α-*Gpdh, Me-2, Nadh*) lo scarto dal centro è di due km ad est. I clini non sono paralleli in quanto l'ampiezza varia da 12 a 14 km per loci a scarsa o nulla penetrazione, e tra 20 e 70 km in quelli ad ampia penetrazione. Comunque l'inversione delle frequenze alleliche per tutti i loci avviene nel giro di circa sei chilometri come avevamo visto per *Bombina* in Polonia.

Per quanto riguarda la distribuzione ed i valori di F_{is} e gli eventuali scostamenti dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (punto 1 a pag.77), nelle popolazioni della zona di contatto, e cioè *S. a. bianchii* introgresso e *S. italicus* del fronte di contatto (IIS, IVA e ICI), sono stati rilevati valori di F_{is} maggiori con un valore massimo di circa 0,20 (IVA). Questo valore denota una selezione modesta contro i genotipi ibridi se paragonata ad esempio a quella riscontrata nella zona di contatto tra differenti "lineages" di *Carlia rubrigularis sp.* (Phillips *et al.* 2004). La zona ibrida formata da due "lineages" di questo scinco della fauna australiana tropicale, differenziati a livello nucleare (due introni e sei microsatelliti) e mitocondriale (divergenza mtDNA >15%), è stretta e caratterizzata da sostanziali linkage disequilibria nelle popolazioni del centro o fortemente introgresse e forte selezione contro gli ibridi con valori di F_{is} intorno a 0,42. Inoltre nella zona tra *Speleomantes* lo scostamento dagli equilibri di Hardy-Weinberg si è riscontrato solo in tre loci discriminanti su sette totali e su cinque popolazioni della zona di contatto sul totale.

Emerge dagli esempi precedentemente descritti di altre zone ibride e anche da quella qui oggetto di studio, come il centro della zona di tensione sia caratterizzato oltre che da deficit di eterozigoti in misura variabile, anche da linkage disequilibria per i loci discriminanti anche se non linked (punto 2 pag.77). In *Bombina* (Szymura & Barton 1991) ci sono forti linkage disequilibria (LD) nel centro della zona di contatto che derivano dal dispersal dei genotipi parentali al centro della zona e sono quindi determinati da un semplice equilibrio tra dispersal e ricombinazione. La ricombinazione induce un decadimento progressivo dei LD con l'aumentare delle generazioni di ricombinazione. Infatti per ogni valore dato di selezione l'ammontare dei LD dipende dal tasso di ricombinazione e dal tempo del contatto (Durret *et al*. 2000). I LD generati dal dispersal delle popolazioni parentali al centro della zona, dovrebbero decadere ai lati della zona stessa a mano a mano che aumentano le generazioni di backcrosses cioè di ricombinazione. Se c'è una barriera al flusso genico generata da questi LD i clini saranno ripidi e stretti, e l'introgressione di alleli di una specie nel pool genico dell'altra anche se ci allontaniamo dal fronte di contatto sarà per una certa misura ostacolata. Questo è ciò che accade nella zona di contatto di *Bombina* in Polonia, in cui l'introgressione di alleli di *bombina* in *variegata,* ma non il contrario, è ostacolata dalla barriera al flusso genico generata dai LD. Quindi l'introgressione di alleli di un taxa nel pool genico dell'altro dipenderà dalla barriera al flusso genico generata dai clini ripidi e stretti che riflette a sua volta l'ammontare dei LD tra loci unlinked nella zona stessa. Nella zona di contatto tra *Speleomantes*, i LD si concentrano nelle popolazioni del fronte di contatto e nelle popolazioni di *S. a. bianchii* introgresse, per decadere ai lati della zona e in particolare nelle rimanenti popolazioni di *S. italicus* introgresse e pure. Questo andamento è parallelo anche per valori di F_{is} che decrescono progressivamente ai lati della zona di contatto sia nelle popolazioni di *S. a. bianchii* debolmente introgresse e pura, e sia nelle popolazioni di *S. italicus* introgresse e pure. Le popolazioni introgresse sia di *bianchii* che di *italicus* ai lati della zona sono soprattutto costituite da individui frutto di generazioni avanzate di backcrosses (Bx) e quindi è logico aspettarsi che i LD scemino progressivamente a mano a mano che ci si allontana dalla zona di contatto in popolazioni che hanno accumulato più generazioni di ricombinazione attraverso i Bx appunto. Sembra però che questo avvenga in maniera differenziale nei due taxa, in quanto nelle popolazioni introgresse di *bianchii* i LD permangono molto di più che in *S. italicus* in cui decadono già ad est del fronte di contatto, e cioè in *italicus* introgresso appunto. Questo è

coerente con l'andamento dell'introgressione degli alleli ai singoli loci discriminanti, in quanto le forze che agiscono in una zona di contatto determinano la forma dei clini e l'entità dell'introgressione degli alleli ai singoli loci. Sembra verosimile che la selezione su *Speleomantes* abbia agito in maniera differenziale sui singoli loci e che quindi risultino pattern di introgressione differenti a seconda della forza dei clini come barriere al flusso genico ai loci discriminanti.

Il tipo di introgressione della zona è infatti differenziale e cioè l'entità della penetrazione varia da scarsa o nulla per il 58% dei loci discriminanti, ad ampia per il rimanente 42%. L'introgressione è anche asimmetrica, cioè gli allei penetrano in entrambi i lati del fronte di contatto ma con una maggiore penetrazione di alleli *bianchii* nelle popolazioni di *italicus,* e una minore penetrazione di alleli *italicus* nel pool genico di *bianchii.* La presenza di LD infatti nelle popolazioni introgresse di *bianchii* e dei valori maggiori di F_{is} sempre nelle stesse popolazioni e i clini abbastanza ripidi, in quanto la variazione delle frequenze alleliche avviene in una distanza di circa sei chilometri, è una conferma che l'incameramento di alleli da parte di popolazioni di *bianchii* è più sfavorito di quanto invece avvenga per *S. italicus.* Le ragioni di questo risiedono in parte come abbiamo visto in una selezione endogena che agisce contro il decadimento del coadattamento dei genotipi parentali in maniera differenziale ai singoli loci. Come visto nel caso di *Ensatina*, una forte selezione contro gli ibridi mantiene i clini coincidenti e paralleli e impedisce il passaggio di alleli neutri, soprattutto se linked a loci sotto selezione negativa (Durret *et al*. 2000), o di alleli contro selezionati, ma non può impedire il passaggio di alleli vantaggiosi. Infatti se un allele conferisce un vantaggio selettivo sicuramente passerà la barriera al flusso genico ma la sua diffusione sarà rallentata dal linkage con alleli che invece sono sotto selezione (Barton 1986). Comunque anche se ci troviamo di fronte ad una barriera forte al flusso genico, la diffusione sarà ritardata in maniera proporzionale al vantaggio che conferisce, in termini di fitness dell'ibrido, e alla forza invece della selezione che agisce contro gli eterozigoti e che può prevenire l'incremento percentuale dell'allele favorito a partire da basse frequenze, causando appunto un forte ritardo alla diffusione (Piàlek & Barton 1997). Nel caso di *Speleomantes* i clini non sembrano coincidenti né paralleli e non costituirebbero quindi una barriera tanto forte da permettere la diffusione soltanto di alleli selettivamente vantaggiosi. Quindi nei tre loci ad ampia introgressione gli alleli *bianchii,* che mostrano una spiccata introgressione nelle popolazioni di *italicus*, o

sono neutri (e non linked a loci contro selezionati), oppure conferiscono un certo vantaggio ma soltanto all'interno di *S. italicus.* Poiché gli stessi alleli possono essere favoriti in background genetici differenti (Barton 2001), non si può escludere che gli alleli *bianchii* conferiscano un vantaggio qualora incamerati nel pool genico di *italicus*, in quanto per gli stessi loci ad ampia introgressione gli alleli *italicus* penetrano a loro volta molto meno nelle popolazioni di *bianchii* introgresse. La selezione che sembra agire sulla zona ibrida tra *Speleomantes* sembra quindi essere una selezione endogena. Nelle popolazioni sintopiche, cioè del fronte di contatto, non sono stati trovati ibridi di prima generazione, ma soltanto genotipi fortemente ricombinanti. Sono ipotizzabili due scenari. Il primo vede l'assenza di F1 perché le prime generazioni di progenie ibrida sono contro selezionate a differenza di altre classi di ibridi, come per esempio generazioni più avanzate di Bx. Si conosce ancora poco sui pattern di fitness differenziali dei vari genotipi ibridi, ma non si può escludere che alcuni reincroci avanzati potrebbero godere di un eventuale vantaggio selettivo per esempio in habitat differenti (Barton 2001). Questa ipotesi non sembra verosimile nel nostro caso in quanto le due specie di *Speleomantes* non mostrano esigenze ecologiche differenti, e la zona di contatto si trova in un ambiente abbastanza omogeneo, le Alpi Apuane, costituite da una fitta rete di caverne più o meno interconnesse della stessa origine metamorfica calcarea. Quindi si può escludere anche dal confronto con altre zone di contatto precedentemente descritte (es. *Littorina*, A*mbystoma..*), che la selezione esogena giochi un ruolo primario nella struttura di questa zona ibrida. In uno scenario più verosimile l'assenza di ibridi di prima generazione invece potrebbe dipendere dalle caratteristiche di bassa vagilità di questi animali. Infatti le popolazioni parentali delle rispettive specie si trovano lontano geograficamente dalla zona di contatto e sicuramente si possono escludere fenomeni di migrazioni sulla lunga distanza, quindi le probabilità di accoppiamento tra parentali sono scarsissime come pure la formazione continua di ibridi di prima generazione. Solo le popolazioni del fronte di contatto presentano il "mixing" maggiore con la presenza in percentuale maggiore di individui fortemente ibridi, mentre le altre popolazioni ai lati del fronte di contatto sono costituite soprattutto da backcrosses riferiti alle rispettive specie.

Riassumendo, la zona di contatto qui studiata non è assimilabile ad una zona di tensione, sebbene ne presenti alcune caratteristiche. Come altre zone di tensione presenta variazione clinale delle frequenze alleliche, linkage disequilibria al centro e

selezione contro gli ibridi. La selezione endogena contro i genotipi ibridi tuttavia non è forte, come mostrato da modesti valori di F_{is} , LD e dai backcrosses avanzati di cui sono costituite principalmente le popolazioni introgresse, rispetto agli esempi emblematici esempio *Ensatina,* che presenta elevati valori di F_{is} o B*ombina* (in cui i valori di LD sono alti al centro della zona). La selezione infatti agisce in maniera differenziale ai singoli loci e quindi i clini osservati non sono tutti ugualmente stretti, paralleli e coincidenti (come accade per *Chioglossa*), come invece ci si aspetterebbe nel caso di una zona di tensione, in cui c'è una forte barriera al flusso genico (*Ensatina*). Infatti nel nostro caso l'introgressione è differenziale e asimmetrica ai sette loci discriminanti. Ma la caratteristica principale delle zone di tensione è l'afflusso di parentali verso il centro della zona, a bilanciare la selezione contro gli ibridi. Nel nostro caso non è possibile un long-dispersal dei parentali al centro della zona e infatti c'è assenza completa di ibridi di prima generazione. E' soprattutto per questa carenza, più che per la debole selezione endogena, che la nostra zona non può essere classificata come zona di tensione.

Nonostante il fenomeno dell'introgressione genica, le due specie hanno mantenuto un certo differenziamento sia a livello allozimico sia soprattutto a livello mitocondriale. Al contrario in altri casi di zone ibride fra pletodontidi, per esempio fra *Desmognathus fuscus e D. ochroephaeus* caratterizzati da un differenziamento genico paragonabile a quello tra *S. a. bianchii* e *S. italicus* (D_{nei} 0,458) (Karlin & Guttman 1981), c'è stato un ampio e diffuso "mixing" delle popolazioni di parentali che verosimilmente porterà alla fusione dei taxa ibridanti.

Infatti considerando il marcatore mitocondriale, non c'è praticamente stata introgressione degli aplotipi mitocondriali, probabilmente perché il DNA mitocondriale è soggetto ad una deriva genetica maggiore in quanto è ereditabile solo per via materna e non subisce ricombinazione essendo aploide, ed inoltre la dimensione effettiva di popolazione è ridotta ad un quarto di quella nucleare. La scarsa introgressione del DNA mitocondriale può dipendere anche da comportamento assortativo che è completo quando le femmine di una specie si accoppiano soltanto con i maschi cospecifici, oppure può essere incompleto quando si accoppiano preferenzialmente ma non esclusivamente con i maschi cospecifici e quindi si possono formare ibridi in natura. Infine ci può essere scarsa introgressione di mtDNA quando il dispersal è "sex-biased" ed in particolare a carico dei maschi, come ad esempio nel genere *Salamandra sp.* (Garcìa-Parìs 2003), infatti il DNA mitocondriale

nel caso di un dispersal “male-biased” può indicare un differenziamento tra taxa sebbene ci sia introgressione dei geni nucleari (Hoelzer 1997).

Le popolazioni del fronte di contatto sono, dal punto di vista allozimico, delle popolazioni fortemente ibride ma attribuibili soprattutto a *italicus* per quanto riguarda i geni nucleari; dal punto di vista del DNA mitocondriale due popolazioni (IVA, IIS) presentano aplotipi “*bianchii”,* mentre ICI ha fissato un aplotipo “*italicus”*. Dato che il numero di individui campionati sia ad IIS che ad ICI è sufficiente per poter escludere un errore di campionamento, sembra plausibile che la mancata introgressione degli aplotipi mitocondriali dipenda da un dispersal male-biased. Questo era stato solo ipotizzabile sulla base di studi condotti su singole popolazioni per determinare l’ampiezza dell’home-range, che infatti era risultato più ampio nei maschi che nelle femmine (Pastorelli *et al.* 2002). Quindi è verosimile ipotizzare che i maschi *italicus* si sarebbero incrociati con le femmine *bianchii* nelle popolazioni del fronte di contatto di IIS e IVA. Mentre il dispersal male-biased avrebbe portato poi i maschi *bianchii* in contatto con le femmine di ICI, dove ritroviamo attualmente un singolo aplotipo “*italicus*”. In condizioni di simpatria, dove il numero dei maschi eterospecifici è massimo, si è avuta ibridazione con formazione di individui fortemente ibridi. In questo senso l’ibridazione “interrompe” il dispersal dei parentali e gli individui fortemente ibridi, che si sono formati nelle popolazioni del centro, venendo in contatto con i rispettivi individui parentali ai lati del fronte di contatto, si sarebbero accoppiati formando dei Bx di ennesima generazione. La fertilità dei Bx, o di alcuni Bx (Barton 2001), avrebbe poi permesso l’introgressione degli alleli nei pool genici delle rispettive specie in misura differenziale come precedentemente descritto. La formazione di popolazioni intermedie di Bx, cioè di *bianchii* e *italicus* introgresse, avrebbe impedito infatti il continuo afflusso dei parentali al centro a causa dell’impossibilità di long-distance dispersal. Anche se gli individui ibridi si formano e sono fertili abbiamo visto che il “mixing” non è così agevole, ci sono degli impedimenti di natura endogena alla formazione degli ibridi, e la mancanza di introgressione al mitocondriale sarebbe attribuibile a differenze sex-specific che caratterizzano il dispersal in questi animali.

Riassumendo, sebbene l’introgressione a livello nucleare abbia portato alla formazione di popolazioni ormai fortemente introgresse quali quelle di *italicus* e *bianchii* della zona di contatto, i due taxa avevano già raggiunto al momento del contatto un buon differenziamento a livello nucleare che sembra venir mantenuto

nonostante l'introgressione abbia agito nel senso di una diminuzione delle differenze tra i taxa. Il marcatore nucleare nel mostrare un apprezzabile differenziamento tra i due taxa, coincide infatti con quello mitocondriale. Quest'ultimo mostra la presenza di due linee distinte che probabilmente hanno avuto una storia paleogeografia indipendente e rappresentano degli stadi nel processo di divergenza, avvenuto in allopatria, per il raggiungimento dell'isolamento riproduttivo (Avise & Walker 1998). Nella zona di contatto tra gruppi geneticamente distinti di *Carlia rubrigularis* per esempio, la coincidenza tra marcatori nucleare e mitocondriale ha permesso di avanzare l'ipotesi che il processo di speciazione sia in uno stadio avanzato (Phillips *et al*. 2004). Infatti l'utilizzo soltanto del DNA mitocondriale per valutare i confini tra le specie, non è sufficiente (Jockush & Wake 2002), ma la concordanza di più marcatori è fondamentale per poter inferire sulla tassonomia delle specie, come nel caso della zona di contatto di *Bombina*, sebbene ancora poco si conosca sui geni che causano l'isolamento riproduttivo rispetto al differenziamento, accumulato in allopatria, ad uno o più caratteri tra taxa in via di speciazione (Barton 2001). Quindi sebbene i due taxa ibridanti non abbiano sviluppato ancora delle barriere efficaci di isolamento riproduttivo pre-mating, l'utilizzo di due marcatori e l'analisi dell'introgressione e il confronto con i valori di differenziamento con altre specie di pletodontidi (Arnold *et al*. 1993: Nascetti *et al.* 1996), suggeriscono che *S. a. bianchii* e *S. italicus* siano ormai due specie.

CAP. 6 CONCLUSIONI

I geotritoni sono animali subtroglofili e quindi la loro esistenza è vincolata in massima parte alla presenza di ambienti ipogei con temperatura e umidità pressoché costanti (Lanza *et al*. 1995). Questa caratteristica unita alla bassa vagilità e sicuramente ad un ristretto home range, rende la dinamica di popolazione e quindi la distribuzione geografica di questi animali estremamente condizionata dalle variazioni climatiche. Su scala geologica infatti l'alternanza di periodi glaciali ed interglaciali soprattutto durante il plio-pleistocene, ha fortemente condizionato per non dire modellato, la struttura genetica delle specie continentali del genere *Speleomantes* tra cui anche le specie qui studiate *S. a. bianchii* e *S. italicus* (Forti *et al*. 1998). La dinamica principale è molto verosimilmente quella "flush" e "crush", cioè a contrazioni (crash) delle popolazioni seguono riespansioni (flush) di vario grado secondo l'alternanza dei periodi glaciali ed interglaciali. Durante i primi le popolazioni vengono confinate nei rispettivi rifugi dall'avanzamento dei ghiacciai, e durante gli interglaciali si riespandono dai rifugi in ambienti divenuti più favorevoli. Per *S. a. ambrosii s*ono stati identificati come rifugi glaciali l'Appennino ligure meridionale e per *S. a. bianchii* le Alpi Apuane, considerate area di rifugio anche per altre specie della fauna e della flora (La Greca 1970; Mariotti 1984; Pignatti 1994; Kropf *et al*. 2002). Qualora le divergenze accumulate in allopatria tra le popolazioni confinate nei rispettivi rifugi glaciali, non siano state sufficienti ad evolvere oltre che un differenziamento per diversi caratteri (morfologici, genetici, ecologici, etc..) anche delle efficaci barriere di isolamento riproduttivo pre-copula, in fase di espansione le popolazioni verranno in contatto e ibrideranno dando origine ad una zona ibrida come è molto verosimile sia accaduto tra *S. a. bianchii* e *S. italicus*.

Nella presente tesi sono state studiate 38 popolazioni provenienti da *S. a. ambrosii*, *S. a. bianchii* e *S. italicus*, con lo scopo di determinare i livelli di differenziamento tra questi taxa e descrivere la zona ibrida tra *S. a. bianchii* e *S. italicus.*

In questo studio sono stati utilizzati per le elaborazioni statistiche i dati allozimici prodotti in un precedente lavoro (Cimmaruta 1993), e i dati prodotti nell'ambito della presente tesi di dottorato che si riferiscono a 300 individui studiati mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) e sequenziamento di una porzione di 838bp del mtDNA-Cyt b.

Il differenziamento genetico rilevabile dal dato allozimico tra *S. a. bianchii* e *S. italicus* è abbastanza elevato, corrispondendo ad una distanza di Nei di 0,46 e presentando sette loci discriminanti tra le due specie. Esaminando l'andamento delle frequenze alleliche e dei parametri di variabilità, è stato possibile individuare e caratterizzare una zona di contatto e ibridazione introgressiva tra le due specie. La zona è caratterizzata da una scarsa ampiezza, una ventina di chilometri circa, il cui centro è collocato sulle Alpi Apuane in corrispondenza della località di Cave Henraux (LU). Il fronte di contatto è pure ristretto, ampio circa due chilometri e lungo circa sette in base ai campionamenti finora effettuati. Sebbene ci sia introgressione, le due entità mantengono una distinta caratterizzazione genetica come emerso dall'UPGMA e ancor più dal marcatore mitocondriale, sia RFLP che sequenze. Infatti considerando solo il Cyt b non emerge la presenza della zona di contatto, in quanto non c'è praticamente mai compresenza di aplotipi mitocondriali delle due specie. Soltanto in una delle popolazioni del fronte di contatto (Isolasanta IIS) si assiste alla sintopia di tre aplotipi, due di tipo *ambrosii* e uno di tipo *italicus*. Dal confronto e dall'integrazione dei risultati dei due marcatori è stato possibile ipotizzare in *S. italicus* una dinamica di espansione recente delle popolazioni situate sull'Appennino tosco-emiliano verso sud fino all'Abruzzo. Infatti la ridottissima variabilità genetica che caratterizza le popolazioni più meridionali dell'areale di *S. italicus* corrobora l'idea di una colonizzazione relativamente recente di questa parte dell'areale mediante un'espansione veloce. Anche il network degli aplotipi mostra come, oltre al nucleo isolato sulle Alpi Apuane, corrispondente alle popolazioni introgresse, in realtà tutte le altre popolazioni di *S. italicus* dell'Appennino tosco-emiliano fino all'Abruzzo, che sono la maggior parte, presentano un ridotto numero di aplotipi (soltanto due) caratterizzati da una ridotta variabilità e divergenza. Per *S. a. bianchii* il pattern geografico di distribuzione degli aplotipi ha evidenziato una maggior frammentazione genetica rispetto agli allozimi. Il network degli aplotipi e la loro distribuzione geografica suggeriscono un'espansione verso sud-est che avrebbe portato *S. a. bianchii* in contatto con le popolazioni di *italicus* sulle Alpi Apuane per formare la zona di contatto analizzata.

Per quanto riguarda la struttura della zona di contatto, l'esame della distribuzione delle classi di indice ibrido per popolazione mostra, per le popolazioni del fronte di contatto, una distribuzione unimodale, secondo recenti classificazioni di zone di contatto in uni- e bimodali (Jiggins & Mallet 2000a). Nelle zone ibride unimodali

prevalgono, in ciascuna popolazione, i genotipi ibridi intermedi tra i parentali, mentre in quelle bimodali i genotipi intermedi assomigliano a uno o all'altro dei genotipi parentali. La zona di contatto analizzata sembra essere unimodale dato che nelle popolazioni del fronte di contatto i genotipi intermedi sono costituiti da individui fortemente ibridi come emerge dall'indice di ibridazione e dal test di assegnazione delle classi genotipiche; mentre le popolazioni introgresse *bianchii* e *italicus* ai lati del fronte di contatto sono costituite da individui frutto di generazione di backcrosses avanzati. Nel centro inoltre non sono stati trovati né individui parentali né ibridi di prima generazione.

Esistono un certo numero di zone di contatto con distribuzione unimodale che sono classificate come zone di tensione, che differiscono per il grado di incompatibilità post-mating raggiunto dai taxa venuti in contatto. In queste zone i clini che vengono a formarsi nell'andamento delle frequenze alleliche ai loci discriminanti, rappresentano una barriera al flusso genico la cui forza è indirettamente misurata dalla coincidenza dei clini in un centro comune e da un andamento parallelo, per cui l'inversione delle frequenze alleliche avviene solitamente nel giro i pochi chilometri. L'andamento dei clini riflette l'andamento dell'introgressione e cioè la penetrazione degli alleli da un pool genico all'altro. L'ostacolo all'introgessione è stato stimato sulla base dei disequilibri genetici rilevabili soprattutto nel centro della zona stessa, e cioè sulla base dei linkage disequilibria e dei valori di deficit di eterozigoti. Questi parametri in un certo senso rendono conto dell'entità della selezione endogena che agisce sui genomi nella direzione del mantenimento di un coadattamento genico evolutosi in allopatria all'interno dei genomi stessi e "rotto" dall'ibridazione. Nel nostro caso l'introgressione ai sette loci discriminanti è asimmetrica e cioè gli alleli di *italicus* non riescono a penetrare con facilità nel pool genico di *bianchii*, come emerge anche dai valori di linkage disequilibria e deficit di eterozigoti delle popolazioni della zona di contatto, soprattutto di *bianchii* introgresso appunto. L'introgressione è anche differenziale, cioè i clini hanno un andamento differente ai sette loci che si possono classificare in loci a scarsa o nulla penetrazione, il 58%, e loci ad ampia penetrazione (42%). Una spiegazione possibile è che la selezione agisca in misura variabile sui sette loci determinando un pattern di introgressione asimmetrico e differenziale. Di conseguenza risulta evidente la presenza di un ostacolo al libero rimescolamento dei due pool genici , come confermato dall'osservazione che allontanandosi dalla zona i

valori dei disequilibri decadono coerentemente con l'aumento delle generazioni di backcrosses.

Le zone di tensione sono mantenute da un bilanciamento tra l'afflusso di parentali (e conseguente formazione di ibridi di prima generazione) e la controselezione degli ibridi (Barton 1979; Barton & Hewitt 1985). La zona di contatto e ibridazione qui studiata non può essere classificata come una zona di tensione, sebbene ne presenti alcune caratteristiche come variazione clinale delle frequenze alleliche, deficit di eterozigoti e linkage disequilibria al centro. Il motivo risiede nel fatto che gli individui parentali non possono effettuare long-distance dispersal proprio per la loro bassa vagilità, di conseguenza non si possono continuamente generare individui ibridi di prima generazione nella zona stessa, ma solo individui fortemente ibridi di ennesima generazione, come osservato. Le barriere post mating soprattutto di natura endogena, non mostrano che ci sia, come in altri casi, una forte selezione contro gli ibridi, in quanto la fertilità dei backcrosses ha reso possibile l'introgressione di alcuni alleli a vari loci, soprattutto nel pool genico di *italicus,* anche su lunghe distanze. Tuttavia l'ibridazione non favorisce il completo e neutrale mixing tra le specie, che mantengono un differenziamento genetico sia a livello allozimico che mitocondriale. Nello studio delle zone ibride la concordanza tra marcatori che rilevano differenze nei caratteri tra taxa differenziatisi in allopatria, è fondamentale per poter inferire sulla tassonomia delle specie. Quindi sebbene i due taxa ibridanti non abbiano ancora sviluppato efficaci barriere di isolamento riproduttivo pre-mating, l'asimmetria e differenzialità dell'introgressione e il grado di differenziamento genetico confrontato anche con altre specie di pletodontidi (Nascetti *et al*. 1996), suggeriscono che i due taxa possano essere comunque classificati come specie distinte.

La mancata introgressione a livello mitocondriale d'altro canto sembra attribuibile come dimostrato in altri casi di zone di contatto, ad un dispersal sex-biased ed in particolare a carico dei maschi. Questo fino ad oggi era solo ipotizzabile in *Speleomantes*, sulla base di studi condotti su singole popolazioni con lo scopo di identificare l'home range, che è risultato più ampio nei maschi che nelle femmine (Pastorelli *et al*. 2002)

BIBLIOGRAFIA

Aellen V., 1958 – Sur une nouvelle forme d'*Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) – *Senck. Biol*. 39 :155-163.

Alexandrino J., Froufe E., Arntzen J.W., Ferrand N., 2000 – Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander*, Chioglossa Lusitanica* (Amphibia: Urodela) – *Molecular Ecology* 9: 771-781.

Alexandrino J., Arntzen J.W., Ferrand N., 2002 – Nested clade analisys and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela) – *Heredity* 88: 66-74.

Alexandrino J., Baird S.J.E., Lawson L., Macy J.R., Moritz C. & Wake D.B., 2005 Strong selection against hybrids at a hybrid zone in the *Ensatina* ring species complex and its evolutionary implications – *Evolution* 59(6): 1334-1347.

Anderson E., 1948 – Hybridization of the habitat – *Evolution* 2: 1-9.

Anderson E., 1949 – Introgressive hybridization – *John Wiley and Sons*, New York.

Anderson E.C. & Thompson E.A., 2002 – A Model-Based Method for Identifying Species Hybrids Using Multilocus Genetic Data – *Genetics* 160: 1217-1229.

Anderson E.C. & Thompson E.A., 2003 – New Hybrids vs. 1.1 - From website: http://ib.berkeley.edu/labs/slatkin/eriq/software/software.htm

Arnold M.L., 1992 – Natural hybridization as an evolutionary process – *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 237-261.

Arnold M.L., Hamrick J.L., Bennet B.D., 1993 – Interspecific pollen competition and reproductive isolation in *Iris* – *Journal of Heredity* 84: 13-16.

Arnold M.L. & Hodges S.A., 1995 – Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? – *Trend in Ecology and Evolution* 10: 67-71.

Arnold M.L., 1997 - Natural Hybridization and Evolution - *Oxford University Press*, Oxford. 215 pp.

Arnold M.L., 2004 – Natural Hybridization and the evolution of domesticated, pest and desease organisms – *Molecular Ecology* 13: 997-1007.

Arnold S.J., 1972 - The evolution of courtship behavior in salamanders - *Ph.D. dissertation*, University of Michigan, 570 pp.

Arnold S.J., 1976 - Sexual behavior, sexual interference and sexual defense in the salamanders *Ambystoma maculatum*, *Ambystoma tigrinum* and *Plethodon jordani* - *Z. Tierpsychol* 42: 247-300.

Arnold S.J., 1977 - The evolution of courtship behavior in New World salamanders with some comments on Old World salamandrids - In: Taylor D. H. & S. I. Guttman (Eds) "*The reproductive biology of amphibians"*. Plenum Press Corporation, New York: 141-183.

Arnold S.J., Reagan N.L. & Verrel P.A., 1997 – Reproductive isolation and speciation in plethodontid salamanders – *Herpetologica* 49: 216-228.

Arntzen J.W. & Wallis G.P., 1991 – Restricted gene flow in a moving hybrid zone of the newts *Triturus cristatus* and *Triturus marmoratus* in western France – *Evolution* 45: 805-826

Avise J.C. & Walker D., 1998 – Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process – *Proc. R. Soc. Lond*. B 265: 457-463.

Babik W., Szymura J.M., Rafiski J., 2003 – Nuclear markers mitochondrial DNA and male secondary sexual traits variation in a newt hybrid zone (*Triturus vulgaris* X *T. montandoni*) – *Molecular Ecology* 12(7): 1913-1930.

Baker R.J., Davis S.K., Bradley R.D., Hamilton M.J. & Van Den Bussche R.A., 1989 – Ribosomial-DNA, mithocondrial-DNA, chromosomal, and allozymic studies on a contact zone in the pocket gopher, *Geomys* - *Evolution* 43: 63-75.

Barton N.H., 1979 – The dinamics of hybrid zones – *Heredity* 43: 341-359.

Barton N.H. & Hewitt G.M., 1981 - Hibryd zones and speciation – In: "*Evolution and Speciation",* Essay in honour of M.J.D. White, W.R. Atchley & D.S. Woodruff eds., pp. 109-145. *Cambridge Univ. Press*. Cambridge.

Barton N.H. & Hewitt G.M., 1985 - Analisys of hybrid zones - *Annual review of Ecology and Sistematycs* 16: 113-148.

Barton N.H., 1986 – The effects of linkage and density-dependent regulation on gene flow – *Heredity* 57: 415-426.

Barton N.H., 2000 - Estimating multilocus linkage disequilibria – *Heredity* 84: 373-389.

Barton N. H., 2001 - The role of hybridization in evolution – *Molecular Ecology* 10: 551-568

Batistoni R., Nardi I., Rebecchi L., Nardone L. & A. Demartis, 1991 - A centromeric satellite DNA in the European plethodontid salamanders (Amphibia, Urodela) – *Genome* 34: 1007-1012.

Batistoni R., Pesole G., Marracci S. & I. Nardi, 1995 - A tandemly repeated DNA family originated from SINE-related elements in the European plethodontid salamanders (Amphibia, Urodela) - *J. molecular Evol*., 40: 608-615.

Bazykin A.D., 1969 – Hypothetical mechanism of speciation – *Evolution* 23: 685-687.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F., 2001 - genetix 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations - Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bennuah S.Y., Wang T., Aitken S.N., 2004 - Genetic analysis of the *Piceasitchensis glauca* introgression zone in British Columbia - *Forest Ecology and Management* 197: 65–77

Berg J., 1893 - Der Erdtriton im Terrarium - *Zool. Garten*, Frankfurt am Main, 34 (12): 367-375.

Bertolani-Marchetti D., 1985 - Pollen paleoclimatology in the Mediterranean since the Messinian time - In: Stanley D. J. & Wezel F. C. (eds): "*Geological evolution of the Mediterranean basin",* pp. 525-543, Springer-Verlag; New York.

Bettles C., Docker M.F., Dufour B. & Heath D.D., 2005 - Hybridization dynamics between sympatric species of trout: loss of reproductive isolation - *J. Evol. Biol.* 18: 1220–1233.

Bologna M., 1972 - Osservazioni sull'erpetofauna delle Alpi Liguri - *Hyla* (Notiziario Unione Erpetol. ital.) 2: 19-35.

Bonnet R.M., 2002 – Analysis of the contact zone between the Dusky Salamanders *Desmognathus fuscus fuscus* and *Desmognathus fuscus conanti* (Caudata: Pletodonthidae) – *Copeia* 2: 344-355.

Bruce R.C., 1988 – Life history variation in the salamander *Desmognathus quadramaculatus* – *Herpetologica*, 44: 218-227.

Bruce R.C., 1990 – An explanation for differences in body size between two desmognathine salamanders – *Copeia*: 1-9.

Bruce R.C., 2000 – Sexual size dimorphism in the Plethodontidae - In: Bruce R. C., Jaeger R. G. & Houck L. D., (eds): "*The biology of plethodontid salamanders"*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 485 pp.

Bullini L., Sbordoni V., 1980 - Electrophoretic studies of gene-enzyme systems: microevolutionary processes and phylogenetic inference – *Boll. Zool*. 47 (suppl.) : 95-112.

Bullini L., 1983 – Taxonomic and evolutionary inferences from electrophoretic studies of various animal groups – In: G.S. Oxford e D. Rollinson (eds.): *Protein polymorphism: adaptive an taxonomic significance.* Academic Press, London and New York: 179-192.

Bullini L., 1985 – Speciation by hybridization in animals – *Boll.Zool*. 52: 121-137.

Butlin R., 1989 – Reinforcement of premating isolation – In: *Speciation and its consequences*, (eds. D. Otte & J.A. Endler), pp.158-179, Sinauer, Sunderland, MA.

Caloi L., Kotsakis T. & Palombo M.R., 1986 – La fauna a Vertebrati terrestri del Pleistocene delle isole del Mediterraneo – *Geologica Romana*, Roma, 25: 235-256.

Capanna E., Corti M., Nascetti G., 1985a – Role of the contact area in the chromosomal speciation of the European long-tailed house mouse, *Mus musculus domesticus* - *Acta Zool. Fennica* 170: 115-120.

Capanna E., Corti M., Nascetti G., Bullini L., 1985b - Pre- and post-mating isolating mechanisms in the speciation of the European long-tailed house mouse (*Mus musculus domesticus*) - *Acta Zool. Fennica* 170: 115-120.

Casali S., Suzzi Valli A., Busignani G., Tedaldi G., 2002a - Osservazioni sui costumi “arboricoli” di *Speleomantes italicus* (Dunn 1923) nella Repubblica di San Marino - *Quad. Studi Nat. Romagna*, Cesena, 16: 95-98.

Casali S., Suzzi Valli A., Busignani G. & Tedaldi G., 2002b – Osservazioni sui costumi «arboricoli» di *Speleomantes italicus* (Dunn 1923) nella Repubblica di San Marino - In: Salvidio S. & Pastorino M. V. (Eds), Primo Convegno Nazionale “*Biologia dei Geotritoni europei*, *Genere Speleomantes”,* 26-27 ottobre 2002, Programma e Riassunti, Genova e Busalla.

Cesaroni D., Allegrucci G., Sbordoni V., 1992 - A narrow hybrid zone between two crayfish species from a mexican cave - *Journal of evolutionary Biology* 5: 643-659.

Cherchi M.A., 1952 - Termoregolazione in *Hydromantes genei italicus* Dunn - *Atti Soc. ital. Sci. nat*., Milano, 91(3-4): 201-211

Chippindal P.T., Bonett R.M., Balduin A.S. & Wiens J.J., 2004 – Phylogenetic evidence of the major reversal of life history evolution in plethodontid salamanders – *Evolution* 58: 2809-2822.

Cianchi R., Pecora P., Bullini L., 1986 – Ibridazione naturale e introgressione tra *Chrysolina rossia* e *C. gypsophilae* in Francia meridionale e in Liguria (Coleoptera, Chrysomelidae) – *Atti LI Conv. U.Z. I*., Roma, *Boll. Zool*. 53 (suppl.): 64.

Cianchi R., Ungaro A.; Marini M., Bullini L., 2003 – Differential patterns of hybridization and introgression between the swallowtails *Papilio machaon* and *P. hospiton* from Sardinia and Corsica islands – *Molecular Ecology* 12: 1461-1471.

Cimmaruta R., 1993 – Ricerche di ecologia genetica ed evolutiva in pletodontidi del genere *Speleomantes* (Amphibia – Plethodontidae) – *Tesi di dottorato V ciclo*, Università degli Studi di Parma.

Cimmaruta R., Nascetti G., Forti G., Lanza B., Bullini L., 1998 - Paleogeografia della Sardegna ed evoluzione degli *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, XIX: 183-195.

Cimmaruta R., Forti G., Nascetti G., Bullini L., 1999 – Spatial distribution and competition in two parapatric sibling species of European plethodontid salamanders – *Ethology, Ecology & Evolution* 11: 383-398.

Cimmaruta R., Lanza B., Forti G., Bullini L. & Nascetti G., 2002 – Il Geotritone di Bianchi, nuova sottospecie dello *Speleomantes ambrosii* della provincia di Massa Carrara (Amphibia, Plethodontidae) – In: Salvidio S. & Pastorino M. V. (eds); Primo Congresso Nazionale "*Biologia dei Geotritoni europei,* genere *Speleomantes"*, Genova e Busalla 26-27 ottobre 2002.

Cimmaruta R., Forti G., Lanza B. & Nascetti G., 2005 – The effects of the quaternari glaciations on the genetic structure of S*peleomantes strinatii* (Aellen 1958) (Amphibia, Plethdontidae) – *Annali Mus. Civ. St. nat. G. Doria*, Genova 97: in stampa.

Clement M., Posada D. & Crandall K., 2000 - TCS: a computer program to estimate gene genealogies - *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660.

Cockerham CC, Weir BS, 1979 - Digenic descent measures for finite populations - *Genet. Res*. 30: 121-147.

Colley S.A., Keen W.H. & Reed R.W., 1989 – Effects of adult presence on behaviour and microhabitat use of juveniiles of a Desmognathine salamander – *Copeia* (1): 1-7.

Cruzan M.B., Arnold M.L., 1994 – Assortative mating and natural selection in a *Iris* hybrid zone- *Evolution* 48: 1946-1958.

Darwin C., 1859 – On the origin of the species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life – John Murray, London.

Delfino M., 2002a – Erpetofaune italiane del Neogene e del Quaternario - *Tesi di Dottorato di Ricerca*, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena e Reggio Emilia; 382 pp.

Delfino M., 2002b - Pletodontidi europei: dati paleontologici e considerazioni biogeografiche (p. 12) – In: Salvidio S. & Pastorino M. V. (eds); Primo Congresso Nazionale "*Biologia dei Geotritoni europei*, *Genere Speleomantes"*, Genova e Busalla 26-27 ottobre 2002.

Diesener G. & Reichholf J., 1986 - Lurche & Kriechtiere - Munchen (Mosaik Verlag), 287 pp.

Dixon D., 1997 – DNA for Windows vs. 2.5.1 – from website: http://www.durham.ac.uk/d.p.dixon/dna.htm

Dobzansky T., 1937 – Genetics and the origin of species – *Columbia University Press*, New York.

Dobzansky T., 1940 – Speciation as a stage in evolutionary divergence – *American Naturalist* 74: 312-321.

Dobzansky T., 1970 – Genetics of the evolutionary process – *Columbia University Press*, New York.

Dubois A., 1984 – Miscellania Nomenclatoria batracologica (IV) – *Alytes* 3:103-110.

Dubois A., 1995 – Comments on the proposed conservation of *Hydromantes* Gistel, 1848 (Amphibia, Caudata) by the designation of *Salamandra genei* Temmninck & Schlegel 1838, as the type species – *Bull. Zool. Nomencl*. 52: 340-342.

Dubois A., 1998 – Mapping European amphibians and reptiles: collective inquir and scientific methodology – *Alytes*, Paris, 15 (4): 176-204.

Duelmann W.E. & Trueb L., 1986 – Biology of Amphibians – McGraw-Hill, New York.

Dunn E.R., 1923 – The Salamanders of the Family Plethodontidae – Smith College, Northampton, Massachussets.

Dunn E.R., 1926 – The salamanders of the family Plethodontidae – Smiyh College, Northampton, Mass.

Durand J.P., 1967 - Sur l'ontogenese d' *Hydromantes italicus* Dunn (Urodele, Plethodontidae) - *C. R. hebd. Seanc. Acad. Sci*., Paris, 265: 1533-1535.

Durand J.P., 1970 - Fortpflanzung und Entwicklung von Hydromantes, dem Hohlenmolch - *Aqua Terra*, 7(4): 42-48; 7(5):49-51.

Durand J.P., 1973 - L' *Hydromantes* Reproduction et developpement - Comptes rendus du Quatre- vingt-seizieme Congres National des Societes Savantes, Toulouse 1971. Section des Sciences. 3 (Biologie generale et animale): 267-277.

Durrett R., Buttel L. & Harrison R., 2000 - Spatial model of hybrid zone – *Heredity* 84: 9-19.

Endler J.A., 1973 – Gene flow and population differentiation – *Science* 179: 243-250.

Endler J.A., 1977 - Geographic variation, speciation and clines - *Princeton Univ. Press*. Princeton.

Feder J.H., 1979 – Natural hybridization and genetic divergence between the toads *Bufo boreas* and *Bufo punctatus* – *Evolution* 33: 1089-1097.

Feder J.H., 1983 – Integrating the ecology and physiology of plethodontid salamanders – *Herpetologica*, 39: 291-310.

Felsenstein J., 2005 – Phylip vs. 3.65 the Phylogeny Inference Package – from website: http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html

Fisher R.A., 1937 – The wave of advance of advantageous genes – *Ann. Eugen* 7: 355-369.

Forti G., Cimmaruta R., Nascetti G., Lanza B., Bullini L., 1997 - Parapatria e competizione in pletodontidi del genere *Hydromantes* - *S.It.E. Atti* 18: 121-124.

Forti G., Cimmaruta R., Nascetti G., Lanza B., Bullini L., 1998 – Glaciazioni del Quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia – Plethodontidae) – *Biogeografia* XIX: 197-212.

Forti G., Cimmaruta R., Bullini L. & Nascetti G., 2002 – Risposta ecologica alle variazioni stagionali in popolazioni di *Speleomantes strinatii* e *S. ambrosii* – p. 14. In: Salvidio S. & Pastorino M. V. (Eds) - Primo Convegno Nazionale "*Biologia dei Geotritoni europe*i, g*enere Speleomantes"*, Genova e Busalla 26-27 ottobre 2002.

Forti G., Cimmaruta R., Bullini L. & Nascetti G., 2005 - Behavioural responses to seasonal variations of autoecological parameters in population of *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) and *S. ambrosii* (Lanza, 1955) (Amphibia, Plethodontidae) – *Annali Mus. Civ. St. nat. G. Doria*, Genova 97: in stampa.

Freytag G.E., 1967 - Klasse Amphibia-Lurche (Ordnung Gymnophiona - Blindwühlen. Ordnung Caudata-Schwanzlurche) - In: Urania Tierreich (vol: Fische, Lurche, Kriechtiere) - *Leipzig, Jena & Berlin (Urania Verlag)*: 252-291.

Frykman I., Bengtsson B.O., 1984 - Genetic differentiation in *Sorex.* Electrophoretic analisys of a hybrid zone between two karyotipyc races in *Sorex araneus* - *Hereditas* 100: 259-270.

Fuerst G.S. & Austin C., 2004 – Population Structure of the Prairie Skink (*Eumeces septentrionalis*): Nested Clde Analysis of Post Pleistocene Populations – *Journal of Herpetology* 38 (2): 257-268.

Garcìa-Parìs M., Good D.A., Parra-Olea G., & Wake D.B., 2000 – Biodiversity of Costa Rican salamanders: Implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation – *Evolution* 97(4):1640-1647.

Garcìa-Parìs M., Alcobendas M., Bukley D, Wake DB, 2003 – Dispersal viviparity across a contact zones in Iberian populations of fire salamanders (*Salamandra*) inferred of discordant and morphological traits - *Evolution* 57: 129-143.

Gee J.M., 2005 - No species barrier by call in an avian hybrid zone between California and Gambel's quail (*Callipepla californica* and *C. gambelii*) – *Biological Journal of the Linnean Society* 86: 253-264.

Gorman J., 1964 – *Hydromantes* Gistel, web-toed salamanders - In: Riemer W.J. (ed.) *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Kensington, Maryland.

Grant V., 1963 – The origin of adaptations – *Columbia University Press*, New York.

Grant B.R. & Grant P.R., 1996 – High survival of Darwin's Finch hybrids: effects of beak morphology an diets – *Ecology* 77: 500-509.

Gregory P.G. & Howard D.J., 1994 – A postinsemination barrier to fertilization isolates two closely related ground crickets – *Evolution* 48: 705-710.

Haavie J., Borge T., Bues S., Garamszegi S.Z., Lampe H.M., Moreno J., Qvarnstro A., Torok J. & Setre G.P., 2004 - Flycatcher song in allopatry and sympatry, convergence, divergence and reinforcement – *J. Evol. Biol*. 17: 227-237.

Hanken J., 1980 – Morphological and genetic investigations of miniaturization in salamanders (genus *Thorius*) – *P.h.D. dissertation,* Univ of California, Berkeley pp. 314.

Hanken J., 1983 – Genetic variation in a dwarfed lineage, the Mexican salamander genus *Thoriusrius* (Amphibia – Plethodontidae): taxonomic, ecologic and evolutionary implications – *Copeia* 4: 1051-1073.

Harrison R.G. & Arnold J., 1982 – A narrow hybrid zone between closely related cricket species – *Evolution* 36: 535-552.

Harrison R.G., 1986 – Pattern and process in a narrow hybrid zone – *Heredity* 56: 337-349.

Harrison R.G. & Rand D.M., 1989 – Mosaic hybrid zones and the nature of the species boundaries – In: "*Hybrid zones and the evolutionary process"* (ed. Harrison R.G.), pp. 111-133.

Harrison R.G., 1990 – Hybrid zones: windows on evolutionary process – *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7: 69-128.

Harrison R.G., 1993 - Hybrids and hybrid zones: historical perspective - In *Hybrid zones and the evolutionary process* (ed. R.G. Harrison), pp. 3-12, *Oxford University Press*, Oxford.

Harrison R.G. & Bogdanowicz S.M., 1997 – Pattern of variation and linkage disequilibrium in a field cricket hybid zone – *Evolution* 51: 493-505.

Hauffe H.C., Fraguedakis-Tsolis S., Mirol P.M., Searle J.B., 2002 – Studies of mitochondrial DNA, allozyme an morphometric variation in a house mouse hybrid zone – *Genetical Research* 80 (2): 117-129.

Hewitt G.M., 1986 – The structure and maintenance of hybrid zones, with some lessons to be learnt from alpine grasshoppers - In: "*Reunion sobre Ortopteros"*, J. Gosalvez, C. Lopez-Fernandez & C.Garcia eds., Madrid.

Hewitt G.M., 1987 – Speciation in the Orthoptera – insight from hybrid zones. In: *Evolutionary Biology of Orthopteroid insects*, B.Baceti ed., Ellis Horwood Publishers Chichester. Halsted Press. New York Chichester Brisbane Toronto.

Hewitt G.M, 1993 – After ice age: *parallelus* meet *erythropus* in the Pyrenees - In: "*Hybrid zones and the evolutionary process* " (ed. R.G. Harrison), pp. 140-164. *Oxford University Press*, Oxford.

Hewitt G.M, 1995 - Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation - Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, NR4 7TJ.

Hewitt G.M, 2001 - Speciation, hybrid zones and phylogeography, or seeing genes in space and time – *Molecular Ecology* 10: 537-549.

Hewitt G.M, 2004 – Review**:** The structure of biodiversity, insights from molecular phylogeography – *Frontiers in Zoology* I: 4.

Highton R., 1979 – A new cryptic species of salamanders of genus *Plethodon* from the southern United States (Amphibia – Pltehodontidae) – *Brimleyana*, 1: 31-36.

Hoelzer G.A., 1997 – Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees revisited – *Evolution* 51: 622-626.

Hom C.L., 1987 - Reproductive ecology of female dusky salamanders, *Desmognathus fuscus* (Plethodontidae), in the southern Appalachians - *Copeia* :768-777. This article is included in a complete issue of this journal.

Houck L.D., Bell A.M., Reagan-Wallin N.L., Feldhoff R.C., 1998 - Effects of experimental delivery of male courtship pheromones on the timing of courtship in a terrestrial salamander, *Plethodon jordani* (Caudata: Plethodontidae) – *Copeia* 1: 214-219. This article is included in a complete issue of this journal

Howard D.J., 1982 – Speciation and coexistence in a group of closely related groundi crickets – *Ph.D. dissertation*. Yale University, New Haven.

Howard D.J., 1986 – A zone of overlap and hybridization between two ground crickets species – *Evolution* 40: 34-43.

Howard D.J. & Gregory P.G., 1993 – Post-insemination signalling systems and reinforcement – *Philosofical Transactions of the Royal Society of London B* 340: 231-236.

International Commission on Zoological Nomenclature, 1997 – Opinion 1866. *Hydromantes* Gistel, 1848 (Amphibia, Caudata): *Spelerpes platycephalus* Camp, 1916 designated as the type species – *Bull. zool. Nom.*, 54: 72-74.

Jackman T.R., Applebaum G., Wake D.B., 1997 – Phylogenetic relationships of Bolitoglossine salamanders: a demonstration of the effects of combining morphological and molecular data sets – *Mol. Biol. Evol*. 14: 883-891.

Jaeger R.G., 1980 – Fluctuations in prey availability and food limitation for a terrestrial salamander – *Oecologia* , Berlin, 44: 335-341.

Jiggins C.D., McMillan W.O., Neukirchen W. & Mallet J., 1996 – What can hybrid zones tell us about speciation? The case of *Heliconius erato* and *H. himera* (Lepidoptera: Nymphalidae) – *Biological Journal of the Linnean Society*; 59:221-242.

Jiggins C.D., McMillan W.O., King P. & Mallet J., 1997 – The maintenance of species differences across a *Heliconius* hybrid zone – *Heredity* 79: 495-505.

Jiggins C.D. & Mallet J., 2000a – Bimodal Hybrid Zones and Speciation – *Trends Ecol. Evol*. 15: 250-255

Jiggins C.D. & Mallet J., 2000b – Reply from C.D. Jiggins and J. Mallet - *Tree* 15(11): 469.

Jockusch E.L. & Wake D.B., 2002 - Falling apart and merging: diversification of slender salamanders (Plethodontidae: Batrachoseps) in the American West - *Biol. J. Linn. Soc*. 76: 361-391.

Jones T.R. & Collins J.P., 1992 – Analisys of a hybrid zone between subspecies of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) in central New Mexico, USA – *J. evol. Biol.* 5: 375-402.

Karlin A.A. & Guttman S.I., 1981 - hybridization between *Desmognatus fuscus* and *D. ochrophaeus* (Amphibia – Urodela - Plethodontidae) in northeastern Ohio and northwestern Pennsylvania - *Copeia* :371-377.

Key K.H.L., 1968 – The concept of stasipatric speciation – *Systematic Zoology* 17: 14-22.

Key K.H.L., 1974 – Speciation in the Australian morabine grasshopper: taxonomy and ecology – In: *Genetic Mechanisms of Speciation*, M.J.D. White ed., pp. 43-56. New Zealand Book, Sidney.

King T.M., Kennedy M., Wallis G.P., 2003 – Phylogeographic genetic analisys of the alpine weta, *Hemideina maori*: evolution of a colour polymorphism and origins of a hybrid zone – *Journal of the Royal Society of New Zealand* 33(4): 715-729.

Koopman K.F., 1950 – Natural selection for reproductive isolation between *Drosophila pseudoobscura* e *Drosophila persimilis* – *Evolution* 4: 135-148.

Kropf M., Kadereit J.W. & Comes H.P., 2002 – Late Quaternary distributiional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllus montana* L. (Fabaceae) inferred fron ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers – *Molecular Ecology* 11: 447-463.

Kruuk L.E.B., Baird S.J.E., Gale K.S., Barton N.H., 1999 – A comparison of multilocus clines maintained by environmental adaptation or by selection against hybrids – *Genetics* 153: 1959-1971.

Kumar R.S., Tamura K., Jakobsen I.B. & Nei M., 2001 - MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software - Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

La Greca M., 1970 – Punti di vista sull storia e sul popolamento animale e vegetale delle Alpi Apuane - emersi in occasione del XVI Congresso della *S.B.I. Lav. Soc. Ital*. *Biogeog*. (n.s.), I: 741-754.

Lande, R. 1992 - Neutral theory of quantitative genetic variation in an island model with local extinction and colonization - *Evolution* 46:381–389.

Lanza B., 1955 – Notizia sulla distribuzione in Italia del geotritone (*Hydromantes italicus* Dunn) e descrizione di una nuova razza (Amphibia, Plthodontidae) – *Archo. Zool. Ital*. 39: 145-160.

Lanza B. & Vanni S., 1981 – On the Biogeography of plethodontid salamanders (Amphibia – Caudata) with a description o a new genus – *Monitore Zool. Ital*., 15: 117-121.

Lanza B., Nascetti G., Bullini L., 1982 – Tassonomia biochimica del genere *Hydromantes* (Amphibia: Plethodontidae) - *Boll. Zool*. 49 (suppl.): 103.

Lanza B., Nascetti G., Bullini L., 1986 – A new species of *Hydromantes* from eastern Sardinia and its genetic relantionships with the other Sardinian pethodontids (Amphibia Urodela) – *Boll. Mus. reg. Sci. Nat*. Torino, 4(1): 261-289.

Lanza B., 1986a - L'ambiente naturale in Sardegna (Elementi di base per la conoscenza e la gestione del territorio) – Camarda I., Falchi S., Nudda G., eds, Sassari, Carlo Delfino Editore. pp. 289-321

Lanza B., 1986b – I Rettili e gli Anfibi – In: "*L'ambiente naturale in Sardegna (Elementi di base per la conoscenza e la gestione del territorio)*" - Camarda I., Falchi S., Nudda G., eds, Sassari, Carlo Delfino Editore. pp. 289-321 + 549-550.

Lanza B., Caputo V., Nascetti G. & Bullini L., 1995 – Morphologic and genetic studies of the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) – Museo Regionale di Scienze Naturali, *Monografie XVI* – Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, 368 pp.

Lanza B., 1999a - Plethodontidae-Lungenlose Salamander. *Speleomantes* (Dubois, 1984)-Europaische Höhlensalamander. *Speleomantes ambrosii* (Lanza,1955) - Ambrosis Höhlensalamander. *Speleomantes flavus* (Stefani,1969)-Monte-Albo-Höhlensalamander. *Speleomantes genei* (Temminck und Schlegel,1838) - Genés Höhlensalamander. Speleomantes *imperialis* (Stefani,1969)-Duftender Hölensalamander. *Speleomantes italicus* (Dunn,1923) - Italienischer Höhlensalamander (pp. 77-173). In: Grossenbacher K. & Thiesmeier B. (eds) - Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Band 4/1, Schwanzlurche (Urodela)

I (Hynobiidae, Proteidae, Plethodontidae, Salamandridae I: *Pleurodeles, Salamandrina, Euproctus, Chioglossa, Mertensiella*). AULA Verlag, Wiesbaden, 407 pp.

Lanza B., 1999b - *Speleomantes flavus* (Stefani, 1969) – Monte-Albo-Höhlensalamander - pp. 137-144. In: Grossenbacher K. & Thiesmeier B., (eds) - Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas; Band 4/I Schwanzlurche (Urodela) I (Hynobiidae, Proteidae, Plethodontidae, Salamandridae I: *Pleurodeles, Salamandrina, Euproctus, Chioglossa, Mertensiella*) - AULA-Verlag, Wiesbaden; 407 pp.

Lanza B., Leo P., Forti G., Cimmaruta R., Caputo V. & Nascetti G., 2001 - Descrizione preliminare dello *Speleomantes imperialis sarrabusensis* subsp. n. (Amphibia: Caudata: Plethodontidae) - *Atti 3° Congresso nazionale SHI* (Pavia, 2000), *Pianura*, 13: 83-84.

Lanza B., Cimmaruta R., Laghi P. & Pastorelli C., in prep. - A review of the systematics, taxonomy, biogeography and biology of the genus *Speleomantes* (Amphibia – Caudata - Plethodontidae) – in preparazione.

Larson A. & Wilson A.C., 1989 – Patterns of ribosomal RNA evolution in salamanders – *Mol. Biol. Evol.* 6: 131-154.

Larson A., 1990 – A molecular perspective on the evolutionary relationship of the salamanders families – *Evol. Biol*. 23: 211-277.

Laurent R.F., 1986 - Sous classe des Lissamphibiens (Lissamphibia). Systématique - In: Grassé P. & M. Delsol (Eds):*Traité de zoologie. Anatomie, systematique, biologie.* Paris (Masson) - Tome 14 (fascicule I B) Batraciens: 594-797.

Lein M.R. & Corbin K.W., 1990 – Song and plumage phenotypes in a contact zone between subspecies of the White-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys*) – *Canadian Journal of Zoology* 68(12).

Littlejohn M.J. & Watson G.F., 1985 - Hybrid zones and homogamy in Australian frogs - *Ann. Rev. Ecol. Syst*. 16: 85-112.

Louise S.M., Tilley S.G., Katz L.A., 2001 – Genetic structure of the blue ridge dusky salamander (*Desmognathus orestes*): inferences from allozymes, mitochondrial DNA, and behaviour – *Evolution* 55(11): 2287-2302.

Mariotti M., 1984 – Flora endemica ligustica del piano basale: rapporti tra settore alpico e appenninico – *Lav Soc. Ital. Biogeog. (n.s.)*, IX: 175-210.

McCallum C.J., Nurnberger B., Barton N.H., Szymura J.M., 1998 – Habitat preference in the *Bombina* hybrid zone in Croatia – *Evolution* 52: 227-239.

May R.M., Endler J.A., McMurtrie R.E., 1975 – Gene frequency clines in the presence of selection opposed by gene flow – *American Naturalist* 109: 659-676.

Mayr E., 1942 - Systematics and the origin of species - *Columbia University Press*, New York.

Mayr E., 1963 - Animal species and Evolution - *Belknap Press*, Cambridge, MA.

Mazzoglio P. & Arzone A., 1993 – Hybrid zones between *Zyginidia pullula* (Boh) and *Z. ribauti* Dwor. In the Ligurian Alps and Appennines (Rynchhota Auchenorrhyncha) – *Proc. 8th Auch. Congr. Delphi* (Drosopoulos *et al*., eds.): 100-102.

Min M.S., Yang S.Y., Bonett R.M., Vieites D.R., Brandon R.A. and Wake D.B., 2005 – Discovery of the first Asian plethodontid salamander – *Letters to Nature* 435: 87-90.

Moore W.S., 1977 - An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates - *Q. Rev. Biol*. 52: 263-277.

Moore W.S. & Buchanan D.B., 1985 - Stability in the northern flicker hybrid zone in historical times: implications for adaptative speciation theory - *Evolution* 39: 135-151.

Moore W.S. & Price J.T., 1993 - Nature of selection in the northern flicker hybrid zone and its implications for speciation theory - In *hybrid zones and the evolutionary process* (ed. R.G. Harrison), pp. 196-225, *Oxford University Press*, Oxford.

Morisi A., 1981 - Osservazioni sulla dieta in natura del geotritone *Hydromantes* italicus Dunn. (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Rivista piemontese di Storia naturale* 2: 79-87.

Moritz C., Schneider C.J., Wake D.B., 1992 - Evolutionary relationships whitin the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation - *Sys. Biol*. 41: 273-291.

Mueller R.L., Macey J.R., Jaekel M., Wake D.B. & Boore J.L., 2004 - Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes – *Evolution* 101(38): 13820-13825.

Muller J., 1998 - Genetic population structure of two cryptic Gammarus *fossarum* types across a conctat zone - *Journal of Evolutionary Biology* 11: 79-101.

Nardi I., 1991 - Cytogenetics of the European plethodontid salamanders, genus *Hydromantes* - In: GREEN D. & S. K. SESSION (Eds), "*Amphibian cytogenetics and evolution"*. San Diego, California (Academic Press Inc), 456 pp.

Nardi I., Battistoni R., Marracci S., Lanza B., 1999 – Ripetitive DNA components of the large *Hydromantes* genome: phylogenetic and molecular aspects – *Herpetologica* 55: 131-139.

Nascetti G., Cimmaruta R., Lanza B., Bullini L., 1996 - Molecular taxonomy of European Plethodontid salamanders (genus *Hydromantes*) - *J. Herpetol.* 30: 161-183.

Nei M., 1972 - Genetic distance between populations - *Am. Nat.* 106: 283-292.

Nei M., 1975 - Molecular populations genetics and evolution - *North-Holland Publ. Comp*., Amsterdam-Oxford.

Nei M., 1987 - Molecular Evolutionary Genetics - *Columbia Univ. Press*, New York.

Ovaska K., 1989 - Pheromonal divergence between populations of the salamander *Plethodon vehiculum* in British Columbia – *Copeia* (3): 770-775.

Parra-Olea G. & Wake D.B., 2001 - Extreme morphological and ecological homoplasy in tropical salamanders - *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 98: 7888-7891.

Pastorelli C., Laghi P. & Scaravelli D., 2001 - Studi preliminari sull'ecologia di *Speleomantes italicus* (Dunn 1923) nell'Appennino tosco-romagnolo (Caudata: Plethodontidae) – pp. 347-351. In: Barbieri F., Bernini F. & Fasola M. (Eds), *Atti 3° Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica* (Pavia, 2000), Pianura, Cremona, 13: 360 pp.

Pastorelli C., Laghi P. & Scaravelli D., 2002 - Seasonal activity and spatial distribution of a *Speleomantes italicus* population in a natural cave - *Biota* 3/1-2: 119-126.

Pastorino M.V., Salvidio S., Tavano M., 1997 - La stazione biospeleologica di San Bartolomeo (Savignone, GE) – pp. 47-50. In: *Atti XVII Congresso Nazionale di Speleologia* (Settembre 1994), Castelnuovo Garfagnana.

Phillips B.L., Baird S.J.E., Moritz C., 2004 – When vicars meet: a narrow contact zone between morphologically cryptic phylogeographic lineages of the rainforest skink, *Carlia rubrigularis* – *Evolution* 58(7): 1536-1548.

Piàlek J. & Barton N.H., 1997 – The spread o an advantageous allele across a barrier: the effects of a random drift and selection against heterozygotes - *Genetics* 145: 493-504.

Pignatti S., 1994 – Ecologia del paesaggio – Utet, Torino.

Porter A.H., Wenger R., Geiger H., Scholl A., Shapiro A.M., 1997 – The *Pontia daplidice/edusa* hybrid zone in northwestern Italy – *Evolution* 51(5): 1561-1573.

Puddu F. & Viarengo M., 1988 - Animali di Sardegna. Gli Anfibi e i Rettili - Cagliari (Edizioni della Torre) 189 pp.

Raymond M. & Rousset F., 1995 - GENEPOP (version 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenicism - *J. Heredity*. 86: 248-249.

Redenbach Z. & Taylor E.B., 2003 - Evidence for bimodal hybrid zones between two species of char (Pisces: *Salvelinus*) in northwestern North America - *J. Evol. Biol.* 16: 1135–1148.

Remington C.L., 1968 - Suture zones of hybrid interaction between recently joined biotas - *Evol. Biol*. 2: 321-428.

Riberon A., Miaud C., Grossenbacher K., Taberlet P., 2001- Phylogeography of the Alpine salamander, *Salamandra atra* (Salamandridae) and the influence of Pleistocene climatic oscillations on population divergence – *Short Communication Molecular Ecology* 10: 2555-2560.

Roe B.A., Ma D.P., Wilson R.K., Wong J.F., 1985 – The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial DNA genome - *J. Biol. Chem*., 260: 9759-9774.

Rogers J.S., 1972 - Mesures of genetic similiarity and genetic distance - In: *Studies in genetics*, VII. Univ. Tex. Publ. 7213: 145-153.

Rolàn-Alvarez, E., K. Johannesson & J. Erlandsson, 1997 - The maintenance of a cline in the marine snail *Littorina saxatilis*: the role of home site advantage and hybrid fitness - *Evolution* 51:1838-1847.

Ross C.L. & Harrison R.G., 2002 – A fine-scale spatial analisys of the mosaic hybrid zones between *Gryllus firmus* and *Gryllus pennsylvanicus* – *Evolution* 56(11): 2296-2312**.**

Roth G. & Wake D.B., 1983 - Lungenlose salamander, biologen studieren eine merkwurdige Tiergruppe - *Bild der Wissenshaft* 2: 124-128.

Rozas J., Sànchez-Delbarrio J.C., Messeguer X. & Rozas R., 2003 - DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods - *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Rubidge E. & Taylor E., 2004 - Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus*

clarki lewisi) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*) – *Molecular Ecology* 13: 3735-3749.

Ruggi A., Cimmaruta R., Forti G., Bullini L., Nascetti G. & Lanza B., 2002 – Analisi di una zona ibrida tra *Speleomantes italicus* e *S. ambrosii* sulle Alpi Apuane (Toscana), mediante marcatori nucleari e mitocondriali – In: Salvidio S. & Pastorino M. V. (eds); Primo Congresso Nazionale "*Biologia dei Geotritoni europei*, *genere Speleomantes"*, Genova e Busalla 26-27 ottobre 2002.

Ruggi A., Cimmaruta R., Forti G. & Nascetti G., 2005 – Preliminary study o a hybrid zone between *Speleomantes italicus* (Dunn 1923) and *Speleomantes ambrosii* (Lanza 1955) on the Apuan Alps, using RFLP analysis (Amphibia, Plethodontidae) - *Annali Mus. Civ. St. nat. G. Doria*, Genova 97: in stampa.

Sage R.D. & Selander R.K., 1979 – Hybridization between species of the *rana pipiens* complex in Central Texas – *Evolution* 33:1069-1088.

Sage R.D., Whitney J.B. III, Wilson A.C., 1986 - Genetic analysis of a hybrid zone between *domesticus* and *musculus* mice (*Mus musculus* complex): Hemoglobin ploimorphins - *Current topics in Microbiology and Immunology* 127: 75-85.

Salomon M. & Hemim Y., 1992 – Song variation in the Chiffchaffs (*Phylloscopus collybita*) of the Western Pyrenees contact zone between the *collybita* and *brehmii* forms – *Ethology* 92(4).

Salvidio S., 1990 - Régime alimentaire d'une population épigée de *Speleomantes ambrosii* (Caudata, Plethodontidae) de la Ligurie centrale (Italie septentrionale) - *Bull. Soc. herp. Fr*. 54: 69-72.

Salvidio S., 1991 - Habitat ed attività stagionale delle popolazioni interstiziali di *Speleomantes ambrosii* nell'Alta Val Bisagno (Liguria centrale) - *Riv. piem. St. nat*., Carmagnola 12: 69-74.

Salvidio S., 1992 - Diet and food utilization in a rockface population of *Speleomantes ambrosii* (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Vie et Milieu* 42 (1): 35-39.

Salvidio S., 1993 - Life history of the European plethodontid salamander *Speleomantes ambrosii* (Amphibia, Caudata) - *Herp. J*. 3: 55-59.

Salvidio S., Lattes A., Tavano M. & Melodia F., 1994 - Ecology of a *Speleomantes ambrosii* population inhabiting an artificial tunnel - *Amphibia-Reptilia* 15 (1): 35-45.

Salvidio S., 1995 - Comments on the proposed conservation of *Hydromantes* Gistel, 1848 (Amphibia, Caudata) by the designation of *Salamandra genei* Temmninck & Schlegel, 1838 as the type species – *Bull. Zool. Nomencl*. 52: 339-340.

Salvidio S., 1996 - L'ecologia dei Pletodontidi europei: stato delle ricerche sul geotritone *Speleomantes ambrosii* - Studi trentini Sci. Nat., *Acta biologica* 71:133-136.

Salvidio S., 1998 - Estimating abundance and biomass of a *Speleomantes strinatii* (Caudata, Plethdontidae) population by temporary removal sampling - *Amphibia-Reptilia* 19(2): 113-124.

Salvidio S., 2001 - Estimating terrestrial salamander abundance in different habitats: efficiency of temporary removal methods - *Herpetological Review* 32(1): 21-24.

Salvidio S. & Pastorino M.V., 2002 – Spatial segregation in the European plethodontid Speleomantes strinatii in relation to age and sex – *Amphibia-Reptilia* 23: 505-510.

Schilthuizen M., 2000 – Bimodal hybrid zones and the scale of a snail – *Tree* 15 (11): 469.

Schilthuizen M. & Lombaerts M., 1995 – Life on the edge: a hybrid zone in Albinaria hippolity from Crete – *Biol. J. Linn. Soc*. 54: 111-138.

Seehausen O., 2004 – Hybridization and adaptative radiation – *Trends in Ecology and Evolution* 19(4): 198-207.

Sequeira F., Alexandrino J., Rocha S., Arntzen J.W. and Ferand N., 2005 - Genetic exchange across a hybrid zone within the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* – *Molecular Ecology* 14: 245-254.

Serra G.P., 1968 - Alcuni dati sulla riproduzione dell' *Hydromantes genei* - *Boll. di Zool.*, Perugia, 35(4): 439-440.**Shaffer H.B. & McKnight M.L., 1996** – The polytypic species revisited: genetic differentiation and molecular phylogenetics of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Amphibia, Caudata) complex – *Evolution* 50: 417-433.

Shaw D.D., Coates D.J., Wilkinson P., 1986 – Estimating the genetic and chromosomal components of reproductive isolation within and between subspecies of the grasshopper *Caledia captiva* – *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 28: 686-695.

Sites J.W.Jr., Morando M., Highton R., Huber F. and Jung R.E., 2004 – Phylogenetic Relationships of The Endangered Shenandoah Salamander (*Plethodon Shenandoah*) and Other Salamanders of the *Plethodon cinereus* Group (Caudata: Plethodontidae) – *Journal of Herpetology* 38(1): 96-105.

Slatkin M., 1973 – Gene flow and selection in a cline – *Genetics* 75: 733-756.

Smith H.M. & Wake D.B., 1993 – Case 2868. *Hydromantes* Gistel, 1848 (Amphibia, Caudata): proposed designation of *Salamandra genei* Temmninck & Schlegel, 1838 as the type species – *Bull. Zool. Nomencl*. 52: 267-269.

Smith H.M., Wake D.B., Jennings M.R., 1995 - Comments on the proposed conservation of *Hydromantes* Gistel, 1848 (Amphibia, Caudata) by the designation of *Salamandra genei* Temmninck & Schlegel, 1838 as the type species – *Bull. Zool. Nomencl*. 52: 267-269.

Smith H.M., Wake D.B., Jennings M.R., 1996 - Comments on the proposed conservation of *Hydromantes* Gistel, 1848 (Amphibia, Caudata) by the designation of *Salamandra genei* Temmninck & Schlegel, 1838 as the type species – *Bull. Zool. Nomencl*. 53: 48.

Sokal R.R. & Sneath P.H.A., 1963 - Principles of Numerical Taxonomy - *Freeman & Co.,* San Francisco.

Sondaar P.Y., Boer P.L. (de), Sanges M., Kotsakis T. & Esu D., 1984 – First report on a Paleolithic culture in Sardinia – *British Archaeological Reports Int. Series*, 229: 29-47.

Stefani R., 1969 – La distribuzione geografica e l'evoluzione del geotritone sardo (*Hydromantes genei* Schleg.) e del geotritone continentale europeo (*Hydromantes italicus* Dunn) – *Arcgo. Zool. Ital*. 53: 207-244.

Streiff R., Veyrier R., Audiot P., Meusnier S. and Brouat C., 2005 – Introgression in natural populations of bioindicators: a case study of *Carabus splendens* and *Carabus punctatoauratus* – *Molecular Ecology* 14: 3775-3786.

Swofford D.L., Selander R.B., 1981 - Biosys-1: a Fortran programe for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics - *J. Heredity* 72: 281-283.

Szymura J.M. & Barton N.H., 1986 – Genetic analisys of hybrid zone between two fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *Bombina variegata* near Cracow in southern Poland – *Evolution* 40: 1141-1159.

Szymura M.J. & Barton N.H., 1991 – The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata:* comparisons between transect and between loci – *Evolution* 45: 237-261.

Szymura M.J., 1993 – Analisys of hybrid zones with *Bombina* – In: "*Hybrid Zones and the evolutionary Process"* (ed. Harrison R.).

Szymura M.J., Uzzel T., Spolsky C., 2000 – Mitochondrial DNA variation in the hybridizing fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *Bombina variegata* – *Molecular Ecology* 9:891-899.

Temminck C.J. & Schlegel H., 1838 – Reptilia - In: Siebold Ph. Fr. (ed.), *Fauna Japonica* (1833-1838):1-114. Lugdunum Batavorum.

Templeton A.R., Crandall K.A., Sing C.F., 1992 - A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. III. Cladogram estimation – *Genetics* 132: 619-633

Templeton A.R., 1998 – Nested Clade Analysis o Phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history – *Molecular Ecology* 7: 381-397.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewiniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G., 1997 - The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools - *Nucleic Acids Res*., 24: 4876-4882.

Vines T.H., Kolher S.C., Thiel M., Ghira I., Sands T.R., MacCallum C.J., Barton N.H., 2003 – The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* - *Evolution* 57: 1876-1888.

Virdee S.R. & Hewitt G.M., 1994 – Clines for hybrid dysfunction in a grasshopper hybrid zone – *Evolution* 48: 392-407.

Voesenek L.A.C., Van Rooy P.T.J.C. & Strijbosch H., 1987 - Some autoecological data on the urodeles of Sardinia - *Amphibia-Reptilia* 8: 307-314.

Wake D.B., 1966 - Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, Family Plethodontidae - *Mem. South. California Acad. Sci*. 4: 1-111.

Wake D.B. 1981 - The application of allozyme evidence to problems in the evolution of morphology, pp. 257-270. In: "*Evolution Today"*. *Proceedings of the Second International Congress of Systematic and Evolutionary Biology* (G. G. E. Scudder and J. L. Reveal, eds.). Carnegie-Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania.

Wake D.B., Roth G. & Wake M.H., 1983 - On the problem of stasis in organismal evolution - *J. Theor. Biol*. 101: 211-224.

Wake D.B. & Larson A., 1987 - Multidimensional analysis of an evolving lineage - *Science* 238: 42-48.

Wake D. B. 1991 - Homoplasy: the result of natural selection, or evidence of design limitations? - *Amer. Nat.* 138: 543-567.

Wake D.B. & Hanken. J., 1996 - Direct development in the lungless salamanders: what are the consequences for developmental biology, evolution and phylogenesis? - *Int. J. Dev. Biol*. 40: 859-869.

Wake D.B. & Campbell J.A., 2001 – An aquatic plethodontid salamander from Oaxaca, Mexixo – *Herpetologica* 57(4): 509-514.

Weir B.S., 1979 - Inferences about linkage disequilibrium - *Biometrics* 35: 235-254.

Weisrock D.W., Kozak K.H. & Larson A., 2005 - Phylogeographic analysis of mitochondrial gene flow and introgression in the salamander, *Plethodon shermani* – *Molecular Ecology* 14: 1457-1472.

White M.G.D. & Contreras N., 1979 – Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (f. Moraba) *virgo* and its bisexual relatives. V. interactions of *W. virgo* and a bisexual species in geographic cantact – *Evolution* 33: 85-94.

Wilder I.W. & Dunn E.R., 1920 – The correlation of lunglessness in salamanders with a mountain brook habitat – *Copeia* 1920:63-68.

Wilson E.O., 1965 – The challenge from related species – In: *The genetics of colonizing species* (eds. H.G. Baker and G.L. Stebbins), pp. 7-24, *Academic Press*, Orlando, FL.

Wilson E.O., Bossert W.H., 1974 – Introduzione alla biologia delle popolazioni – ed. Piccin (PD), pp 1-198.