
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

PAOLO MARIA BISOL

**Polimorfismi enzimatici ed affinità tassonomiche in
Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 60 (1976), n.6, p. 864–870.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_6_864_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_6_864_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Genetica. — *Polimorfismi enzimatici ed affinità tassonomiche in Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*. Nota di PAOLO MARIA BISOL (*), presentata (**) dal Corrisp. B. BATTAGLIA.

SUMMARY. — Twenty-four populations of several species of the genus *Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida) have been assayed for fourteen enzyme-systems by electrophoresis.

The affinity index, calculated as the ratio between the mean number of concordant bands (same mobility) and the number of bands found in the reference sample (pattern with the highest number of bands), increases with the degree of taxonomical affinity.

Evolutionary implications are discussed.

Secondo la definizione di Dobzhansky [13], la specie può essere considerata come « la popolazione più comprensiva, nel tempo e nello spazio, che rappresenti una comunità riproduttiva distinta ». Ne consegue che, al fine di valutare la struttura genetica di questa comunità, e quindi le affinità tra specie diverse, è estremamente importante riuscire a evidenziare il « pool genico » che gli individui appartenenti a una stessa specie hanno in comune. L'esame di soli caratteri morfologici può essere, in prima approssimazione, un metodo per caratterizzare le specie, ma esso si rivela insufficiente qualora esista una cospicua variabilità intraspecifica ovvero non esistano evidenti differenze morfologiche fra individui non appartenenti alla stessa specie (sibling species).

In questi casi solo la verifica di barriere riproduttive potrebbe dare una risposta risolutiva. D'altra parte tale prova, non sempre possibile, porta alla constatazione dell'esistenza di differenti genomi senza fornire alcun dato sull'ampiezza e sul tipo di queste differenze.

La tecnica dell'elettroforesi ha consentito di superare alcune di queste difficoltà: sulla base dei diversi assetti enzimatici è stato possibile valutare una nuova ed ampia frazione del « pool genico » (Manwell *et al.*, 1967 [18]; Hubby *et al.*, 1968 [16]; Gooch e Schopf, 1970 [15]; Ayala *et al.*, 1970 [2]; Kerambrun, 1970 [17]; Schopf *et al.*, 1973 [20]) al punto da utilizzare questi nuovi caratteri biochimici in luogo dei criteri classici per distinguere le specie (Ayala, 1973) [1].

La validità di questi risultati ci ha portato ad affrontare da un punto di vista biochimico la tassonomia del genere *Tisbe*. Numerose ricerche precedenti avevano infatti evidenziato una serie di problemi concernenti i rapporti filogenetici e le modalità di speciazione nel genere. In particolare sono state descritte numerose specie gemelle, riconosciute mediante incroci, e sono state riscontrate barriere riproduttive fra razze geografiche della stessa specie tali

(*) Ricerca svolta nell'ambito dell'attività dell'Istituto di Biologia del Mare, C.N.R., Venezia (incarico di ricerca n. Dp. 302.2847/272075).

(**) Nella seduta del 13 marzo.

da far pensare ad una speciazione *in fieri* (Volkman, 1971 [22]; Battaglia *et al.*, 1969 [6]; [7]; Volkman *et al.*, 1975 [24]; Battaglia *et al.*, 1973 [8]).

Un primo approccio, limitato a due soli sistemi (Esterasi e proteine totali, Battaglia e Bisol, 1975 [9]) aveva permesso di verificare una affinità biochimica decrescente dai genotipi alle razze alle specie.

Questa Nota rappresenta un'estensione e un approfondimento di tale ricerca, e riporta i dati relativi a nove specie di *Tisbe* analizzate elettroforeticamente per diversi sistemi enzimatici.

Più precisamente si sono analizzate 24 diverse popolazioni delle seguenti specie (fra parentesi vengono riportate le località di raccolta):

- 1) *Tisbe clodiensis* (Venezia, Ponza, Arcachon, Roscoff, Beaufort);
- 2) *T. dobzhanskyi* (Anzio, Tunisi);
- 3) *T. marmorata* (Venezia, Pesaro, Anzio);
- 4) *T. reticulata* (Venezia, Roscoff);
- 5) *T. aragoi* (Banyuls);
- 6) *T. holothuriae* (Venezia, Gargano, Sigean, Banyuls, Plymouth, Costa scandinava, Cape Cod);
- 7) *T. furcata* (Venezia, Cape Cod);
- 8) *T. reluctantans* (Venezia);
- 9) *T. biminiensis* (Bimini).

Queste popolazioni sono presenti nel nostro laboratorio già da tempo, allevate secondo il metodo descritto da Battaglia (1970) [5].

– *Preparazione dei campioni*: i metodi di raccolta, lavaggio, omogenizzazione sono quelli descritti da Bisol e Battaglia (1973 [11]). Ogni campione, date le esigue dimensioni degli animali, era costituito da 200 femmine adulte. Come estraente si adoperavano 0,1 ml per campione di fenossietanolo al 2% in acqua più saccarosio (10%) ovvero 0,1 ml di Tris-HCl 0,01 M pH 8,5 più saccarosio: in entrambi i casi veniva aggiunta qualche goccia di blu di bromofenolo (2% in acqua) quale indicatore del fronte di migrazione.

Per ogni analisi elettroforetica si prelevavano 0,01 ml di supernatante.

– *Modalità di elettroforesi*: elettroforesi su piastra verticale su gel di poliacrilamide al 6,5% in tampone elettrodi con 4% di N,N'-Metilenebisacrilamide Serva. Le corse venivano effettuate in stanza termostatica a +4 °C a voltaggio costante: 100 V per 15', 200 V fino all'uscita del blu di bromofenolo dalla piastra.

– *Tampone gel ed elettrodi*: tampone A: Tris-EDTA-acido bórico, pH 9; tampone B: Tris-acido bórico, pH 8,5; tampone C: Tris-acido citrico, pH 8,65.

– *Colorazioni*: i metodi di colorazione seguiti sono quelli descritti da Shaw e Prasad (1970) [21] e da Ayala *et al.* (1972) [4], con alcune sostanziali modifiche.

Aminopeptidasi (Ap): tampone B; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5; 25 ml; MnCl₂ 30 mg, L-aminoacido ossidasi Sigma 5 mg, glicil-L-leucina 20 mg; o-dianisidina 5 mg; perossidasi Sigma 10 mg, agar agar 2% in acqua 25 ml.

Esterasi (Est): tampone A; colorante: tampone fosfato 0,1 M, pH 6,5; 100 ml; α -naftilacetato (sciolto in acetone) 1 ml, β -naftilacetato (sciolto in acetone) 1 ml, Fast Blue BB 60 mg.

Fosfatasi acida (Acph): tampone B; colorante: tampone acetato 0,05 M, pH 5; 100 ml; polivinilpirrolidone (PVP) 250 mg, Na α -naftilacidofosfato 5 mg, Na β -naftilacidofosfato 5 mg, Fast Blue BB 50 mg. Prima della colorazione le piastre venivano messe per 1 ora in tampone acetato 0,05 M, pH 4,5.

Fosfatasi alcalina (Aph): tampone B; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 9, 100 ml; PVP 250 mg, Na α -naftilacidofosfato 5 mg, Na β -naftilacidofosfato 5 mg, MgCl₂ 30 mg, MnCl₂ 30 mg, NaCl 1 gr, Fast Blue BB 50 mg.

Gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi (G-3-pdh): tampone C, colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5; 100 ml; Na₃-D-fruttosio-1,6-difosfato 300 mg, aldolasi Sigma 50 unità, β -NAD 20 mg, NBT 10 mg, PMS 3 mg, Na₂HAsO₄ 100 mg.

α -*glicerofosfatodeidrogenasi* (α -Gpdh): tampone A; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, 100 ml; Na-D,L- α , β -glicerofosfato 500 mg, β -NAD 15 mg, NBT 15 mg, PMS 3 mg, EDTA 150 mg.

Glucosio-6-fosfatodeidrogenasi (G-6-pdh): tampone A; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8, 100 ml; Na₂ glucosio-6-fosfato Sigma 100 mg, NADP 10 mg, NBT 10 mg, PMS 3 mg.

Esofosfatoisomerasi (Hpi): tampone B; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,3; 100 ml; Ba-fruttosio-6-fosfato 60 mg, NADP 10 mg, NBT 10 mg, PMS 3 mg, G-6-pdh 0,03 ml.

Latticoideidrogenasi (Ldh): tampone B; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, 100 ml; Na-L-lattato 120 mg, β -NAD 10 mg, MTT 10 mg, PMS 3 mg.

Leucinoaminopeptidasi (Lap): tampone B; colorante: Tris-maleato-NaOH, pH 7, 100 ml; L-leucina- β -naftilamide-HCl 40 mg, Fast Garnet GBC 40 mg.

Malicoideidrogenasi (Mdh): tampone B; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 9, 100 ml; Na-malato 100 mg, β -NAD 10 mg, NBT 10 mg, PMS 3 mg.

Enzima malico (Me): tampone C; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,3; 100 ml, acido malico 100 mg, NADP 15 mg, NBT 10 mg, PMS 3 mg.

Fosfoglucomutasi (Pgm): tampone B; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5; 100 ml, Na₂glucosio-1-fosfato Sigma grado III 100 mg, D-glucosio-1,6-difosfato Sigma 1 mg, MgCl₂ 0,1 M 1 ml, NADP 10 mg, MTT 20 mg, PMS 3 mg, G-6-pdh 0,03 ml.

Sorbitolodeidrogenasi (Sdh): tampone A; colorante: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, 100 ml; Sorbitolo 500 mg, β -NAD 15 mg, NBT o MTT 10 mg, PMS 3 mg.

Con l'eccezione della Ldh e della Lap, i patterns elettroforetici risultano sufficientemente caratterizzanti le specie e per mobilità e per affinità al substrato (Esterasi e Fosfatasi acida ed alcalina).

Nell'impossibilità di ricavare le frequenze geniche dai ferogrammi ottenuti, avendo dovuto utilizzare 200 individui per campione, si è elaborato un indice di affinità basato sulla percentuale di bande in comune allo scopo di quantizzare il grado di differenziazione genica fra le unità tassonomiche prese in considerazione. Un metodo analogo è stato seguito da Manwell (1967) [18] nello studio di specie gemelle di copepodi del genere *Calanus*, e da Bedford e Reid (1969) [10] in molluschi, bivalvi e gasteropodi. Nel caso di specie di cui sono state saggiate più popolazioni, il ferogramma è stato « costruito » riportando in un unico schema tutte le bande evidenziate nelle singole popolazioni. I ferogrammi sono stati confrontati a due a due. Fungeva da campione di riferimento il pattern elettroforetico che presentava il maggior numero di bande: sono state considerate concordanti le bande che avevano la stessa posizione e la stessa affinità per il substrato. Il confronto fra razze geografiche è stato fatto utilizzando, sulla base di questi criteri, i singoli ferogrammi. L'indice di affinità è stato calcolato come percentuale del quoziente tra il numero di bande concordanti e il numero massimo di bande (Bisol e Battaglia, 1973) [11]). Si sono considerate discordanti anche le bande che presentavano differenze di 1 mm. La legittimità di tale criterio restrittivo deriva, a nostro parere, da

due ordini di considerazioni: 1) le differenze minime si sono riscontrate anche nelle repliche; 2) l'analisi della F_1 derivate dagli incroci reciproci di diverse razze geografiche di *T. clodiensis* ha evidenziato eterozigoti a due bande per Aph-2 mentre le parentali erano monomorfe per bande distanziate di 1 mm (Tav. I). Bisogna tener presente inoltre che la ricerca è stata condotta in due tempi successivi per motivi pratici (piastre a 20 pozzetti). Nella prima fase sono state analizzate le 5 popolazioni di *T. clodiensis* e su queste sono state messe a punto le tecniche ed i tempi di corsa. Successivamente sono state saggiate tutte le altre popolazioni più una di *T. clodiensis* come controllo. Ne consegue che, data la costanza delle condizioni per ottenere la massima comparabilità dei risultati, la risoluzione non può essere ottimale per tutte. Gli indici di affinità sono riportati in Tabella I.

TABELLA I
Indice di affinità fra specie, specie gemelle
e razze geografiche.

Specie	<i>Tisbe clodiensis</i> <i>Tisbe dobzhanskyi</i> <i>Tisbe holothuriae</i> <i>Tisbe aragoi</i> <i>Tisbe reticulata</i> <i>Tisbe marmorata</i> <i>Tisbe reluctans</i> <i>Tisbe furcata</i> <i>Tisbe biminiensis</i>	6,1
Specie gemelle	<i>Tisbe clodiensis</i> <i>Tisbe dobzhanskyi</i>	19,5
	<i>Tisbe marmorata</i> <i>Tisbe reticulata</i> <i>Tisbe aragoi</i>	27
Razze geografiche	<i>Tisbe holothuriae</i> (Venezia, Gargano, Banyuls, Sigean, Plymouth, Costa scan- dinava, Cape Cod)	66
	<i>Tisbe clodiensis</i> (Venezia, Arcachon, Ponza, Roscoff, Beaufort)	56

Il fatto che ad ogni unità tassonomica corrisponda un diverso grado di somiglianza genetica fa cadere l'eventuale obiezione, che si sono utilizzati animali allevati in laboratorio. Anche se non si può escludere che la variabilità genetica sia diminuita nel tempo in seguito a selezione per adattamento alle

condizioni di laboratorio, o per deriva o « colli di bottiglia » negli allevamenti, è tuttavia legittimo affermare che i diversi gradi di affinità riscontrati siano effettivamente rappresentativi delle differenze che sussistono tra i « pool genici » di specie distinte. Se così non fosse avremmo dovuto trovare non una scala di valori bensì differenze dello stesso ordine di grandezza. Riteniamo invece che maggior peso abbia il limite derivante dal fatto che non si possono ricavare dai nostri ferogrammi delle frequenze geniche. Questo ci impedisce di calcolare le affinità o le differenze fra specie, specie gemelle e razze geografiche secondo i metodi di Nei (1972) [19], che consentono di valutare il grado di sostituzioni alleliche per locus che si sono accumulate in due popolazioni differenziate da una popolazione ancestrale comune, o di Ayala e Powell (1972) [3], che permettono di esprimere in termini di probabilità l'appartenenza di una popolazione ad una specie o meno. Per questi motivi i nostri ferogrammi caratterizzano sì le specie e fin qui lo scopo della ricerca è stato pienamente raggiunto, ma i dati che ne derivano non possono essere pienamente sfruttati. In altre parole essi possono essere utilizzati come nuovi caratteri per classificare le specie ma non per valutare il grado di differenziazione genica necessario affinché una popolazione possa essere classificata come nuova specie. Nonostante questo limite, si possono trarre alcune indicazioni sulle modalità di speciazione nel genere *Tisbe*. Infatti la maggiore affinità riscontrata fra i due gruppi di specie gemelle analizzati (*T. clodiensis* e *T. dobzhanski*, i.a. 19,5), *T. reticulata*, *T. marmorata* e *T. aragoi*, i.a. 27,0) sta ad indicare che esse sono simili non solo morfologicamente ma hanno in comune anche molta parte del genoma. Si può quindi avanzare l'ipotesi che anche in *Tisbe*, come in *Drosophila* (Dobzhansky, 1956) [14], i meccanismi di speciazione non interessano che in minima parte i caratteri morfologici, che hanno raggiunto un ottimo grado di perfezionamento, ma piuttosto coinvolgono caratteri fisiologici sotto controllo genetico. Anche se non sono possibili confronti diretti in termini quantitativi, per le ragioni già esposte, l'aver trovato un buon numero di bande con la stessa modalità od affinità al substrato, o che le bande discordanti siano localizzate, nelle specie gemelle di *Tisbe*, in zone vicine (Tav. II), corrisponde abbastanza bene alla dimostrazione data da Ayala *et al.* (1970) [2] circa la validità della ipotesi di Dobzhansky per *Drosophila*: sulla base dei risultati ottenuti mediante analisi elettroforetica, le specie gemelle di *Drosophila* hanno in comune frazioni del genoma superiori anche al 50%. Inoltre molte varianti elettroforetiche che consentono di distinguere le specie sono alleli diversi di uno stesso locus (Ayala, 1973) [1].

Dai ferogrammi delle specie gemelle del gruppo *reticulata* si può evidenziare anche un nuovo meccanismo di isolamento che va ad affiancarsi a quelli meccanico ed ecologico già descritti da Volkmann (1973) [23]. Esiste infatti una differenza nel numero dei loci delle fosfatasi alcaline delle tre specie: 2 loci in *T. marmorata*, 3 loci nelle altre. Questo fatto, oltre a confermare che esistono variazioni di rapporti fra geni, indica anche una modificazione nell'ordinamento cromosomico che contribuisce a mantenere l'identità delle specie qualora esse siano simpatriche.

Un'ulteriore indicazione che la speciazione nel genere *Tisbe* interessi maggiormente i caratteri biochimici è data dai diversi assetti enzimatici e dai conseguenti indici di affinità riscontrati nelle razze geografiche delle specie esaminate. Limitandoci alle due specie *T. holothuriae* e *T. clodiensis* delle quali si è analizzato un discreto numero di popolazioni troviamo una buona corrispondenza fra dati biochimici e risultati degli incroci.

Gli indici di affinità delle razze di *T. holothuriae*, in cui precedenti ricerche (Battaglia *et al.*, 1973) [8], avevano evidenziato la piena interfecondità con discendenze eterotiche, sono mediamente più elevati di quelli delle razze di *T. clodiensis*, in cui sono state riscontrate barriere riproduttive tali da far ritenere che si tratti di una superspecie (Volkman *et al.*, 1975) [25].

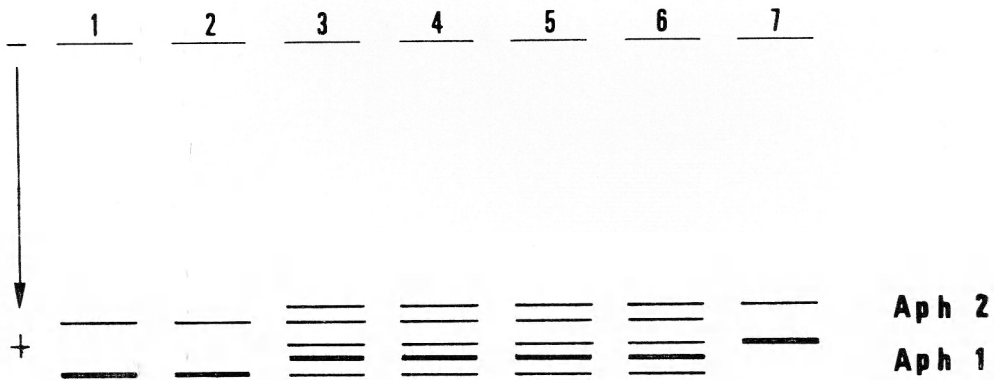
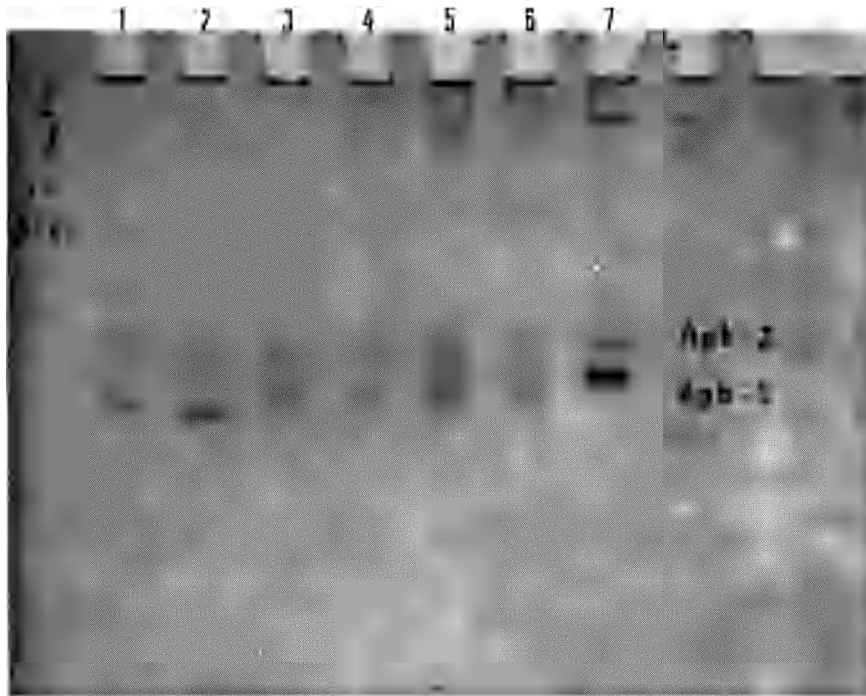
In *T. holothuriae* gli indici di affinità sembrano variare in funzione della distanza (minor affinità della popolazione di Cape Cod con quelle europee, indice medio 53,45; maggiore affinità fra le popolazioni mediterranee, 77,88) e dell'ambiente (le popolazioni di Plymouth e della Costa scandinava sono molto più affini della popolazione di Banyuls, pure di ambiente tipicamente marino, che non alle altre popolazioni mediterranee di acque salmastre). Nell'ipotesi che i diversi gradi di affinità siano il risultato di fenomeni adattativi, questi dati confermerebbero che la speciazione nel genere *Tisbe* segue il modello geografico: l'isolamento porterebbe a una differenziazione del genoma sotto la spinta di pressioni selettive diverse; successivamente, quando le barriere cadono e le due popolazioni tornano in contatto, i meccanismi di isolamento riproduttivo sviluppatasi nel frattempo mantengono distinte le due specie. Quest'ultima condizione sembra sufficientemente verificata nell'ambito delle specie gemelle sia simpatriche che allopatriche, del gruppo *reticulata*. Il metodo utilizzato è tuttavia inadeguato per dimostrare l'eventuale efficacia di pressioni selettive diverse, come pure per valutare convenientemente le differenziazioni del genoma. Infatti l'omogeneità di una popolazione sulla base della presenza o dell'assenza di alcune bande potrebbe essere sovvertita qualora si riesca a calcolare le frequenze geniche. In altri termini, due popolazioni da noi considerate « molto affini » per la presenza di due bande ovvero di due alleli, potrebbero avere frequenze geniche completamente diverse.

Il metodo di analisi elettroforetica di singoli individui, da noi recentemente messo a punto (Bisol *et al.*, 1976) [12] potrà consentirci di verificare in laboratorio sia il controllo genetico delle frazioni enzimatiche sia l'eventuale azione selettiva dei parametri ambientali, mettendoci così in grado di affrontare in modo più corretto il problema della speciazione in *Tisbe* e di saggiare, in particolare, la validità del modello prospettato.

BIBLIOGRAFIA

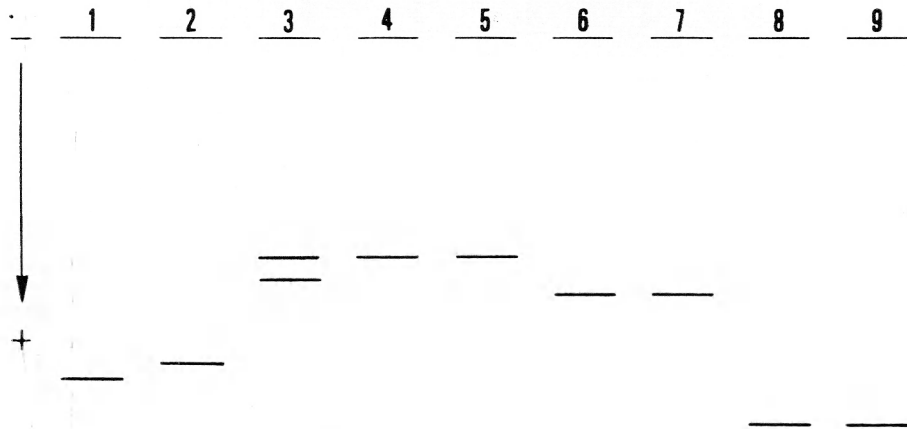
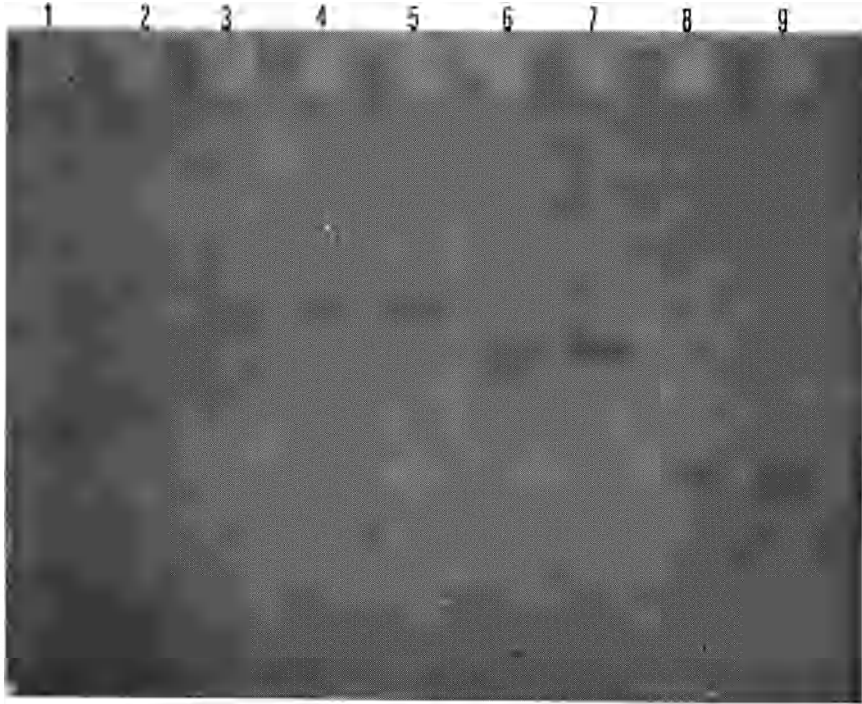
- [1] F. J. AYALA (1973) - *Two new subspecies of the Drosophila willistoni group*. « The pan-pacific entomologist », 49, 273-279.
- [2] F. J. AYALA, C. A. MURÃO, S. PÉREZ-SALAS, R. RICHMOND e T. DOBZHANSKY (1970) - *Enzyme variability in the Drosophila willistoni group*. I. *Genetic differentiation among sibling species*, « Proc. Natl. Acad. Sci. », 67, 225-232.

- [3] F. J. AYALA e J. R. POWELL (1972) - *Allozymes as diagnostic characters of sibling species of Drosophila*. « Proc. Natl. Acad. Sci. », 69, 1094-1096.
- [4] F. J. AYALA, J. R. POWELL, M. L. TRACEY, C. A. MURÃO e S. PÉREZ-SALAS (1972) - *Enzyme variability in the Drosophila willistoni group*. IV. *Genetic variation in natural populations of Drosophila willistoni*. « Genetics », 70, 113-139.
- [5] B. BATTAGLIA (1970) - *Cultivation of marine copepods for genetics and evolutionary research*. « Helgoländer wiss. Meeresunters », 20, 385-392.
- [6] B. BATTAGLIA e B. VOLKMANN (1969) - *Espèces nouvelle du genre Tisbe de Banyuls-sur-mer*. « Vie et Milieu », 20, 421-438.
- [7] B. BATTAGLIA e B. VOLKMANN (1969) - *Gradienti di isolamento riproduttivo in popolazioni geografiche del copepode Tisbe clodiensis*. « Atti Ist. Ven. SS.LL.AA. », 127, 371-381.
- [8] B. BATTAGLIA e B. VOLKMANN (1973) - *Geographic and reproductive isolation in the marine harpacticoid copepod Tisbe*. « Mar. Biol. », 19, 156-160.
- [9] B. BATTAGLIA e P. M. BISOL (1975) - *Biochemical polymorphisms in marine crustaceans in relation to their ecology*. Proc. 9th Europ. mar. Biol. Symp., 573-585, H. Barnes Editor, Aberdeen University Press, 1975.
- [10] J. J. BEDFORD e M. S. REID (1969) - *Gel electrophoresis of proteins in the crystalline style of certain mollusca*. « Comp. Biochem. Physiol. », 29, 659-664.
- [11] P. M. BISOL e B. BATTAGLIA (1973) - *Composizione proteica ed affinità tassonomica in Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*. « Atti Ist. Ven. SS.LL.AA. », 131, 449-457.
- [12] P. M. BISOL, V. VAROTTO e B. BATTAGLIA (1976) - *Controllo genetico della fosfoeso-somerasi (ϕ) in Tisbe clodensis*. « Atti Acc. Lincei », in stampa.
- [13] T. DOBZHANSKY (1950) - *Mendelian populations and their evolution*. « Am. Nat. », 84, 401-408.
- [14] T. DOBZHANSKY (1956) - *What is an adaptive trait?* « Am. Nat. », 90, 337-347.
- [15] J. L. GOOCH e T. J. M. SCHOPF (1970) - *Population genetics of marine species of the phylum Ectoprocta*. « Biol. Bull. », 138, 138-156.
- [16] T. L. HUBBY, e L. H. THROCKMORTON (1968) - *Protein differences in Drosophila*. IV. *A study of sibling species*. « Am. Nat. », 102, 193-205.
- [17] P. KERAMBRUN (1970) - *Mise en évidence des estérases après électrophorèse sur gel de polyacrylamide chez Idothea baltica, Ligia italica, Sphaeroma serratum, Sphaeroma hoockeri et Sphaeroma ghigii (Crustacés, Isopodes)*. « C. R. Acad. Sci. », Paris, 271, 438-441.
- [18] C. MANWELL, G. M. A. BAKER, P. A. ASHTON e E. D. S. CORNER (1967) - *Biochemical differences between Calanus finmarchicus and C. helgolandicus. Esterase, malate and triosephosphate dehydrogenase, peptidase and other enzymes*. « J. Mar. Biol. Ass. U.K. », 47, 145-169.
- [19] M. NEI (1972) - *Genetic distances between populations*. « Am. Nat. », 106, 283-292.
- [20] T. J. M. SCHOPF e L. S. MURPHY (1974) - *Protein polymorphism of the hybridizing seastars Asterias forbesi and Asterias vulgaris and implications for their evolution*. « Biol. Bull. », 145, 589-597.
- [21] C. R. SHAW e R. PRASAD (1970) - *Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes*. « Biochem. Genet. », 4, 297-320.
- [22] B. VOLKMANN (1971) - *Some critical remarks on the taxonomy of Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*. « Crustaceana », 21, 127-132.
- [23] B. VOLKMANN (1973) - *Étude de quatre espèces jumelles du groupe Tisbe reticulata Bocquet (Copepoda, Harpacticoida)*. « Arch. Zool. exp. gén. », 114, 317-348.
- [24] B. VOLKMANN, B. BATTAGLIA e V. VAROTTO (1975) - *A study of reproductive isolation within the superspecies Tisbe clodiensis (Copepoda, Harpacticoida)*. Sottoposto a Evolution.



Ferogrammi della fosfatasi alcalina in *Tisbe clodiensis*.

- 1) Roscoff; 2) Ponza; 3) F_1 ♀♀ Beaufort \times ♂♂ Roscoff; 4) F_1 ♀♀ Roscoff \times ♂♂ Roscoff;
5) F_1 ♀♀ Beaufort \times ♂♂ Ponza; 6) F_1 ♀♀ Ponza \times ♂♂ Beaufort; 7) Beaufort.



Ferogrammi della fosfoglucomutasi in *Tisbe*.

- 1) *T. dobzhanskyi* Anzio; 2) *T. dobzhanskyi* Tunisi; 3) *T. marmorata* Venezia; 4) *T. marmorata* Pesaro; 5) *T. marmorata* Anzio; 6) *T. reticulata* Roscoff; 7) *T. reticulata* Venezia; 8) *T. holothuriae* Venezia; 9) *T. holothuriae* Gargano.