
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

PAOLO MARIA BISOL, NICOLETTA MARIN, MARIA
CRISTINA STELLA

**Distanza genetica in Tisbe (Copepoda,
Harpacticoida). I. Studio in popolazioni del gruppo
'gracilis'**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 68 (1980), n.4, p. 333–342.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1980_8_68_4_333_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1980_8_68_4_333_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. — *Distanza genetica in Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida). I. *Studio in popolazioni del gruppo 'gracilis'* (*). Nota di PAOLO MARIA BISOL (**), NICOLETTA MARIN (**), e MARIA CRISTINA STELLA (**), presentata (***) dal Corrisp. B. BATTAGLIA.

SUMMARY. — Eleven gene-enzyme systems have been studied by means of gel electrophoresis in four laboratory populations of three sibling species: *Tisbe biminiensis*, *T. cucumariae* and *T. gracilis*, of the 'gracilis' group. On the average the degree of genetic variability is very low. This may be due to bottlenecks during the rearing.

The values of the genetic similarity are in agreement with the data on chromosomal structure and indicate that *T. gracilis* and *T. cucumariae* are the species which resemble most the ancestral ones of the lineage. *T. biminiensis* exhibits a high divergence from the other species.

Il genere di copepodi arpacticoidi *Tisbe* è rappresentato attualmente da circa 50 specie. È da notare che la maggior parte di esse è stata descritta negli ultimi trenta anni e che in molti casi si tratta di gemelle di specie già descritte [11]. L'aumento nel numero di specie dipende oltre che da una maggiore efficacia delle indagini a livello morfologico — per i limiti della tassonomia classica di *Tisbe* si veda Volkmann-Rocco [23] e il lavoro sopracitato [11] — anche dai risultati di prove d'incrocio che hanno rivelato l'esistenza di barriere riproduttive fra popolazioni costituite da individui morfologicamente identici o comunque molto simili tra loro ([4], [5], [22], [29]).

Lo studio dei meccanismi di speciazione del genere *Tisbe* è inoltre reso particolarmente interessante dal fatto che molte specie si trovano in condizioni di simpatria e popolazioni di una stessa specie vivono in habitat diversi: ciò dovrebbe consentire una migliore definizione del ruolo dell'ambiente.

Numerosi sono stati pertanto gli studi condotti su questi organismi per verificare somiglianze o differenze fra i diversi gruppi di specie seguendo vari criteri: morfologico [27], ecologico [25], [28], carilogico [13], [16], genetico [15], [18].

Più limitato [6], [8], è stato lo studio dei caratteri biochimici a fini tassonomici, utilizzando le tecniche di analisi elettroforetica. A causa delle piccole dimensioni degli animali non era possibile l'analisi di singoli individui per cui il confronto delle popolazioni non si basava sulle frequenze geniche ma su altri parametri e quindi i dati non potevano essere pienamente sfruttati. La messa a punto di un micrometodo di analisi elettroforetica per organismi

(*) Lavoro eseguito negli Istituti di Biologia Animale dell'Università di Padova e di Biologia del Mare, CNR, Venezia.

(**) Istituto di Biologia Animale, Via Loredan 10, 35100 Padova.

(***) Nella seduta del 12 aprile 1980.

di piccole dimensioni [9] ha consentito di riaffrontare il problema della tassonomia biochimica di *Tisbe* in termini più adeguati, essendo stati superati alcuni dei limiti che gravavano sulle ricerche precedenti.

Oggetto di studio nella presente Nota sono quattro popolazioni di laboratorio di tre specie gemelle del gruppo 'gracilis': *Tisbe biminiensis*, *T. cucumariae* e *T. gracilis*. Morfologicamente le tre specie sono molto simili; le sole differenze riguardano piccoli particolari relativi a una spina del secondo paio di piedi dei maschi e al campo genitale delle femmine [24], [26], [27].

MATERIALE E METODI

La popolazione di *T. biminiensis* studiata era stata allestita con femmine provenienti da Bimini (Bahamas); le due popolazioni di *T. cucumariae* erano invece di origine lagunare, una di Venezia e una di Beaufort (Carolina del Nord, USA); da Roscoff (Francia) proveniva la popolazione di *T. gracilis*. Le caratteristiche ambientali delle località di cattura riflettono, con buona approssimazione, quelle delle aree di distribuzione delle specie: *T. biminiensis* è diffusa in ambienti tropicali o subtropicali, *T. cucumariae* in aree temperate e più frequentemente in lagune salmastre, *T. gracilis* in zone relativamente fredde.

L'analisi elettroforetica è stata condotta su piastra verticale di gel di acrilamide per 11 sistemi gene-enzima. I tamponi gel-elettrodi utilizzati sono stati i seguenti: A) Glicina-NaOH, pH 8,5; B) Glicina-NaOH, pH 8,8; C) Tris-Acido Borico, pH 8,8; D) Tris-Acido Borico, pH 8,5; E) Tris-EDTA-Acido Borico, pH 8,8; F) Tris-Acido Citrico, pH 8,2. La corsa elettroforetica veniva effettuata in camera termostatica a 4 °C, mantenendo costante il voltaggio. Le principali condizioni di elettroforesi di ogni enzima e i tamponi di colorazione sono riportati in Tabella I. Per maggiori dettagli sulle tecniche di colorazione si vedano Brewer [12] e Bisol [6], [7].

RISULTATI

I fenotipi osservati sono riportati in forma schematica in fig. 1. La prima colonna per ogni enzima si riferisce a *T. biminiensis*, la seconda a *T. cucumariae*, la terza a *T. gracilis*. Il ferogramma di *T. cucumariae* è unico in quanto le due popolazioni mostravano le stesse bande e differivano, in alcuni casi, solo per la loro frequenza. L'interpretazione dei quadri elettroforetici e la classificazione dei loci è stata effettuata seguendo il criterio proposto da Ayala *et al.* [1] per quanto riguarda le bande invarianti in tutti gli individui di una popolazione: si è assunto che ognuna di esse rappresenti il prodotto di un singolo locus monomorfo.

Per le zone variabili si è seguito il principio della segregazione mendeliana nei diploidi. Si tratta in tutti i casi di alleli codominanti; le tre bande negli eterozigoti del locus Pgi-1 indicano che la struttura della proteina è dimerica.

TABELLA I

Enzimi saggiati e condizioni di elettroforesi utilizzate nello studio della variabilità genetica di quattro popolazioni del gruppo Tisbe gracilis.

Enzima	Abbreviazione	Concentrazione acrilamide %	Tampone gel elettrodi (*)	Tempi di corsa	Tampone di colorazione	pH
Amilasi	Amy	8	B	60'	Tris-HCl	7,2
Fosfatasi alcalina	Aph	7,5	C	70'	Tris-HCl Glicina-NaOH	9 9,6
Aminopeptidasi	Ap	7,5	D	105'	Tris-HCl	8
Esterasi	Est	7,5	E	60'	Fosfato	6,5
Fumarasi	Fum	7,5	A	90'	Tris-HCl	9
Glutammico-ossalacetico transaminasi	Got	7,5	E	90'	Tris-HCl	7,8
Isocitricodeidrogenasi	Idh	6,5	F	70'	Tris-HCl	8
Leucinoaminopeptidasi.	Lap	8	D	60'	Tris-Maleato- -NaOH	6,5
Malicoidrogenasi	Mdh	7,5	A	90'	Tris-HCl	9
Fosfoglucoisomerasi	PGI	7,5	D	90'	Tris-HCl	8
Fosfoglucomutasi	PGM	7	C	70'	Tris-HCl	8

(*) Per la descrizione vedere il testo.

Per questi loci sono state calcolate le frequenze geniche secondo il principio di Hardy-Weinberg (Tabella II). L'identificazione dei loci e dei rispettivi alleli cui fa riferimento questa Tabella nella fig. 1 è possibile tenendo conto che la numerazione dei loci e degli alleli (in questo caso si usano lettere) comincia dalle frazioni più anodiche. Complessivamente sono stati classificati 17 loci in *T. biminiensis*, e 19 loci nelle altre due specie.

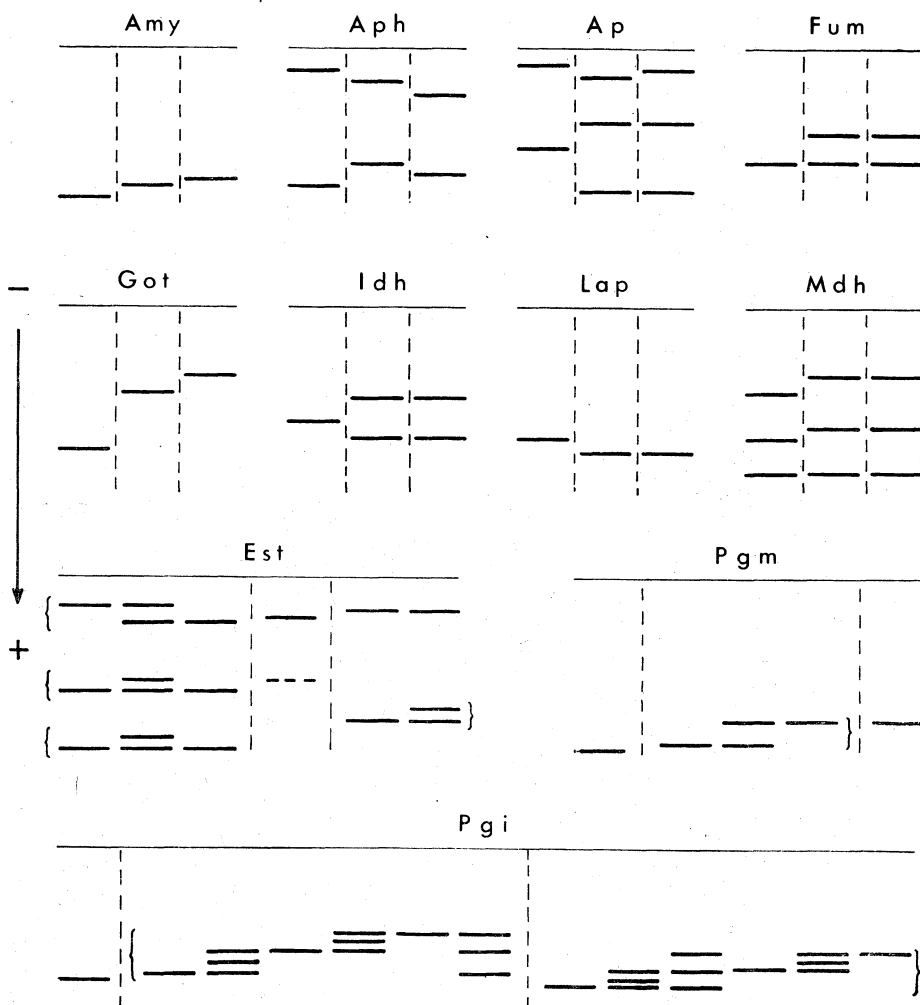


Fig. 1. - Rappresentazione schematica degli elettromorfi osservati in tre specie gemelle del gruppo *Tisbe gracilis*. Fra parentesi graffa sono compresi gli alleli di uno stesso locus. Per maggiori dettagli si veda il testo.

In Tabella III sono illustrati i dati relativi al livello di polimorfismo delle quattro popolazioni. Il grado di variabilità genetica trovato è notevolmente basso per tutti i suoi parametri, percentuale di loci polimorfi, numero medio di alleli per locus, frequenze degli eterozigoti. Questi valori sono molto

TABELLA II

Frequenze alleliche dei loci polimorfi nelle quattro popolazioni studiate.

Popolazione	Locus	N (*)	Alleli	Frequenze alleliche			Frequenze degli eterozigoti		χ^2 (**)
				a	b	c	oss.	att.	
<i>T. biminiensis</i> (Bimini)	Est-1	94	2	0,181	0,819	—	0,362	0,296	0,964
	Est-2	94	2	0,085	0,915	—	0,170	0,156	0,075
	Est-3	90	2	0,489	0,511	—	0,533	0,500	0,203
<i>T. cucumariae</i> (Beaufort)	Pgm-1	180	2	0,961	0,039	—	0,078	0,075	0,012
	Pgi-1	126	3	0,262	0,555	0,183	0,492	0,589	2,469
<i>T. cucumariae</i> (Venezia)	Pgm-1	126	2	0,952	0,048	—	0,095	0,091	0,016
	Pgi-1	122	3	0,328	0,459	0,213	0,607	0,636	0,234
<i>T. gracilis</i> (Roscoff)	Est-1	64	2	0,081	0,919	—	0,162	0,149	0,050
	Pgi-1	128	3	0,234	0,578	0,188	0,484	0,576	2,185

(*) Numero dei geni studiati (due volte il numero degli individui).

(**) Calcolato su due classi: omozigoti ed eterozigoti, g.l. = 1, p sempre $> 0,10$.

TABELLA III
Quadro riassuntivo della variabilità genetica nelle quattro popolazioni studiate.

Parametro	<i>T. biminiensis</i> (Bimini)	<i>T. cucumariae</i> (Beaufort)	<i>T. cucumariae</i> (Venezia)	<i>T. gracilis</i> (Roscoff)
Numero di loci	17	18 (*)	18 (*)	19
Numero dei geni saggiati per locus . .	103,765±8,246	128,444±9,370	119,556±7,664	111,474±4,328
Alleli per locus	1,176±0,095	1,167±0,121	1,167±0,121	1,158±0,115
Loci polimorfi 1% (**)	0,176	0,111	0,111	0,105
Loci polimorfi 5% (**).	0,176	0,055	0,055	0,105
Frequenza degli eterozigoti:				
media osservata	0,062±0,037	0,032±0,027	0,039±0,034	0,034±0,026
media attesa (***)	0,056±0,034	0,037±0,033	0,040±0,035	0,038±0,031

(*) Non è stato considerato il locus Est-1 dato il basso numero di individui classificati.

(**) La percentuale di loci polimorfi è stata calcolata seguendo due criteri: il primo, meno restrittivo, prevede che un locus è da considerarsi polimorfo quando la frequenza dell'allele più comune non supera il valore di 0,99 (criterio dell'1 %); per il secondo, la frequenza non deve superare 0,95 (criterio del 5%).

(***) Calcolata secondo la formula $\bar{H} = 1 - \frac{\sum p^2}{N}$, dove p sono le frequenze alleliche ed N il numero dei loci studiati.

inferiori a quelli descritti per altre popolazioni di *Tisbe* [3], [10], per le quali il valore medio di eterozigosi attesa ($\bar{H}$) è circa 0,19. La differenza fra le due serie di dati può essere spiegata con il fatto che in un caso le analisi elettroforetiche sono state condotte su popolazioni di laboratorio piuttosto vecchie, nell'altro su popolazioni allestite da poco tempo, e utilizzando per lo più le F_1 e F_2 delle femmine fondatrici.

La drastica diminuzione del livello di polimorfismo dipenderebbe pertanto da fenomeni di selezione per adattamento alle condizioni di laboratorio o a deriva genetica, in particolare a colli di bottiglia che inevitabilmente interessano le popolazioni, soprattutto al momento del trasferimento dei ceppi in nuovi recipienti. Di solito infatti solo 100–200 femmine vengono utilizzate per perpetuare il ceppo. A riprova che il basso polimorfismo dipende più dallo allevamento che non dalle caratteristiche delle specie si ha il dato relativo ad una popolazione di *T. biminiensis* del Mar Rosso in cui l'eterozigosi media attesa era 0,165 [3].

TABELLA IV

Identità genetica media (I), sopra la diagonale, e distanza genetica media (D), sotto la diagonale, fra quattro popolazioni del gruppo Tisbe gracilis: Tb B. = T. biminiensis; Tg R. = T. gracilis; Tc B. = T. cucumariae Beaufort; Tc V. = T. cucumariae Venezia.

	Tb B.	Tg R.	Tc B.	Tc V.
Tb B.	—	0,1049	0,1103	0,1105
Tg R.	2,2543	—	0,6386	0,6383
Tc B.	2,2037	0,4483	—	0,9995
Tc V.	2,2018	0,4489	0,0005	—

La misura della somiglianza genetica è stata effettuata secondo il metodo descritto da Nei [19], [20]. Sono stati calcolati due parametri I, identità genetica media, e D, distanza genetica media ($D = -\log_e I$). I può variare da zero (nessun allele in comune fra due popolazioni per tutti i loci) a uno (lo stesso allele ha identica frequenza in tutti i loci). D può variare da zero a infinito e fornisce una stima delle sostituzioni alleliche per locus che si sono avute nel corso della evoluzione delle due popolazioni rispetto alla popolazione ancestrale. In Tabella IV sono riportati i valori trovati.

I è massimo per le due popolazioni di *T. cucumariae*, intermedio per *T. cucumariae* e *T. gracilis*, molto basso qualora il confronto comprenda *T. biminiensis*.

Dai valori di D si è ricavato il dendrogramma della fig. 2 che rappresenta la filogenesi delle tre specie.

DISCUSSIONE

L'affidabilità dell'indice di Nei è tanto maggiore quanto più ampia è la porzione di genoma studiato e più rigorosa la stima delle frequenze geniche. Nei [21] ha identificato in 30 il numero minimo di loci da considerare e in 50 il numero ottimale. Non essendo comune investigare tanti loci applicando le tecniche di elettroforesi, si può ridurre l'errore aumentando la precisione nella misura delle frequenze geniche sottoponendo all'indagine almeno 50 individui per locus.

Questo modo di procedere è rispettato nella presente ricerca per cui le misure di I e D dovrebbero riflettere, con buona approssimazione, i valori reali relativi alle quattro popolazioni di laboratorio. Meno validi sono invece i dati se riferiti alla distanza delle specie. Questo non tanto perchè il numero di popolazioni esaminato è basso, quanto per la scarsa variabilità genetica riscontrata. Le popolazioni naturali potrebbero infatti avere frequenze geniche diverse a seguito della presenza di altri alleli comuni; in altre parole si sarebbero effettuate delle sovrastime della distanza genetica.

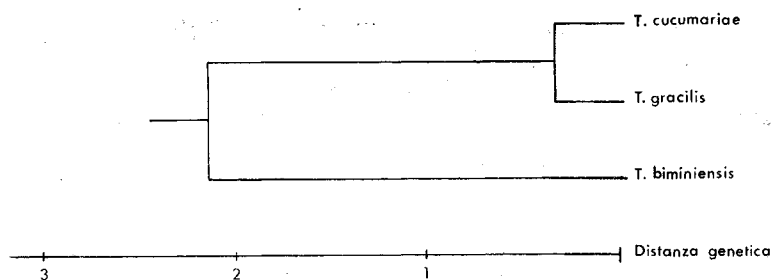


Fig. 2. - Dendrogramma della distanza genetica delle tre specie studiate.

Pur con questo limite, riteniamo che i dati siano comunque sufficientemente indicativi dei rapporti filogenetici fra le tre specie.

Il fatto più rilevante è costituito dalla notevole differenza fra *T. biminensis* e le altre due specie, che invece hanno un valore di I abbastanza elevato (0,638). Ciò è in pieno accordo con i dati relativi alla cariologia di queste specie. Il complemento cromosomico di *T. cucumariae* e *T. gracilis* è lo stesso ($N = 11$); diverse appaiono invece le dimensioni dei cromosomi (Lazzaretto-Colombera, comunicazione personale). In *T. biminensis* il corredo aploide è uguale a 8 [17]. La riduzione del numero di cromosomi è stata interpretata da questi Autori come indice di minore primitività di *T. biminensis*. Alla luce di questa considerazione il dendrogramma (fig. 2) indicherebbe che *T. cucumariae* e *T. gracilis* rappresentano la linea evolutiva più vicina a quella della popolazione ancestrale comune e *T. biminensis* una linea estremamente diverficata. Per avere un quadro più completo dei rapporti filogenetici occorrerà comunque indagare oltre che su altre popolazioni delle tre specie anche su popolazioni delle altre due specie del gruppo 'gracilis', *T. acanthifera* e *T. pori*.

La particolare affinità di *T. cucumariae* e *T. gracilis* conferma inoltre che le specie gemelle hanno in comune molta parte del genoma. L'identità genetica è infatti dello stesso ordine di grandezza di quello descritto per gruppi di specie gemelle di *Drosophila* [1], [2], [30].

Si può pertanto avanzare l'ipotesi che la speciazione in *Tisbe* proceda come in *Drosophila* [14] attraverso modificazioni di caratteri fisiologici più che di caratteri morfologici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AYALA F. J., TRACEY M. L., BARR L. G., McDONALD J. F. e PEREZ-SALAS S. (1974) - *Genetic variation in natural populations of five Drosophila species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms*, «Genetics», 77, 343-384.
- [2] AYALA F. J., TRACEY M. L., HEDGECOCK D. e RICHMOND R. C. (1974) - *Genetic differentiation during the speciation process in Drosophila*, «Evolution», 27, 576-592.
- [3] BATTAGLIA B., BISOL P. M. e FAVA G. (1978) - *Genetic variability in relation to the environment in some marine invertebrates*, «Marine organisms. Genetics, Ecology and Evolution», 53-70, B. Battaglia and J. A. Beardmore, Eds., Plenum Publishing Corporation, New York and London.
- [4] BATTAGLIA B. e VOLKMANN-ROCCO B. (1969) - *Espèce nouvelle du genre Tisbe de Banyuls-sur-Mer*, «Vie et Milieu», 20, 421-438.
- [5] BATTAGLIA B. e VOLKMANN-ROCCO B. (1972) - *Geographic and reproductive isolation in the marine Harpacticoid Copepod Tisbe*, «Mar. Biol.», 19, 156-160.
- [6] BISOL P. M. (1976) - *Polimorfismi enzimatici ed affinità tassonomiche in Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*, «Atti Accad. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sci. fis. mat. e nat.», 60, 864-870.
- [7] BISOL P. M. (1980) - *Analisi elettroforetica delle Amilasi in due gruppi di specie gemelle di Copepodi del genere Tisbe*, «Atti Ist. Ven. SS. LL. AA.», in stampa.
- [8] BISOL P. M. e BATTAGLIA B. (1973) - *Composizione proteica ed affinità tassonomica in Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*, «Atti Ist. Ven. SS. LL. AA.», 131, 449-457.
- [9] BISOL P. M., VAROTTO V. e BATTAGLIA B. (1976) - *Controllo genetico della fosfoesoisomerasi (Phi) in Tisbe clodiensis (Copepoda, Harpacticoida)*, «Atti Accad. Naz. Lincei Rend. Cl. Sci. fis. mat. e nat.», 60, 499-504.
- [10] BISOL P. M., VAROTTO V. e BATTAGLIA B. (1979) - *Variabilità genetica di tre popolazioni del copepode harpacticoida Tisbe bulbisetosa*, «XI Congr. Soc. Ital. Biol. Mar., Orbetello 1979. Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., sez. B», 86 suppl. 357-359.
- [11] BOCQUET C. (1976) - *Les problèmes de l'espèce chez quelques crustacés: Le genre Tisbe (Copepodes Harpacticoides) et le complexe Jaera albifrons (Isopodes Asellotes)*, «Mémoire de la Société Zoologique de France», 38, 307-340.
- [12] BREWER G. J. (1970) - *Introduction to Isoenzyme Techniques*, 186 pp. Academic Press, New York.
- [13] COLOMBERA D. e LAZZARETTO-COLOMBERA I. (1972) - *The karyology of Tisbe reluctans (Copepoda, Harpacticoida)*, «Caryologia», 25, 525-529.
- [14] DOBZHANSKY T. (1976) - *What is an adaptive trait?*, «Am. Nat.», 90, 337-347.
- [15] FAVA G., LAZZARETTO-COLOMBERA I. e CERVELLI M. (1976) - *Carico genetico in Tisbe (Copepoda, Harpacticoida). II. Tisbe holothuriae e Tisbe bulbisetosa della laguna di Venezia*, «Atti Accad. Naz. Lincei Rend. Cl. Sci. fis. mat. e nat.», 60, 699-708.
- [16] LAZZARETTO-COLOMBERA I. (1976) - *Chromosome number in ten species of the genus Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*, «Mar. Biol.», 38, 159-162.
- [17] LAZZARETTO-COLOMBERA I., COLOMBERA D. e PITACCO G. (1976) - *La carilogia della specie Tisbe biminensis (Copepoda, Harpacticoida)*, «Atti Accad. Naz. Lincei Rend. Cl. Sci. fis. mat. e nat.», 60, 303-308.

- [18] LAZZARETTO-COLOMBERA I., FAVA G. e GRADENIGO-DENES M. (1976) - *Carico genetico in Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*. I. Tisbe holothuriae di due popolazioni del Mediterraneo. «Atti Accad. Naz. Lincei Rend. Cl. Sci. fis. mat. e nat.», 60, 691-698.
- [19] NEI M. (1971) - *Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity*, «Am. Nat.», 105, 385-398.
- [20] NEI M. (1972) - *Genetic distance between populations*, «Am. Nat.», 106, 283-292.
- [21] NEI M. (1978) - *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals*, «Genetics», 89, 583-590.
- [22] VOLKMANN-ROCCO B. (1969) - Tisbe pontina n. sp. a harpacticoid copepod from the island Ponza, «Archo Oceanogr. Limmol.», 16, 117-128.
- [23] VOLKMANN-ROCCO B. (1971) - *Some critical remarks on the taxonomy of Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*, «Crustaceana», 21, 127-132.
- [24] VOLKMANN-ROCCO B. (1972) - *Species of Tisbe (Copepoda, Harpacticoida) from Beaufort North Carolina*, «Archo Oceanogr. Limmol.», 17, 259-273.
- [25] VOLKMANN-ROCCO B. (1973) - *Etude de quatre espèces jumelles du groupe Tisbe reticulata Bocquet (Copepoda, Harpacticoida)*, «Arch. Zool. expl. gén.», 114, 317-348.
- [26] VOLKMANN-ROCCO B. (1973) - Tisbe biminiensis (Copepoda, Harpacticoida) a new species of the gracilis group, «Archo Oceanogr. Limmol.», 18, 71-90.
- [27] VOLKMANN-ROCCO B. (1974) - *Scanning electron microscope study of the modified spine characteristic for males of some Tisbe (Copepoda, Harpacticoida) species*, «Mar. Biol.», 25, 319-325.
- [28] VOLKMANN-ROCCO B. e FAVA G. (1969) - *Two sibling species of Tisbe (Copepoda, Harpacticoida): T. reluctant and T. persimilis n. sp. Research on their morphology and population dynamics*, «Mar. Biol.», 3, 159-164.
- [29] VOLKMANN-ROCCO B., BATTAGLIA B. e VAROTTO V. (1978) - *A study of reproductive isolation within the super-species Tisbe clodiensis (Copepoda, Harpacticoida)*, «Marine organisms. Genetics, Ecology and Evolution», 617-634, B. Battaglia and J. A. Beardmore, Eds., Plenum Publishing Corporation, New York, London.
- [30] ZOUROS E. (1973) - *Genic differentiation associated with the early stages of speciation in the mulleri group of Drosophila*, «Evolution», 27, 601-621.