# Evidenze morfologiche e genetiche a sostegno dell'esistenza di due specie di *Ophelia* (Annelida, Polychaeta) nel Mediterraneo occidentale. Un caso di speciazione ecologica?

F. Maltagliati<sup>a, 1</sup>, M. Casu<sup>b</sup> e A. Castelli<sup>a</sup>

<sup>*a*</sup> Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Via A. Volta 6-56126 Pisa (Italy) <sup>*b*</sup> Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Via F. Muroni 25-07100 Sassari (Italy)

Abstract: *Ophelia bicornis s.l.* è un polichete che vive in habitat intertidali sabbiosi del Mediterraneo e delle coste atlantiche europee. La sua sistematica è stata molto dibattuta in passato, poiché la variabilità dei caratteri morfologici diagnostici spesso confondeva o induceva in errore. Con il presente lavoro è stato effettuato un tentativo di fornire chiarimenti tassonomici all'interno del genere *Ophelia* in Mediterraneo. Sono stati raccolti 898 individui in 15 località del Mediterraneo occidentale. Sono stati analizzati i caratteri morfologici solitamente usati e 8 marcatori genetici (alloenzimi). Sulla base del numero dei nefridiopori è stato possibile individuare due morfotipi principali: 5+5 e 6+6. Le distanze genetiche, la *F*-statistica e l'AMOVA hanno concordato nel separare i due morfotipi a livello di specie. È da rilevare quindi la presenza, nel Mediterraneo occidentale, di due specie valide: *Ophelia bicornis* Savigny, 1818 e *Ophelia barquii* Fauvel, 1927, rispettivamente con 6 e 5 coppie di nefridiopori. Dato il potenziale per la dispersione larvale e quindi per il flusso genico a grandi distanze, si ritiene che il classico modello di speciazione allopatrica sia da escludere. È plausibile che sia avvenuta speciazione ecologica, in cui la selezione naturale a livello di microhabitat ha probabilmente giocato un ruolo importante nella differenziazione di queste specie.

*Keywords:* Alloenzimi; Caratteri morfologici; Dispersione; Divergenza; Flusso genico; Speciazione; Sistematica

## **1. INTRODUZIONE**

L'evoluzione della divergenza genetica e, in ultima analisi, la speciazione negli organismi marini con fasi larvali dispersive, rappresentano un argomento di notevole interesse. Di fatto, le teorie sui processi speciativi invocano di frequente un pressoché completo isolamento tra le popolazioni (speciazione allopatrica) [Dobzhansky, 1937; Porter e Johnson, 2002]. Vi sono tuttavia situazioni in cui la speciazione può avvenire in simpatria, anche in organismi marini [per es. Colgan e Ponder, 2002]. Vi sono inoltre prove indirette del fatto che le 'sibling species' in mare sono più spesso rilevate in condizioni di simpatria o parapatria piuttosto che in allopatria [Knowlton, 1993].

Le modalità riproduttive degli invertebrati marini bentonici sono cruciali nel determinare il potenziale dispersivo di molte specie e il livello di strutturazione genetica. Non sorprende il fatto che la divergenza genetica tra popolazioni con larva planctotrofica è tipicamente bassa, in quanto il flusso genico può agire su lunghe distanze [Slatkin, 1987]. Tuttavia, studi recenti su specie marine hanno evidenziato che non sempre la larva pelagica con lunga vita assicura efficienza di dispersione [Jones et al., 1999; Swearer et al., 1999; Luttikhuizen et al., 2003; Taylor e Hellberg, 2003]. Inoltre sono stati osservati eventi di speciazione anche in taxa marini con forme dispersive [Emlet et al., 1987; Carlon e Budd, 2002].

Il polichete fossorio intertidale *Ophelia bicornis* sensu lato è distribuito lungo le coste del

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> E-mail: maltagli@discat.unipi.it

Mediterraneo, dell'Atlantico nord-orientale e del Mare del Nord. Le specie comprese nel genere Ophelia hanno fecondazione esterna e le larve sono capaci di scegliere il substrato giusto dopo un periodo di vita pelagica che può durare alcune settimane [Wilson, 1948]. Lo status tassonomico di molte specie del genere Ophelia è ancora dibattuto a causa dell'elevata variabilità di molti dei caratteri morfologici. Fauvel [1927] distingueva le specie in base al numero di paia di branchie: Ophelia bicornis (15), Ophelia radiata (14) e Ophelia radiata var. barquii (13). Altri Autori [Bellan, 1964; Amoreux, 1977; Cantone e Costa, 1975] hanno raggruppato i tre taxa suddetti all'interno della specie polimorfica Ophelia bicornis sensu lato. Pilato et al. [1978] e Fassari [1998] hanno invece considerato il numero di paia di nefridiopori come carattere diagnostico che separa Ophelia barquii (5 paia di nefridiopori) da O. bicornis (6 paia).

L'obiettivo principale del presente lavoro è stato quello di chiarire la sistematica all'interno del genere *Ophelia* nel Mediterraneo occidentale analizzando alcuni tratti morfologici e usando marcatori genetici alloenzimatici in campioni provenienti da 15 località.

## 2. MATERIALI E METODI

#### 2.1. Campionamento

Sono stati raccolti complessivamente 898 esemplari di *Ophelia* cfr. *bicornis* in quattro siti della Corsica, dieci della Sardegna e uno della Toscana (Tabella 1, Figura 1), nell'estate del 2001.

Siti di campionamento	Abbrev.	Latitudine; Longitudine	N° ind. A	N° ind. B	N° ind. C
Moriani	MOR	42° 23' N; 9° 31' E	53	6	1
Pinarello	PIN	41° 38' N; 9° 18' E	29	22	9
Sagone	SAG	42° 07' N; 8° 41' E	56	-	4
Riccantu	RIC	41° 55' N; 8° 47' E	60	-	-
San Giovanni di Posada	SGP	40° 37' N; 9° 44' E	57	-	3
Osalla	OSA	40° 20' N; 9° 40' E	59	-	1
Costa Rei	REI	39° 12' N; 9° 34' E	57	-	3
Torre delle Stelle	STE	39° 08' N; 9° 23' E	42	12	6
Santa Margherita di Pula	PUL	38° 57' N; 8° 58' E	59	1	-
Portixeddu	POX	39° 26' N; 8° 24' E	57	-	3
Santa Giusta	GIU	39° 52' N; 8° 32' E	-	54	6
Mugoni	MUG	40° 37' N; 8° 11' E	2	45	13
Platamona	PLA	40° 53' N; 8° 38' E	57	-	3
Monti Russu	RUS	41° 08' N; 9° 06' E	60	-	-
Tirrenia	TIR	43° 37' N; 10° 17' E	42	11	5

**Tabella 1.** Siti di campionamento nel Mediterraneo occidentale e differenti morfotipi rilevati in base al numero di paia di nefridiopori.



Figura 1. Località di campionamento. Le abbreviazioni delle popolazioni sono riportate in Tabella 1.

## 2.2. Analisi morfologica

Sono stati contati il numero di branchie e di nefridiopori su entrambi i lati dell'animale, il numero di papille perianali ed il numero dei segmenti abranchiati anteriori e posteriori mediante uno stereomicroscopio da dissezione. Il numero di segmenti abranchiati anteriori ha mostrato assenza di polimorfismo in tutti i campioni. È stato osservato che il numero di segmenti abranchiati posteriori ed il numero di segmenti branchiati non erano indipendenti, perché, essendo costante il numero totale dei segmenti di tutti gli individui analizzati, all'aumentare del numero del primo carattere diminuiva il secondo e viceversa. I segmenti abranchiati anteriori e posteriori non sono stati dunque considerati nelle analisi successive.

#### 2.3. Elettroforesi degli alloenzimi

Una porzione di ciascun campione ( $\approx$ 30 mg) è stata diluita in 200 µl of tampone estraente [Tris (0.05M), EDTA (0.01M), Mercaptoetanolo (0.2%), Triton X100 (0.1%), corretto a pH 8 con HCl]. L'omogenato risultante è stato centrifugato a 13000 r.p.m. per 10 min a 4°C. Una frazione di supernantante di circa 1µl è stata applicata a fogli di acetato di cellulosa per l'elettroforesi (25 min a 300V), usando il tampone elettrodi TEM [Tris (0.1M), EDTA (0.01M), MgCl<sub>2</sub> (0.001M), corretto a pH 7.8 con acido maleico]. La colorazione degli enzimi è stata effettuata in accordo alle procedure

di Pasteur et al. [1987], alle quali sono state apportate piccole modifiche. Per le nostre analisi sono stati selezionati sette enzimi: arginina chinasi, APK (E.C. 2.7.3.3); glucosio-6-fosfato isomerasi, GPI (E.C. 5.3.1.9); isocitrato deidrogenasi  $(NADP^+)$ , IDH (E.C. 1.1.1.42); L-lattato deidrogenasi, LDH (E.C. 1.1.1.27); malato deidrogenasi, MDH (E.C. 1.1.1.37); fosfogluconato deidrogenasi, PGDH (E.C. 1.1.1.44) e fosfoglucomutasi, PGM (E.C. 5.4.2.2).

## 2.4. Analisi statistiche

Le analisi morfologiche hanno rivelato alta variabilità per le paia di branchie e le papille perianali, pertanto si è deciso di considerare solo il numero di nefridiopori come marcatore morfologico. In base al numero dei nefridiopori i campioni sono stati ordinati in tre morfotipi (A, B e C) corrispondenti rispettivamente agli individui 6+6, 5+5 e agli individui asimmetrici (non necessariamente 6+5 o 5+6).

Le frequenze alleliche, il numero medio di alleli e le eterozigosità osservate e attese sono state determinate separatamente per ciascun morfotipo in ciascun sito. Le deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg sono state calcolate per ciascun campione attraverso il test esatto di Fisher. I livelli di eterogeneità genetica all'interno e tra i campioni sono stati quantificati rispettivamente attraverso  $F_{\rm IS}$  e  $F_{\rm ST}$ , usando gli estimatori jackknifed di Weir e Cockerham [1984]. Inoltre, è stata effettuata l'analisi della varianza molecolare (AMOVA) in modo da esaminare la distribuzione e la significatività della varianza genetica tra i morfotipi [Excoffier et al., 1992]. È stata effettuata inoltre l'analisi dei cluster UPGMA sulle distanze genetiche di Nei [1978] tra le popolazioni.

Per le analisi sono stati utilizzati i software ARLEQUIN (disponibile sul sito web http://lgb.unige.ch/arlequin), FSTAT [Goudet, 1995], GENEPOP [Raymond e Rousset, 1995] e PHYLIP [Felsenstein, 1995].

# 3. RISULTATI

Il conteggio dei nefridiopori è risultato estremamente informativo, poichè ha rivelato due gruppi principali di individui (con 5 e 6 paia di nefridiopori), più un gruppo minore costituito da individui asimmetrici. La distribuzione basata sul numero di nefridiopori ha prodotto 16 campioni, 13 dei quali appartenenti al morfotipo A e tre al morfotipo B (Tabella 1). In alcuni casi il numero di nefridiopori era diverso da 5 o 6. A causa del basso numero di individui, i campioni con morfotipo C non sono stati considerati nelle analisi. L'analisi genetica ha fornito otto loci poliallelici alloenzimatici (le frequenze alleliche sono disponibili su richiesta agli autori). Nei loci GPI\* e *IDH-2*\* l'allele più comune era differente per i due morfotipi e molto vicino alla fissazione, avendo una frequenza quasi sempre superiore a 0.9. Sono stati rilevati 13 alleli privati per il morfotipo A (GPI\*96, GPI\*98, GPI\*101, IDH-1\*96, IDH-2\*102, *MDH*\*98, *PGDH*\*96, PGDH\*98, *PGDH\*104*, *PGDH\*106*, *PGM\*100* e *PGM\*102*) ed uno per il morfotipo B (APK\*96). Differenze significative tra le frequenze alleliche dei due morfotipi sono state rilevate mediante il test esatto di Fisher. Nessuno degli individui asimmetrici ha presentato un genotipo ibrido, cioè non sono stati trovati doppi eterozigoti per i due loci discriminanti GPI\* e IDH-2\*. Tra i 79 test di probabilità per verificare la presenza di deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, dopo la correzione sequenziale di Bonferroni, 11 casi (14%) sono risultati significativi, in relazione ad un generale deficit di individui eterozigoti. In Tabella 2 sono riportate le stime medie di variabilità genetica all'interno dei campioni.

Sample	$P_{99}$		M	MAL		$H_{o}$		$H_{\rm e}$	
MOR-A	46.3	±3.1	2.0	±0.3	0.120	±0.046	0.178	±0.065	
PIN-A	28.6	±0.3	2.5	$\pm 0.3$	0.156	$\pm 0.049$	0.226	$\pm 0.081$	
SAG-A	54.3	±0.9	1.6	$\pm 0.3$	0.087	$\pm 0.039$	0.129	±0.063	
RIC-A	58.8	$\pm 1.0$	2.0	$\pm 0.4$	0.108	±0.050	0.140	±0.065	
SGP-A	53.4	±1.2	2.3	$\pm 0.4$	0.135	±0.051	0.185	±0.075	
OSA-A	48.0	±3.6	2.4	$\pm 0.4$	0.125	$\pm 0.057$	0.176	±0.075	
REI-A	54.1	±0.9	2.1	$\pm 0.4$	0.135	$\pm 0.067$	0.185	$\pm 0.070$	
STE-A	39.1	±1.1	2.3	$\pm 0.3$	0.121	±0.052	0.190	±0.073	
PUL-A	52.4	±3.7	2.5	$\pm 0.5$	0.125	±0.054	0.206	±0.083	
POX-A	48.5	±2.9	2.6	$\pm 0.5$	0.108	$\pm 0.048$	0.191	±0.075	
PLA-A	52.8	±1.6	2.1	$\pm 0.5$	0.163	$\pm 0.073$	0.198	±0.087	
RUS-A	45.1	±3.1	2.1	±0.5	0.092	±0.045	0.188	±0.087	
TIR-A	26.0	±3.2	1.5	$\pm 0.2$	0.030	±0.017	0.041	±0.017	
PIN-B	19.9	±0.5	2.4	±0.2	0.171	±0.023	0.272	$\pm 0.044$	
GIU-B	48.0	±2.0	2.0	±0.2	0.062	$\pm 0.021$	0.119	±0.029	
MUG-B	39.9	±2.2	1.6	±0.3	0.114	$\pm 0.056$	0.185	±0.086	

**Tabella 2.** Stime di variabilità genetica ( $\pm$  errore standard) nelle popolazioni.  $P_{99}$ , percentuale di loci polimorfici; MAL, numero medio di alleli per locus;  $H_0$ , eterozigosità osservata;  $H_e$ , eterozigosità attesa. Le abbreviazioni delle popolazioni sono riportate in Tabella 1.

La *F*-statistica ha dato valori di  $F_{\rm IS}$  e  $F_{\rm ST} > 0.3$ ; questi valori indicano rispettivamente un deficit generale di individui eterozigoti ed un alto livello di divergenza genetica tra i campioni. A livello intra-morfotipo il valore di  $F_{\rm IS}$  è risultato ancora maggiore di 0.3, mentre il valore di  $F_{\rm ST}$  molto più basso [ $F_{\rm ST}(A) = 0.080 \pm 0.018$  e  $F_{\rm ST}(B) = 0.160 \pm 0.050$ ] (Tabella 3). Tutti i suddetti valori di  $F_{\rm IS}$  e  $F_{\rm ST}$  sono significativamente più grandi di zero (P < 0.001).

	Morfotipo A	Morfotipo B	Totale
F <sub>IS</sub>	0.317 ±0.051	$0.414 \pm 0.065$	$0.331 \pm 0.040$
95% C.I.	0.243-0.396	0.308-0.521	0.271-0.400
$F_{ST}$	$0.080 \pm 0.018$	$0.160 \pm 0.050$	$0.352 \pm 0.102$
95% C.I.	0.021-0.095	0.050-0.219	0.199-0.569

**Tabella 3.** F-statistica di Weir e Cockerham[1984].

L'analisi multilocus della varianza molecolare indica che la maggior parte della varianza genetica è stata trovata tra i morfotipi (65.4%), anche se il valore della varianza all'interno delle popolazioni è abbastanza alto (32.9%). Al contrario, la varianza trovata tra le popolazioni all'interno dello stesso morfotipo è particolarmente bassa (1.7%). I tre valori di  $\Phi$  sono risultati significativi al test di permutazione (Tabella 4).

Fonte della variazione	g.l.	Varianza	% Var.	statistica Φ	Р
Tra morfotipi	1	1.00476	65.36	$\Phi_{\rm SC} = 0.0491$	< 0.0001
Tra pop. all'int. dei morf.	14	0.02617	1.70	$\Phi_{\rm ST} = 0.6706$	< 0.0001
All'interno delle pop.	1570	0.50643	32.94	$\Phi_{\rm CT} = 0.6536$	< 0.0001

Tabella 4. Risultati dell'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA) basata sull'analisi dei cluster costruita sulla matrice delle distanze genetiche di Nei [1978].

L'intervallo delle distanze genetiche di Nei tra coppie di popolazioni dei due morfotipi è  $0.305 \le D \le 0.676$ , mentre le distanze all'interno di ciascun morfotipo sono sostanzialmete più basse ( $0.001 \le D \le 0.156$  e  $0.009 \le D \le 0.055$ , rispettivamente per i morfotipi A e B). Il dendrogramma UPGMA delle distanze genetiche di Nei [1978] raggruppa i campioni in due cluster monofiletici corrispondenti ai due morfotipi, separati da un nodo con elevato valore di bootstrap (98) (Figura 2).



Figura 2. Dendrogramma delle distanze genetiche di Nei's [1978] tra campioni. I valori di bootstrap bassi (<50) sono indicati da due asterischi, quelli moderati (50-80) da un asterisco; tutti gli altri nodi hanno valori >80. Le abbreviazioni delle popolazioni sono riportate in Tabella 1.

#### 4. DISCUSSIONE

## 4.1 Differenziazione delle specie

Le differenze tra i due morfotipi, determinate sulla base del numero dei nefridiopori, hanno una solida base genetica, con differenze significative nelle frequenze alleliche. In particolare i due morfotipi presentano differenze pressochè fissate nei loci  $GPI^*$  e  $IDH-2^*$ .

Gli individui asimmetrici non hanno genotipi eterozigoti in questi loci, e ciò esclude la possibilità che siano ibridi. Tali individui potrebbero essere il risultato della presenza di plasticità fenotipica. L'assenza di individui ibridi nelle località analizzate può dipendere i) da una completa incompatibilità gametica tra le due forme [McCartney e Lessios, 2002], ii) da periodi riproduttivi non sovrapposti, iii) da una bassa fitness degli ibridi rispetto alle forme parentali [Arnold, 1997; Porter e Johnson, 2002]. La separazione tra le due forme è corroborata dall'analisi delle distanze genetiche tra coppie di popolazioni dei due morfotipi. Le distanze genetiche ( $0.305 \le D \le 0.676$ ) suggeriscono che i morfotipi sono geneticamente differenziati a livello di specie, in accordo con la scala indicativa proposta da Thorpe e Solé-Cava [1994] (Figura 3).



Figura 3. Distribuzione delle distanze genetiche di Nei [1978] nei campioni di *Ophelia* tra morfotipi, all'interno di ciascun morfotipo.

I risultati ottenuti suggeriscono che gli individui da noi campionati e assegnati a *Ophelia bicornis sensu lato* non appartengono ad una specie fenotipicamente variabile, ma rappresentano due taxa distinti. Perciò la specie formalmente considerata *Ophelia bicornis sensu lato* da Bellan (1964), Cantone e Costa (1975) e Amoreux (1977) risulta divisa in *Ophelia bicornis* Savigny, 1818, con 6 paia di nefridiopori e *Ophelia barquii* Fauvel, 1927, con 5 paia di nefridiopori, in accordo con Pilato *et al.* [1978] e Fassari [1998].

## 4.2 Speciazione in Ophelia

Come ben rivelato dal campione della località corsa di Pinarello, *O. bicornis* e *O. barquii* possono presentarsi in simpatria e mantenere pool genetici indipendenti. Il rinforzo può essersi verificato attraverso differenti eventi di 'lotteria'

larvale nelle due forme (Li e Hedgecock, 1998). Tuttavia, poiché si conosce poco sulla biologia e sull'ecologia riproduttiva delle specie di Ophelia in Mediterraneo, si può solo speculare sulla presenza di qualche meccanismo biologico che possa aver isolato questi taxa. Le barriere riproduttive tra specie affini che intervengono in simpatria possono essere di tipo prezigotico o postzigotico. L'isolamento prezigotico può essere stato favorito da meccanismi quali l'evoluzione della specificità di proteine che controllano la fecondazione, in particolare la regolazione dei sistemi di riconoscimento tra gameti [McCartney e Lessios, 2002]. Un'altra spiegazione che può essere avanzata per giustificare come due specie affini a fecondazione esterna possano coesistere, prendono in considerazione l'evoluzione di periodi riproduttivi non sovrapposti. L'isolamento postzigotico, invece, può instaurarsi grazie alla bassa fitness o alla non vitalità degli ibridi.

Date le grandi potenzialità dispersive di Ophelia legate alla lunga vita pelagica delle larve, si esclude il classico scenario che assume la divergenza allopatrica o parapatrica. La presenza in simpatria di specie di *Ophelia* morfologicamente e geneticamente divergenti potrebbe essere invece interpretata come risultato della speciazione ecologica [Johannesson, 2003]. Le due importanti condizioni necessarie per la speciazione ecologica che possono aver operato nella differenziazione delle due specie di Ophelia sono i) la presenza di polimorfismi all'interno della popolazione e ii) la scarsità o la mancanza di competizione interspecifica che risulta in una barriera genetica tra specie che si stanno formando [Skúlason e Smith, 1995]. Pertanto gli eventi di speciazione possono essere avvenuti in presenza di flusso genico ed il ruolo preminente nell'insorgenza delle due specie è stato giocato dalla selezione naturale. La divergenza con flusso genico [Rice e Hostert, 1993] è un modello in grado di spiegare gli eventi di speciazione che possono essere avvenuti in Ophelia in Mediterraneo. Tale modello prevede che l'azione diversificante della selezione naturale deve essere estremamente forte, in modo tale da superare gli effetti omogenizzanti del flusso genico tra le popolazioni [Rice e Hostert, 1993]. Una possibilità è che le due forme da noi definite in simpatria possano essere in realtà in microallopatria. Vale a dire che le due specie potrebbero occupare differenti microhabitat spazialmente separati all'interno della 'colonna di sabbia'. I microhabitat potrebbero presentare differenze ecologiche in termini di elementi biotici e abiotici, come ad esempio differenti interazioni con altre specie o diversa disponibilità di risorse trofiche. Purtroppo al momento non esistono dati sulla

differenziazione a livello di microhabitat e neanche sulla densità e sul movimento delle larve e degli adulti di *Ophelia* nel corso dell'anno. Di conseguenza, per validare queste ipotesi, sono necessarie ulteriori indagini finalizzate allo studio della distribuzione microspaziale degli individui e sulle caratteristiche ecologiche dell'habitat.

# 5. CONCLUSIONI

11 nostro studio ha dimostrato l'utilità per dell'approccio morfologico-genetico la risoluzione di sottili differenze biologiche. Inoltre, la relazione tra divergenza genetica e morfologica in Ophelia nell'habitat intertidale sabbioso del Mediterraneo occidentale fornisce un esempio di speciazione non allopatrica in organismi marini a fecondazione esterna.

La presente ricerca rappresenta un contributo alla conoscenza della biodiversità marina e di alcuni processi che l'hanno determinata. I risultati ottenuti aprono la strada ad altre indagini sulle specie del genere *Ophelia*, con lo scopo di capire gli aspetti della loro biologia ed ecologia. L'integrazione di tali risultati contribuirà a fornire un quadro più chiaro su aspetti della diversità biologica degli invertebrati marini, che rappresenta un comparto importante e sottostimato della biodiversità globale.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Amoreux, L., Ophelia bicornis Savigny, 1818, Ophelia radiata (Delle Chiaje, 1828), two phenotypical forms of the same species. In: Essays on Polychaetous Annelids in memory to dr. Olga Hartman. Allan Hancock Foundation Publications, University of Southern California Press, Los Angeles, CA, 267-278, 1977.
- Arnold, M.L., *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, New York, 1997.
- Bellan, G., Contribution à l'étude systématique, bionomique et écologique des Annélides Polychètes de la Méditerranée. *Recueil des travaux de la Station marine d'Endoume* 33: 1-372, 1964.
- Cantone, G., e G. Costa, Variabilità nel numero di branchie, delle papille perianali e delle papille rettali in una popolazione di *Ophelia bicornis* Savigny delle coste orientali della Sicilia (Annelida Polychaeta). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli* 39(suppl.): 22-36, 1975.
- Carlon, D.B., e A.F. Budd, Incipient speciation across a depth gradient in a scleractinian coral? *Evolution* 56: 2227-2242, 2002.
- Colgan, D.J., e W.F. Ponder, Genetic discrimination of morphologically similar,

sympatric species of pearl oyster (Mollusca: Bivalvia: *Pinctada*) in eastern Australia. *Marine and Freshwater Research* 53: 697-709, 2002.

- Dobzhansky, T., Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York, 1937.
- Emlet, R., L. McEdward, e R.R. Strathmann, Echinoderm larval ecology viewed from the egg. In: Jangoux M, Lawrence JM, eds. *Echinoderm Studies 2*. AA Balkema, Rotterdam, 55-136, 1987.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, e J.M. Quattro, Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics* 131: 479.491, 1992.
- Fassari, G., Censimento dei policheti dei mari italiani: Opheliidae Malmgren, 1867. Atti della Società Toscana di Scienze Naturali Serie B 105: 45-49, 1998.
- Fauvel, P., Polychètes sédentaire. In: *Faune de France vol. 16.* Lechevalier, Paris, 1-494, 1927.
- Felsenstein, J., PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1995.
- Goudet, J., FSTAT version 1.2, a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486, 1995.
- Johannesson, K., Evolution in *Littorina*: ecology matters. *Journal of Sea Research* 49: 107-117, 2003.
- Jones, G.P., M.J. Milicich, M.J. Emslie, e C. Lunow, Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature* 402: 802-804, 1999.
- Knowlton, N., Sibling species in the sea. *Annual Review in Ecology and Systematics* 24: 189-206, 1993.
- Li G., e D. Hedgecock, Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science* 55: 1025-1033, 1998.
- Luttikhuizen, P.C., J. Drent, W. Van Delden, e T. Piersma, Spatially structured genetic variation in a broadcast spawning bivalve: quantitative vs. molecular traits. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 260-272, 2003.
- McCartney, M.A., e H.A. Lessios, Quantitative analysis of gametic incompatibility between closely related species of neotropical sea urchins. *Biological Bulletin* 202: 166-181, 2002.

- Nei, M., Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590, 1978.
- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, F. Catalan, e J. Britton-Davidian, *Manuel technique de* génétique par électrophorèse des protéines. Paris: Lavoisier, 1987.
- Pilato, G., G. Belcastro, e R. Cassibba, Il valore specifico di *Ophelia barquii* Fauvel, 1927 (Annelida Polychaeta). *Animalia* 5: 395-403, 1978.
- Porter, A.H., e N.A. Johnson, Speciation despite gene flow when developmental pathways evolve. *Evolution* 56: 2103-2111, 2002.
- Raymond, M., e F. Rousset, GENEPOP (ver. 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249, 1995.
- Rice, W.R., E.E Hostert, Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 47: 1637-1653, 1993.
- Skúlason, S., e T.B. Smith, Resource polymorphism in vertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 366-370, 1995.
- Slatkin, M., Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792, 1987.
- Swearer, S.E., J.E. Caselle, D.W. Lea, e R.R. Warner, Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish. *Nature* 402: 799-802, 1999.
- Taylor, M.S., e M.E. Hellberg, Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* 299: 107-109, 2003.
- Thorpe, G.P., e A.M. Solé-Cava, The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta* 23: 3-18, 1994.
- Weir, B.S., e C.C. Cockerham, Estimating Fstatistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370, 1984.
- Wilson, D.P., The relation of the substratum to the metamorphosis of *Ophelia* larvae. *Journal* of the Marine Biological Association of the United Kingdom 27: 723-760, 1948.