

ELS ESTUDIS GENÈTICS EN TAXONOMIA

Eduard Petitpierre *

Rebut: gener 1984

SUMMARY

The genetical studies in taxonomy

The taxonomy has taken a new and actual meaning since the most general acceptance of evolution through development of the modern synthesis between darwinism and mendelism. The concept of biological species was a consequence of that development but the mode by which a new species arises is still a matter of controversy, as it is the amount of genetic change necessary for speciation to take place. The kinds of variability and the methods currently used in Genetics to distinguish between allied species are also reported together with some representative examples. Finally, the origin of higher taxonomic categories and the present status of this problem is briefly discussed.

INTRODUCCIÓ

La característica més sobresortint de la vida en el nostre món és potser la seva enorme diversitat. Cadascun dels nivells d'organització dels éssers vius mostra un ampli marge de variació, tant en les molècules, com en les cèl·lules, els teixits, els òrgans, els individus i les poblacions, les espècies i les comunitats. L'estudi d'aquesta diversitat és objecte específic de les distintes branques constitutives de la Biologia moderna, i encara que per a molts dels especialistes d'aquestes branques no sigui la finalitat principal, directament o indirecta contribueixen a una millor comprensió de la variabilitat biològica, bé d'una manera descriptiva o bé conceptual.

La necessitat de la classificació dels organismes segons les seves semblances i diferències ens apareix del tot punt evident com a base prèvia pel progrés a qualsevol disciplina de la Biologia. La comprovació de resultats científics exigeix poder repetir les observacions de camp i/o laboratori, la qual cosa seria impossible de realitzar acuradament sense un coneixement segur del material biològic utilitzat. Per tant, no és, doncs, d'estranyar el desenvolupament precoç de la taxonomia dins l'esdeveniment històric de la Biologia, des del segle XVII a l'actualitat. La identificació i ordenació de les diferents espècies dels éssers vivents va constituir el motiu principal de treball de molts dels científics interessats per la natura dels segles XVIII i

* Departament de Genètica. Facultat de Ciències. Universitat de Mallorca. Ciutat de Mallorca.

xix. Adhuc, avui en dia, a pesar del descens relatiu experimentat pels estudis taxonòmics arreu del món, no són pas rars els biòlegs de molts països dedicats a l'esforç d'elaborar, amb noves perspectives, una taxonomia de bases més i més sòlides. En aquesta tasca col·laboren sovint nombrosos aficionats, en una gran part col·leccionistes, de vegades amb un entusiasme superior fins i tot al dels propis professionals.

La taxonomia clàssica procura aconseguir la descripció, anomenament i classificació dels organismes basant-se sobretot en els caràcters morfològics, perquè són els aspectes d'observació més immediata i senzilla, la qual cosa, afegiríem avui, no va en absolut correlacionada amb una fàcil interpretació de com i per què es produeixen aquests trets morfològics. La taxonomia clàssica continua sent avui la pedra angular sobre la qual s'ha establert l'ordenació de les diverses categories dels éssers vivents, però malgrat la seva importància, no se la pot considerar aïllada de totes les altres contribucions de coneixements sobre la vida, determinants de la ciència que anomenem taxonomia moderna. Al meu entendre, una bona part del rebuig de molts biòlegs o estudiants de Biologia cap a la taxonomia té origen en la sobrevaloració, i moltes vegades l'ús exclusiu, de la morfologia per a la determinació sistemàtica, sense cap més horitzó que el d'etiquetar amb dos noms llatins espècimens problemàtics. Els excessos «nomenclatorials» de bastants naturalistes de museu del segle passat o de l'actual, han allunyat, per la seva curtedat de visió, no poques vocacions incipients de biòlegs que acaben avorrint la taxonomia per l'aridesa inherent a aquesta mentalitat exageradament descriptiva i estàtica. Sens dubte, l'avenç, tan espectacular d'altres branques de la Biologia, no interessades de forma immediata en les característiques morfològiques, com la Bioquímica i, en general, la Biologia Molecular, ha suposat una força d'atracció molt més potent a la mostrada per la taxonomia. No obstant això, com tractaré d'explicar a continuació, els avenços en moltes disciplines biològiques i també en Biologia Molecular, tenen, o poden tenir, una repercussió pràctica en el camp de la taxonomia, i és de desitjar un augment de les persones dedicades en aquesta línia de treball, amb la nova il·lusió encoratjadora de l'enfocament multidiscipli-

nari de les recerques modernes sobre taxonomia i evolució.

TAXONOMIA I TEORIA SINTÈTICA DE L'EVOLUCIÓ

La taxonomia clàssica, fonamentada en les normes proposades per Linné i desenvolupades pels seus continuadors, va adquirir una dimensió congruent i més exacta amb l'adveniment de les teories evolucionistes modernes, postulades en primer lloc per LAMARCK (1809), però tan sols acceptades anys després, en mostrar DARWIN (1859) el procés d'evolució de les espècies per selecció natural amb un gran nombre d'exemples il·lustratius. A partir de Darwin es pot dir que les relacions de semblança morfològica entre les espècies corresponen a una similitud de parentiu; hi ha, doncs, una comunitat d'origen dels éssers vius al llarg de l'espai i del temps. D'aquí, una ordenació sistemàtica d'espècies serà tant més exacta com millor reflecteixi les autèntiques relacions filogenètiques entre elles.

Aquesta idea crucial introduïda per Lamarck, i sobretot per Darwin, de la comunitat d'ascendència, es va establir sense cap coneixement de les lleis de l'herència, i amb escassa comprensió del significat d'altres conceptes bàsics per entendre l'evolució, com són els de mutació, variació, població i espècie. El redescobriment de les lleis formulades per MENDEL (1865) sobre la transmissió i segregació dels factors de l'herència, va obrir la via d'aproximació més adient per interpretar l'evolució en un sentit racional. La transmissió de qualsevol caràcter fixat dins el patrimoni genètic d'un individu, es realitzava segons lleis ben definides, i d'acord amb la teoria darwiniana, a través del tamís exercit per la selecció natural, en determinar el valor adaptatiu del caràcter dins les condicions ambientals concretes en què viu l'individu portador. De fet, tant els caràcters de variació discontinua, qualitatiu, com els de variació gradual, quantitatiu, es demostrà que eren controlats per gens, i modulats per l'acció ambiental en la seva expressió fenotípica particular. Les diferències interspecífiques, per separar per exemple dues espècies congenèriques, eren fruit d'una diversitat dels respectius fons genètics, atribuïble sobretot a fenòmens mutacionals de caire absolutament aleato-

ri, i a l'efecte determinístic de la selecció natural sobre els nous fenotips mutants.

La convergència del darwinisme amb la Genètica va originar, passat un primer període d'enfrontament, la teoria sintètica de l'evolució, sobre les bases prioritàries ja esmentades, però també com una teoria integradora de totes les ciències de la natura o de la Terra implicades en l'estudi de l'evolució. Un punt crític d'extraordinària importància dins la teoria sintètica, va ésser precisar el concepte de població com a la unitat evolutiva essencial per la divergència intra- i interspecífica. Els individus eren, així, només dipositaris d'una petita part del patrimoni genètic comú compartit per la població, mitjançant els intercanvis deguts a la reproducció sexual. L'elecció de l'individu «tipus», representatiu de cada espècie morfològica segons els taxònoms clàssics, a la llum de la biologia de poblacions era una abstracció injustificada, perquè l'espècie s'havia de definir pels vincles de reproducció, reals o almenys potencials, entre els individus components, i no per pures semblances morfològiques.

L'esforç per elaborar la teoria sintètica de l'evolució (1935-1950) va dur-se a terme i, principalment, va arribar a un consens quasi general, entre altres raons, per l'enfocament multidisciplinari dels seus promotors més significats. R. A. Fisher, J. B. S. Haldane, S. Wright i T. Dobzhansky, establiren els fonaments de la genètica de poblacions per mitjà de models matemàtics comprovats després experimentalment, tot destacant el paper dels factors evolutius més importants, com la selecció, la mida de la població, deriva genètica i taxa de mutació o recombinació. A part de les contribucions d'aquests genètics, la teoria sintètica va construir-se gràcies a les aportacions innovadores de G. G. Simpson dins el camp de la Paleontologia, E. Mayr, B. Rensch i J. S. Huxley dins la Zoologia, i G. L. Stebbins i M. J. D. White com a especialistes en citogenètica evolutiva de les plantes i dels animals, respectivament. El desenvolupament posterior del pes atribuït a altres factors evolutius, també d'influència marcada en la divergència de les poblacions, com la selecció dependent de les freqüències, la selecció diversificadora, la deriva meiótica, i darrerament la deriva molecular, ha ajudat a completar el marc conceptual per entendre els processos de canvi genètic intraspecífic, per tant de la

diferenciació de poblacions, races o subespècies. Malauradament, el fenomen de la formació de noves espècies, l'especiació, va romandre i roman encara ara molt poc conegut donades les complexitats d'anàlisi, a les quals em referiré més endavant. Cal, emperò, confiar en el renovat interès suscitat pels estudis sobre l'especiació d'ençà uns deu anys per poder donar un poc més de llum al «misteri dels misteris», com l'anomenà Darwin.

EL CONCEPTE D'ESPÈCIE BIOLÒGICA I L'ESPECIACIÓ

El problema més freqüent plantejat a la gran majoria dels taxònoms és el de la determinació i caracterització de les espècies. De forma extraordinàriament simplista es podria considerar com l'esforç per donar a cada espècie un nom definidor, i separador a la vegada, respecte a les espècies veïnes. Malgrat la importància d'una acurada identificació específica i de les dificultats sovint plantejades per arribar-hi, no basta en absolut donar-nos per satisfets si resollem aquest punt. L'espècie definida així no passa de ser una col·lecció més o menys nombrosa d'exemplars de morfologia molt semblant, classificats amb el mateix nom dins una vitrina, les caixes o els herbaris de qualsevol museu, juntament amb unes quantes línies o pàgines per a la diagnosi específica en una revista local o nacional. Les espècies són o han estat constituïdes, si es tracta de formes ja extingides, per individus que poden creuar-se entre si per donar descendència fèrtil, i que interactuen d'una determinada manera amb el seu entorn físic i biològic. Els individus d'una espècie participen, doncs, parcialment del joc de gens que són patrimoni d'ella, els quals permeten explotar amb major o menor eficàcia, segons cada cas, una parcel·la ambiental concreta, definida en l'espai i en el temps, el que més correctament anomenem un nínxol ecològic. Aquesta adequació entre l'espècie i el seu nínxol ecològic comporta preservar les combinacions de gens apropiades per a tal fi, davant de la mescla derivada dels possibles intercanvis genètics amb altres espècies veïnes. Per arribar al status d'espècie biològica, en conseqüència, és del tot necessari que s'hagin creat barreres d'esterilitat respecte a les espècies més pròximes, conservadores d'aquelles

combinacions de gens amb valor adaptatiu esmentades abans. La definició d'espècie biològica com a conjunt d'individus amb capacitat d'intercanvi reproductor, en sentit estricte, és només aplicable als organismes de reproducció sexual exclusiva o almenys parcial, perquè en els de reproducció únicament vegetativa, com succeeix en els bacteris, alguns eucariotes primitius i certs vegetals superiors, tan sols es pot avaluar a partir de les pures semblances o per la via indirecta de les analogies (en el cas de les plantes, per exemple), respecte a la situació trobada a les espècies més pròximes a aquestes, però de reproducció sexual, i igual podríem afegir quant a l'aplicació del concepte d'espècie biològica a les formes fòssils.

Generalment, es considera l'especiació com un subproducte de la diferenciació genètica. Poblacions aïllades poden anar divergint en el temps fins a constituir rares, subespècies, i en darrer lloc espècies, quan ja han adquirit l'isolament reproductor respecte a les poblacions d'origen. Per descomptat, no totes les poblacions deuen seguir la pauta anterior, puix tan sols una petita part de les subespècies continuen la seva diferenciació fins a assolir el rang d'espècies, bé sigui per manca d'un isolament genètic adient o per la pròpia constitució genètica de la mateixa població. En l'actualitat es reconeixen diferents tipus d'especiació, i el paper jugat per cadascun d'ells és objecte de discussions sovint fortes. El model clàssic d'especiació, la geogràfica o allopàtrica, comporta isolament de poblacions en l'espai com a condició per poder acumular progressivament els canvis genètics determinants de l'especiació. El model allopàtric d'especiació sembla que es pot aplicar principalment en els animals i les plantes amb bona capacitat de dispersió. No obstant això, darrerament altres models d'especiació han rebut un notable suport en estudiar-se exemples ben significatius d'especiació parapàtrica i també, encara que menys, d'especiació simpàtrica. El primer tipus es dona entre certes poblacions contigües, sense necessitat d'aïllament espacial i freqüentment per reordenacions cromosòmiques, en animals de poca mobilitat o plantes d'escassa potencialitat dispersiva, mentre el segon es produeix dins la mateixa àrea colonitzada per l'espècie antecessora en adquirir-se sistemes d'aïllament reproductor previs a l'ocupació d'un nou nínxol ecològic, un tipus

d'especiació probablement molt comú dins els animals fitòfags, paràsits i parasitoides (BUSH, 1975). A part dels exemples ben coneguts a les plantes d'especiació per poliploidia, alguns autors reconeixen una altra forma d'especiació, la quàntica o saltacional, pel sorgiment bruscat d'una espècie nova a partir d'una població perifèrica semiaïllada de l'espècie ancestral (GRANT, 1971). Els casos més rellevants d'aquest darrer tipus s'han descrit en plantes i comporten, sovint, reordenacions cromosòmiques implicades en el canvi de reproducció encreuada a reproducció per autofecundació, característica de la nova espècie.

El coneixement de com s'ha originat una nova espècie obliga a examinar molt detingudament tota una sèrie de paràmetres de caire biològic o, àdhuc, físic, a fi d'obtenir una dimensió adequada del fenomen per respondre amb objectivitat. Alguns taxònoms opinen que és superflu el com s'ha format una espècie, el que importa és classificar-la correctament i compararla amb les espècies veïnes. Això no obstant, per classificar amb seguretat una espècie és oportú examinar, a part de la morfologia, un conjunt d'aspectes discernibles només amb observacions de camp complementades amb anàlisis de laboratori. WHITE (1978) enumera alguns dels aspectes documentals més convenients per interpretar els casos d'especiació, els quals amb algunes petites modificacions meves podien classificar-se de la següent manera: 1) distribució geogràfica present i, si és possible, passada; 2) descripció morfològica detallada; 3) variació geogràfica, relativa a les possibles races, varietats o subespècies; 4) dades ecològiques d'hàbitats i nínxols; 5) anàlisi dels polimorfismes bioquímics; 6) descripció completa dels cariotips, mides de genoma i distribució de les diferents fraccions d'ADN, sobretot de la quantitat i localització cromosòmica de l'ADN satèl·lit; 7) cicle vital i, particularment, l'època reproductora; 8) resultats sobre la possible hibridació experimental, i/o natural, junt amb una anàlisi profunda dels híbrids i de la seva eventual fertilitat; i 9) examen minuciós dels sistemes etològics d'aïllament sexual interspecífic. Aquest programa de treball és realment molt extens i difícilment realitzable per una sola persona, a menys que actuï en col·laboració amb diferents especialistes; és a dir, per a dur-lo a terme cal un equip d'investigadors. Constitueix, però, un excel·

lent ventall dels objectius a assolir, almenys d'una manera aproximativa. De tots els aspectes citats per caracteritzar una espècie, biològics o físics, entre els primers tractarà de descriure a continuació les modificacions genètiques relacionades amb l'especiació, i algunes de les metodologies més adients per a detectar-les.

CANVIS GENÈTICS EN L'ESPECIACIÓ

La Genètica moderna disposa d'una àmplia gamma de tècniques i metodologies per calibrar quantitativament el grau de divergència entre dues o més formes, amb independència del seu status taxonòmic. La valoració quantitativa suposa, generalment, un nivell de rigor en l'estimació de les diferències genètiques no comparable en absolut a l'assolit per la taxonomia clàssica amb l'ús quasi exclusiu dels caràcters morfològics. L'objectivització de les estimacions quantitatives de divergència o similitud genètiques no és, emperò, senzilla, ja que s'ha d'avaluar el pes específic atribuïble a cadascun dels aspectes mesurats sobre l'especiació, el qual pot variar d'uns grups d'espècies a altres, i evitar també la selecció esbiaixada de certes diferències basant-se en idees preconcebudes. Molt sovint, l'aplicació de tècniques quantitatives modernes per reconèixer relacions interspecífiques, dóna resultats concordants als obtinguts per la taxonomia clàssica. Aquest fet no es pot de cap manera considerar com un argument en contra de l'ús de les esmentades tècniques perquè, en primer lloc, no es pot saber *a priori* si hi haurà concordança o no, i en segon lloc, suposant que hi hagi correspondència, l'aprofundiment de les relacions de parentiu entre espècies facilitarà, sens dubte, revelar alguns dels aspectes bàsics sobre la seva especiació que, d'una altra manera, romandrien ignorats.

Una classificació sistemàtica, potser excessivament simplista però de fàcil comprensió, de les tècniques per estimar el grau de separació o identitat genètica entre espècies o tàxons de tots els tipus, consisteix a dividir-les segons els respectius nivells d'organització: a) molecular; b) cel·lular i cromosòmic, i c) organísmic.

a) Nivell molecular

El material genètic de la quasi totalitat

dels organismes, amb l'excepció d'alguns virus d'ARN, és l'àcid desoxirribonucleic o ADN, constituït per les combinacions de quatre classes de nucleòtids, diferents segons el tipus de base nitrogenada present, adenina (A), guanina (G), citosina (C), o timina (T). El nombre d'aquestes unitats dins una molècula d'ADN sol ésser molt gran, de l'ordre de milers, centenars de milers, o fins i tot milions de nucleòtids. Hi ha, per tant, una enorme capacitat de formar possibles combinacions entre nucleòtids dins les molècules d'ADN. Els avenços de la genètica molecular a les dècades dels anys 1950 i 1960 demostraren que els productes immediats dels gens eren les proteïnes, i, per tant, hi havia una relació directa entre la seqüència de nucleòtids de l'ADN d'un gen i la seqüència dels aminoàcids de la proteïna codificada per aquest gen. La taxonomia molecular podrà emprar així tant l'ADN com les proteïnes per estimar el grau de divergència genètica.

La introducció molt recent de les tècniques de l'enginyeria genètica, per clonació de fragments específics d'ADN dins bacteris, mitjançant plàsmids o fags com a vectors d'aquest transport, ha subministrat una eina incomparable per a aconseguir una gran quantitat dels citats fragments d'ADN a fi de seqüenciar-los i poder detectar acuradament les diferències interspecífiques entre fragments homòlegs (MAXAM & GILBERT, 1977). Aquestes tècniques s'utilitzen enguany amb profusió per examinar l'estructura primària de diversos tipus de gens, en particular d'aquells dels quals es pot aïllar fàcilment el corresponent ARN (missatger, ribosòmic o de transferència), de certes fraccions d'ADN, moderadament o altament repetitiu, àdhuc de l'ADN mitocondrial i d'algunes seqüències d'ADN únic, de funció desconeguda, emprades com a marcadores per localitzar gens. Els resultats, molts d'ells encara en fase d'elaboració, no permeten conclusions absolutament segures, però sí sembla que existeixen bastants més diferències entre individus, poblacions o espècies, de les previsible basades en els estudis anteriors.

L'altre mètode per a calibrar el grau d'homologia entre ADNs d'origen divers és l'hibridització. Aquest procediment de tipus indirecte per revelar l'homologia genètica va ésser emprat per HOYER *et al.* (1964) en un dels primers treballs, seguit per molts d'altres fins als anys presents.

En línies generals, el mètode consisteix a observar la temperatura a la qual se separen, per desnaturalització, les dues cadenes de l'ADN híbrid, una de les quals s'ha marcat ràdioactivament a fi d'obtenir estimacions quantitatives, relatives a la de l'ADN reassociat que actua com a patró. A major homologia entre els ADN's d'origen divers més gran serà l'estabilitat de la molècula respecte a la de l'ADN reassociat. Per terme mitjà es considera que un 1 °C de descens a la temperatura de fusió de l'ADN híbrid relativa a la del patró, és equivalent a una diferència per absència d'aparellament entre bases nitrogenades de l'ordre d'un 1 %. La desnaturalització i reassociació de l'ADN té, així mateix, una altra aplicació molt interessant en els organismes eucariòtics, la de reconèixer les proporcions i la distribució de les distintes classes de seqüències, úniques, moderadament i altament repetitives, ja que la cinètica de reassociació d'aquestes seqüències és directament proporcional a la taxa de redundància. Entre les diverses classes d'ADN, l'amplitud i localització de l'ADN altament repetitiu té molt sovint un significat taxonòmic i evolutiu, perquè s'han detectat diferències fins i tot entre espècies bessones, unes espècies de morfologia molt semblant o, àdhuc, indiferenciables, amb un grau d'homologia genètica bastant superior al de les altres espècies congènriques.

Les tècniques per analitzar i separar les proteïnes s'havien desenvolupat més àmpliament que les de l'ADN, perquè fins fa pocs anys era més fàcil aïllar i seqüenciar proteïnes que àcids nucleics. La seqüenciació de proteïnes homòlogues serveix per a verificar el nombre de substitucions d'aminoàcids i determinar el nivell de parentiu genètic entre dos organismes. De totes les tècniques per diferenciar proteïnes, l'electroforesi en gels de midó o de poliacrilamida és la més universalment emprada per a l'anàlisi de la variabilitat genètica, principalment de les variants enzimàtiques (alloenzims). Des dels estudis pioners de HUBBY & LEWONTIN (1966) de separació de proteïnes de *Drosophila* segons la seva mobilitat en un camp elèctric, l'electroforesi s'ha utilitzat en tota mena d'espècies amb els resultats ja coneguts de trobar-hi en quasi totes nivells bastant considerables de polimorfisme enzimàtic (AYALA, 1975; NEVO, 1978). A partir de les substitucions al·lèliques detectables electroforèticament en

aquests enzims, s'han elaborat fórmules per estimar les distàncies genètiques (NEI, 1972), de summa importància a l'hora de plantejar-se relacions filogenètiques. També les tècniques immunològiques fan possible arribar a estimacions de distàncies genètiques equiparables a les precedents. Les diverses tècniques immunològiques, immunoelectroforesi, immunodifusió, fixació del complement, etc., mesuren el grau de reacció d'anticossos, produïts generalment per conills immunitzats, en presència d'antigens homòlegs procedents de diverses espècies. Hi ha una correlació positiva entre la intensitat de la reacció i la taxa de parentiu genètic, però no totes les proteïnes d'una determinada espècie es comporten de la mateixa manera respecte a les corresponents homòlogues d'una altra espècie; convé, doncs, trobar els valors mitjans.

b) Nivell cel·lular i cromosòmic

L'augment en la complexitat morfològica i funcional dels organismes al llarg de l'evolució comporta, com és lògic, un increment en la informació genètica, el qual es pot correlacionar amb les variacions en el contingut d'ADN, puix que si es prenen els continguts mínims dins cada grup d'organismes s'observa un canvi progressiu cap als valors més alts, des dels sistemes vivents més senzills com són els virus i els bacteris fins als més complexos com poden ésser els mamífers o les fanerògames més avançades. Les diferències en la mida del genoma, una constant específica, no han de guardar, necessàriament, cap relació consistent amb el nombre de cromosomes. Emperò, espècies estretament emparentades poden sovint diferir de forma notable en els continguts d'ADN per cèl·lula (paradoxa C), mesurats en experiments de microspectrofotometria. En certs grups d'animals, i també de plantes, s'ha detectat freqüentment un descens en els valors d'ADN per cèl·lula relatiu al grau d'especialització evolutiva de les espècies d'aquests grups (HINEGARDNER, 1975). Les diferències interspecífiques entre organismes molt pròxims, quant a la quantitat d'ADN per cèl·lula, solen referir-se, en una gran part, a la proporció d'heterocromatina constitutiva, cromatina amb molt poca activitat genètica encara que no absolutament inerta. Una part apreciable d'aques-

ta heterocromatina és d'ADN altament repetitiu, el qual potser està relacionat amb els fenòmens d'especiació i té, en conseqüència, un fort interès per a la Taxonomia.

Les diferències cromosòmiques donen criteris d'una gran vàlua per la separació de les espècies, car pràcticament tots els organismes mostren característiques distintives en els cromosomes. El nombre, la morfologia cromosòmica estimada quantitativament, i el sistema de la determinació del sexe, són els paràmetres més comunament estudiats. A un nivell més fi, els cariotips, però, s'han de caracteritzar també amb les tècniques de bandeig cromosòmic, per diferenciar longitudinalment cadascun dels elements, i reconèixer amb certesa les reordenacions cromosòmiques implicades en els processos d'especiació. Fins i tot espècies de cariotips suposadament idèntics, com és el cas de les *Drosophila* homoseqüencials de les illes Hawaii, amb models indifferenciabls de bandes a cromosomes gegants, han evidenciat més endavant discrepàncies en el contingut d'ADN satèl·lit (ADN altament repetitiu).

El paper dels canvis cromosòmics sobre l'especiació es discuteix molt actualment, perquè per alguns autors no són mai causa directa d'aquest fenomen donat que sovint no tenen efectes morfològics; altres, pel contrari, abonen la seva importància com a sistemes modificadors de la regulació genètica amb efectes majors sobre els patrons del desenvolupament. En aquest darrer sentit ja es comencen a obtenir dades significatives sobre el possible paper essencial de les reordenacions cromosòmiques en la regulació (BUSH, 1981). De tota manera, es pot concloure que tant el contingut d'ADN per cèl·lula com l'arquitectura dels diversos components del genoma, i les característiques distintives del cariotip, forneixen generalment resultats de la màxima rellevància taxonòmica i evolutiva.

c) Nivell organísmic

Els caràcters morfològics o del comportament són determinats per l'acció dels gens, tal com ho són, també, per exemple, les proteïnes, però a diferència d'aqueixes darreres entre el gen i la seva expressió final morfològica o fisiològica es produeixen tota una sèrie d'interaccions en el desenvolupament, difícils de precisar en l'es-

tat actual de coneixements, que allunyen la relació gen-caràcter. Els aspectes de valor taxonòmic per a la classificació de les espècies congenèriques no són mai fruit, probablement, d'una o d'unes poques parelles de gens, sinó de diversos conjunts o bateries geniques amb accions específiques ben definides sobre variants del model particular de desenvolupament embrionari propi del gènere o del grup taxonòmic superior. Les modificacions produïdes en el model ontogenètic comú determinen la formació, entre altres, dels caràcters específics condicionants de l'adequació de l'espècie al seu nínxol ecològic, els quals no tenen per què coincidir amb els utilitzats per la taxonomia clàssica pel diagnòstic de l'espècie. En emprar els caràcters morfològics en taxonomia s'ha d'ésser conscient, per tant, de la complexitat de les accions geniques que els fonamenten i de la seva notable plasticitat davant els efectes ambientals, bastant més accentuada que la dels nivells molecular o cel·lular.

A fi de superar la subjectivitat de prendre certs caràcters morfològics per definir una espècie i com a alternativa oposada al concepte tipològic d'espècie, s'ha desenvolupat la taxonomia numèrica basant-se en la mesura de bastants o fins i tot molts caràcters morfològics, principalment, en mostres nombroses d'individus procedents de poblacions locals. Dins d'aquesta línia, l'aplicació d'anàlisis multivariants és una eina molt eficaç per a examinar quantitativament les relacions interspecífiques. De fet, en la gran majoria de les espècies, particularment dels animals, l'existència de les barreres reproductores definitòries de l'espècie biològica es correlaciona amb discontinuïtats morfològiques detectables amb els mètodes de la taxonomia numèrica, i també quasi sempre pels de la taxonomia clàssica. Tot i així, tampoc no és correcte associar el caràcter o caràcters de major valor discriminatori entre dues espècies, segons els resultats derivats de la taxonomia numèrica, amb els genotips responsables de l'aïllament sexual interspecífic, els quals molt probablement no tenen res a veure amb els esmentats caràcters. Els resultats provinents de la taxonomia numèrica s'han de saber interpretar amb cautela en raó del discutible pes específic assignable a cada caràcter, cercant sobretot de comparar-los amb els procedents dels estudis de camp o de laboratori, ja indicats precedentment, que

reflecteixin amb la màxima exactitud l'espècie biològica. Els mètodes de la taxonomia numèrica no queden circumscrits a l'estudi dels caràcters morfològics; igualment poden aplicar-se a l'anàlisi de la divergència d'àcids nucleics o de proteïnes homòlogues, per elaborar dendrogrames de distàncies i connexions filogenètiques entre organismes emparentats; en aquest darrer sentit les estimacions de divergència són bastant fiables.

L'ESPECIACIÓ: CORRELACIÓ ENTRE ELS DIVERSOS CANVIS

Les alteracions en el patrimoni genètic que comporta el procés d'especiació no són necessàriament profundes com se suposava fins fa pocs anys. La formació de noves espècies no implica una revolució genètica: són suficients unes taxes relativament reduïdes de canvis en el material hereditari per a arribar a l'aïllament reproductor i assolir la categoria d'entitat biològica independent. Les tècniques d'anàlisi electroforètic de proteïnes han permès la quantificació d'aquestes diferències, les quals varien d'unes espècies a altres, com també poden variar en les comparacions entre grups taxonòmics superiors. Per exemple, els valors mitjans de distàncies genètiques interspecífiques, mesura del nombre de substitucions al·lèliques per tots els gens (*loci*) estudiats entre parells d'espècies, són de 0,559 per als mamífers, 0,808 per a les plantes, i 1,066 a les *Drosophila*, però entre les espècies bessones del grup *Drosophila willistoni*, la distància genètica mitjana és sols de 0,581 (AYALA & KIGER, 1981). Fins i tot sembla que es pot aconseguir un aïllament sexual incipient, en el cas de les semispècies, amb una taxa de canvi genètic equivalent als valors de diferències registrats entre poblacions locals o subspècies. La quantitat de substitucions genètiques no és, doncs, el factor crític per a l'isolament reproductor, ans bé, la natura d'aquests gens i la seva influència sobre l'esmentat aïllament sexual.

Les dades acumulades fins ara sobre les diferències entre espècies estretament emparentades demostren, generalment, una manca de correspondències entre els nivells de canvis moleculars, cromosòmics i organísmics, tot i que poden donar-se també bastants excepcions. A continuació exposarem alguns exemples bastant ben

estudiats de diferències interspecífiques, amb les corresponents taxes de canvi, per tractar d'esbrinar el seu significat sobre l'especiació.

a) Dues espècies simpàtriques de *Drosophila* de les illes Hawaii, *D. silvestris* i *D. heteroneura*, es distingeixen fàcilment per la forma del cap i els patrons de colors sobre el cos i les ales. A pesar d'aquestes diferències morfològiques, els models de bandes als cromosomes gegants d'ambdues espècies són homoseqüencials, és a dir, comparteixen idèntiques ordenacions en els cinc parells de cromosomes, encara que *D. silvestris* presenta sis inversions úniques en estat polimòrfic i *D. heteroneura* una sola, compartida amb l'anterior i també polimòrfica. A més, les anàlisis electroforètiques de 25 *loci* enzimàtics a tres poblacions simpàtriques de cadascuna de les dues espècies, indiquen un grau de similitud extraordinari, superior als valors mitjans d'identitat entre poblacions locals de *Drosophila*; les dues espècies són, doncs, indiferenciables electroforèticament i les seves taxes d'heterozigotitat són també equivalents (SENE & CARSON, 1977; CARSON, 1982). Aquesta extraordinària semblança cromosòmica i aloenzímica no és, emperò, representativa d'identitat genètica global, perquè les hibriditzacions entre els ADNs de còpia senzilla han revelat diferències substancials entre les dues espècies de *Drosophila* (HUNT *et al.*, 1981). Basant-se en aquestes diferències es pot així explicar la diversitat morfològica, ecològica i de comportament entre *D. silvestris* i *D. heteroneura*, junt a l'extrema raresa d'híbrids naturals malgrat que poden encreuar-se al laboratori i donar descendència fèrtil dels dos sexes.

b) Els estudis sobre l'evolució biològica de l'home han assolit des de DARWIN (1871) un alt interès i han estat objecte de polèmiques enceses encara no del tot closes actualment. Les diferències organísmiques entre l'home i els seus parents més pròxims, els simis antropoides, tant en l'anatomia i morfologia com, sobretot, en el comportament, són prou evidents i han estat suficientment ben descrites pels antropòlegs, zoòlegs i etòlegs, per abstenir-me de destacar-les. Això no obstant, les considerables diferències organísmiques no mostren correspondència amb les detectades al nivell molecular, perquè en un treball sobre hibridització de les seqüències

úniques dels ADN's de l'home i del ximpanzé s'assenyala un grau d'homologia del 97,6 % (DEININGER & SCHMID, 1976), i les comparances entre proteïnes homòlogues d'ambdues espècies estableixen una mitjana del 99 % d'identitat (KING & WILSON, 1975). També, les estimacions de distància genètica entre l'home i el ximpanzé, basades en proves electroforètiques, són equivalents a les trobades entre espècies congèniques de qualsevol grup d'organismes (KING & WILSON, 1975; BRUCE & AYALA, 1978).

D'altra part, les tècniques del bandeig de cromosomes han fet possible reconèixer acuradament els canvis succeïts en el procés de divergència des dels antecessors comuns a l'home i els altres primats superiors, ximpanzé, gorilla i orangutan. L'home i el ximpanzé difereixen per 10 reordenacions cromosòmiques, sobretot inversions pericèntriques (GROUCHY *et al.*, 1978), però el bandeig d'alta resolució demostra un grau d'homologia entre totes dues espècies, sobre el total d'unes 1.000 bandes reconegudes, equivalent a la descrita en les anàlisis moleculars (YUNIS *et al.*, 1980; YUNIS & PRAKASH, 1982). No és sorprenent que certs bioquímics i citogenetistes proposin de reunir l'home i els simis superiors dins una mateixa família, Hominidae, en contra dels criteris mantinguts pels zoòlegs, paleontòlegs i, en general, de la majoria dels biòlegs interessats en l'evolució. En l'estat actual dels coneixements sobre l'evolució humana, sembla com si el procés d'hominització no hagués afectat a penes les proteïnes estructurals i l'arquitectura dels cromosomes. Queda per provar el possible paper diferencial de les proteïnes reguladores sobre els models respectius de desenvolupament, i les conseqüències dels petits canvis cromosòmics sobre elles, per assolir una comprensió bastant més exacta de l'hominització, almenys pel que fa referència als seus aspectes genètics.

c) En els coleòpters crisomèlids del gènere *Timarcha* hem estudiat, mitjançant la tècnica serològica de la immunodifusió, quatre «morfoespècies», *T. affinis*, *T. monserratisensis*, *T. balearica* i *T. espanoli*, descrites segons criteris taxonòmics clàssics, discutibles, però, respecte a les dues primeres. Sobre un total de set especificitats antigèniques detectades, *T. affinis* i *T. monserratisensis* difereixen entre si per una sola especificitat, en canvi se separaven de *T.*

balearica i de *T. espanoli* per 3-5 especificitats, a la vegada que aquestes darreres es distingien una de l'altra per 3 especificitats (PETITPIERRE *et al.*, 1979). L'anàlisi cariomètrica dels complements cromosòmics de *T. affinis* i *T. monserratisensis*, totes dues amb $2n=20$ cromosomes, no donà diferències clares per cap dels elements; mentre que *T. balearica* ($2n=22$) i *T. espanoli* ($2n=26$) mostraren cariotips ben definits, perfectament separables dels precedents (PETITPIERRE, 1970). Per últim, l'aplicació d'un mètode d'anàlisi multivariant sobre vuit caràcters d'adults, en 38 poblacions de 24 «morfoespècies», incloses les quatre anteriors, corroborà en una gran part les conclusions dels estudis previs (PETITPIERRE & CUADRAS, 1977). A la llum d'aquesta recerca multidisciplinària, el status taxonòmic de *T. affinis* i de *T. monserratisensis*, podria interpretar-se com de subespècies amb uns certs interrogants derivats de la manca de dades sobre la probable hibridació en el laboratori, donada l'absència d'hibrids naturals puix són formes allopàtiques.

d) A les espècies d'origen recent, anomenades per alguns autors «neospècies», es poden discernir les causes més immediates de la seva diferenciació perquè els canvis són sovint molt petits i afecten només uns certs nivells d'organització. Es coneixen ja alguns exemples de neospècies amb un grau d'identitat genètica pels aloenzims equivalent al trobat entre poblacions locals d'una mateixa espècie, i amb raó es poden descriure aquestes neospècies com a homoalozimiques (CARSON, 1976).

Dues espècies de plantes, *Clarkia biloba* i *C. lingulata* (Onagraceae), són simpàtriques en una localitat californiana de la Sierra Nevada central, on la segona és endèmica. Les diferències morfològiques són evidents en les flors, i també l'anàlisi cromosòmica de les dues espècies i dels seus híbrids demostra una divergència per tres reordenacions cromosòmiques com a mínim. Contràriament, la distància genètica basada en els aloenzims és petita. Les reordenacions cromosòmiques ocorregudes en una població perifèrica semiaïllada de *C. biloba* varen ser causa de l'origen de *C. lingulata*, i es va produir un canvi en el tipus de reproducció, des de la polinització encreuada de la primera cap a l'autopolinització de la segona, gràcies a la qual cosa s'aconseguí de crear una barrera repro-

ductora eficaç entre totes dues (WHITE, 1978; DOBZHANSKY *et al.*, 1980).

Un altre exemple paregut és el dels rosegadors americans del gènere *Thomomys*, on s'han descrit nou espècies segons mètodes de la sistemàtica clàssica. Les diferències cromosòmiques entre elles són molt notables, $2n=40-82$; fins i tot dins d'una mateixa «espècie», *T. talpoides*, hi ha almenys vint formes cromosòmiques distintes ($2n=40-60$), distribuïdes per les muntanyes de l'oest nord-americà, algunes de les quals semblen haver arribat al status d'espècies bessones, a pesar de les escasses diferències aloenzimàtiques que manifesten (NEVO *et al.*, 1974; NEVO, 1982). També a *Thomomys*, a l'igual que a *Clarkia* i en general als organismes amb baixa capacitat de dispersió, les reordenacions cromosòmiques han estat probablement el factor crític primari en el procés de formació de les noves espècies.

TAXONOMIA I EVOLUCIÓ DELS GRUPS TAXONÒMICS SUPERIORS

L'evolució de la vida sobre la Terra s'ha realitzat en una llarguíssima sèrie d'interaccions entre els organismes i els seu medi natural, amb uns resultats absolutament irrepetibles en raó de la complexitat dels canvis en la direcció i intensitat de la selecció, i en les fluctuacions de les dimensions poblacionals, com a factors evolutius de la màxima importància. Les oportunitats per al desenvolupament de la vida en les primeres etapes de la història dels éssers vivents a la Terra eren, sens dubte, radicalment diferents a les actuals. Les formes arquetípiques de molts dels grans grups filètics varen aparèixer en els estadis geològics inicials, en el Precàmbric i el Càmbric, fa uns 600 milions d'anys, quan tots els possibles medis aprofitables per a la vida eren completament buits d'organismes amb l'excepció de bacteris. El grau progressiu d'especialització en l'aprofitament de la biosfera es pot correlacionar amb una complexitat taxonòmica creixent dins cada classe o grup taxonòmic superior d'organismes, fins a arribar a un període «clímax» de màxima diversitat específica, a partir del qual es pot mantenir una certa estabilitat o seguir un camí a la inversa fins a arribar en el cas límit a l'extinció de tot el grup. Quan esdevé aquesta darrera alternativa, un altre grup, amb al-

gunes característiques de major eficàcia que l'anterior, comença un cicle equivalent, produint-se freqüents fenòmens de convergència entre organismes d'ambdós grups. Els 3.500 milions d'anys de vida terrestre han fornint un lapse de temps prou llarg per colonitzar tots els grans hàbitats del nostre entorn, per això es pot assegurar amb certesa que ara ja no es donen les condicions adequades per originar nous models d'organització, nous grups taxonòmics superiors, probablement per damunt del nivell de la família, o potser fins i tot per damunt del gènere.

La classificació de les categories superiors dels sers vius, des del gènere fins al filum, s'ha de basar en criteris filogenètics, en relacions de descendència, per ajustar-se en el límit als autèntics lligams reals de parentiu. Els diversos tàxons en els quals es pot desglossar cada grup major d'organismes suposen successives relacions de subordinació d'uns als altres, des de les característiques més generals dels tàxons superiors a les més restringides dels inferiors, en successives radiacions adaptatives de colonitzacions cada vegada més acurades de la biosfera terrestre. El reconeixement dels principals criteris per caracteritzar els grans grups d'organismes és feina dels especialistes en Anatomia o Fisiologia comparades, zoòlegs o botànics, però no, per exemple, de biòlegs dedicats a la Genètica o a la Bioquímica. Un mètode aproximatiu adient per assolir una classificació filogenètica és el cladisme, segons el qual els organismes s'ordenen i estructuren d'acord amb el punt més recent del seu procés de divergència (HENNIG, 1966). En aquest sentit, els mètodes usuals a la Genètica moderna tenen bastant a dir per arribar a un detall molt més exacte de les relacions filogenètiques entre les categories taxonòmiques immediates a l'espècie, com són els gèneres, tribus, subfamílies i famílies.

L'estudi comparatiu de la composició en aminoàcids de proteïnes homòlogues amb una perspectiva evolucionista, es va iniciar per ZUCKERKANDL & PAULING (1965) en un treball pioner dedicat a les globines de diverses espècies de mamífers. Com més gran era el parentiu entre dues espècies major era la semblança en l'estructura primària de les proteïnes homòlogues. Les taxes de substitució d'aminoàcids durant l'evolució d'unes proteïnes homòlogues poden variar considerablement segons cada

classe, però en tots els casos es pot demostrar un canvi regular i uniforme en el transcurs de l'evolució. L'acumulació gradual i contínua d'aquestes mutacions causa de les substitucions d'aminoàcids, ha fet pensar a diversos científics en l'existència d'un «rellotge molecular», capaç de registrar amb summa precisió, no tan sols el grau de divergència interspecífica, sinó també el moment de la separació de tàxons estretament emparentats com les espècies o gèneres de qualsevol grup d'organismes. Les estimacions de velocitats d'evolució molecular han de fonamentar-se en dades paleontològiques; són, doncs, factibles únicament en aquells grups amb un bon registre fòssil.

Per explicar la considerable extensió dels polimorfismes enzimàtics en quasi tots els organismes analitzats, s'ha suggerit que eren només dependents de la mutació i de la fixació aleatòria de cada variant per efecte de la deriva genètica en poblacions poc nombroses, sense cap influència de la selecció natural perquè totes aquestes variants serien selectivament neutres o quasi neutres (KIMURA, 1968; KING & JUKES, 1969). Aquesta pretesa evolució «no-darwiniana» ha estat durament criticada per bastants autors, i almenys pel que fa referència a certs enzims s'han provat inqüestionablement diferències de valor selectiu entre les distintes formes al·lèliques. No obstant això, la teoria del rellotge molecular s'accepta generalment, però contrastada amb les dades provinents d'altres camps de la Biologia evolutiva. Alguns tipus de proteïnes relativament ben estudiades, com els citocroms c, han permès de construir arbres filogenètics basats en les distàncies mutacionals com a mitjanes de les sumes de totes les mutacions en les línies de descendència des de l'avantpassat comú (FITCH & MARGOLIASH, 1967). Convé, emperò, examinar diverses classes de proteïnes per estimar distàncies moleculars de forma conjunta i, si és possible, computaritzada (DAYHOFF, 1969).

A part de les proteïnes, també s'han elaborat relacions filogenètiques respecte a les homologies entre àcids nucleics d'igual funció, com els ARNs ribosòmics o els ADNs mitocondrials. En un futur immediat, cal suposar un fort increment d'aquest mètode d'anàlisi directa de l'evolució molecular, per l'extensió dels experiments de l'enginyeria genètica utilitzant la clonació d'ADNs homòlegs, i l'ús gene-

ral de les tècniques recents de seqüenciació dels àcids nucleics.

Fins fa pocs anys, l'origen dels tàxons superiors s'atribuïa als mateixos processos de divergència comuns a la formació de les noves espècies; no es distingia qualitativament la manera com apareixia, per exemple, una espècie o una família, sols variava la quantitat de mutacions acumulades gradualment i uniformement en un cas o en l'altre. Aquesta perspectiva gradualista de l'evolució ha estat contestada els darrers anys per alguns paleontòlegs, promotors de les teories puntualistes o, més pròpiament, dels equilibris interromputs. Per ells el mode més freqüent d'evolució seria el d'intercalar-se llargs períodes sense a penes canvis morfològics, períodes d'estasi, amb altres períodes curts, de canvis morfològics molt pronunciats i ràpids, durant els quals es produïen modificacions genètiques dràstiques en els sistemes reguladors, i d'aquí el sorgiment dels tàxons superiors (ELDRIDGE & GOULD, 1972). Els evolucionistes dins la més pura ortodoxia neodarwinista de la teoria sintètica, tot i acceptant ja una separació entre macro i microevolució per entendre com es formen respectivament els grans grups taxonòmics i les espècies, discrepen, però, en les suposades causes de la macroevolució, i neguen també la hipòtesi dels equilibris interromputs. Aquests poden interpretar-se d'una manera més correcta, segons ells, per simples canvis en les velocitats d'evolució dintre cada línia filètica (STEBBINS & AYALA, 1981; WRIGHT, 1982). La polèmica sobre l'origen dels tàxons superiors no és en absolut closa, en particular resta encara per provar el paper de les reordenacions del genoma com a sistema generador de canvis en els patrons de regulació morfogènica. Malgrat l'actual renaixença dels estudis sobre sistemàtica i evolució, no és de preveure una resposta conclusiva a curt termini sobre aquest dilema; tanmateix, el seu plantejament serveix i servirà d'esperó per a estimular noves recerques. Citant MAYR (1969), «és tan legítim l'estudi d'allò que tenen en comú tots els organismes (molt d'això és la física i química dels organismes), com l'estudi de les característiques úniques de tàxons de tots els nivells fins a l'espècie». Amb aquesta idea s'han de formar les noves generacions de taxònoms, defugint tot complex d'inferioritat davant d'altres especialistes.

BIBLIOGRAFIA

- AYALA, F. J. 1975. Genetic differentiation during the speciation process. In: *Evolutionary Biology*, 8 (Eds. Th. Dobzhansky, M. K. Hecht & W. C. Steere): 1-75.
- AYALA, F. J. & KIGER, J. A. jr. 1981. *Moderns Genetics*. Benjamin & Cummings. Menlo Park, California.
- BRUCE, E. J. & AYALA, F. J. 1978. Humans and apes are genetically very similar. *Nature*, 276: 264-265.
- BUSH, G. L. 1975. Modes of animal speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 6: 339-364.
- BUSH, G. L. 1981. Stasipatric speciation and rapid evolution in animals. In: *Evolution and Speciation. Essays in honor of M. J. D. White* (Eds. W. R. Atchley & D. Woodruff): 201-218. Cambridge Univ. Press.
- CARSON, H. L. 1976. Genetic differences between newly formed species. *BioSciences*, 26: 700-701.
- CARSON, H. L. 1982. Evolution of *Drosophila* on the newer Hawaiian volcanoes. *Heredity*, 48: 3-25.
- DARWIN, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favored races in the struggle for life*. Murray. London.
- DARWIN, C. 1871. *The descent of man*. Murray. London.
- DAYHOFF, M. O. 1969. Computer analysis of protein evolution. *Sci Amer.*, 221: 86-95.
- DEININGER, P. L. & SCHMID, C. W. 1976. Thermal stability of human DNA and chimpanzee DNA heteroduplexes. *Science*, 194: 846-848.
- DOBZHANSKY, Th., AYALA, F. J., STEBBINS, G. L. & VALENTINE, J. W. 1980. *Evolución*. Omega. Barcelona.
- ELDRIDGE, N. & GOULD, S. J. 1972. Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. In: *Models in Paleobiology* (Ed. T. J. M. Schopf): 82-115. Freeman. San Francisco.
- FITCH, W. M. & MARGOLIASH, E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science*, 155: 279-284.
- GRANT, V. 1971. *Plant speciation*. Columbia Univ. Press. New York.
- GROUCHY, J. de, TURLEAU, C. & FINAZ, C. 1978. Chromosomal phylogeny of the Primates. *Ann. Rev. Genet.*, 12: 289-328.
- HENNIG, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. Univ. Illinois Press.
- HINEGARDNER, R. 1976. Evolution of genome size. In: *Molecular Evolution* (Ed. F. J. Ayala): 179-199. Sinauer. Sunderland, Massachusetts.
- HOYER, B. H., MCCARTHY, B. J. & BOLTON, E. T. 1964. A molecular approach in the systematics of higher organisms. *Science*, 144: 959-967.
- HUBBY, J. L. & LEWONTIN, R. C. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 577-594.
- HUNT, J. A., HALL, T. J. & BRITTEN, R. J. 1981. Evolutionary distances in Hawaiian *Drosophila* measured by DNA reassociation. *J. Molec. Evol.*, 17: 361-367.
- KING, M. C. & WILSON, A. C. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzee. *Science*, 188: 107-115.
- LAMARCK, J. B. 1809. *Philosophie zoologique, ou exposition des considérations relatives à l'histoire naturelle des animaux*. Paris.
- MAXAM, A. M. & GILBERT, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560-564.
- MAYR, E. 1969. *Principles of Systematic Zoology*. McGraw-Hill. New York.
- MENDEL, G. 1865. Versuche über pflanzen-hybriden. *Verh. Natur. Vereins Brünn*, 4: 3-57.
- NEI, M. 1972. Genetic 1972. Genetic distances between populations. *Amer. Nat.*, 106: 283-292.
- NEVO, E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.*, 13: 121-177.
- NEVO, E. 1982. Speciation in subterranean mammals. In: *Mechanisms of speciation* (Ed. C. Barigozzi): 191-218. Alan R. Liss. New York.
- NEVO, E., KIM, Y. J., SHAW, C. & THAELE, C. S. jr. 1974. Genetic variation, selection and speciation in *Thomomys talpoides* pocket gophers. *Evolution*, 28: 1-23.
- PETITPIERRE, E. 1970. Cytotaxonomy and evolution of *Timarcha* Latr. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genét. Ibér.*, 22: 67-120.
- PETITPIERRE, E. & CUADRAS, C. M. 1977. The canonical analysis applied to the taxonomy and evolution of the genus *Timarcha* Latr. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Mediterranea*, 2: 13-28.
- PETITPIERRE, E., TILLÓ, T. & STONE, W. H. 1979. A serotaxonomic study of four taxa in the beetle genus *Timarcha* Latr. (Chrysomelidae) using immunodiffusion absorption in gels. *Genét. Ibér.*, 30-31: 49-69.
- SENE, F. M. & CARSON, H. L. 1977. Genetic variation in Hawaiian *Drosophila* IV. Allozymic similarity between *D. sylvestris* and *D. heteroneura* from the island of Hawaii. *Genetics*, 86: 187-198.
- WHITE, M. J. D. 1978. *Modes of speciation*. Freeman. San Francisco.
- WRIGHT, S. 1982. Character change, speciation, and the higher taxa. *Evolution*, 36: 427-443.
- YUNIS, J. J., SAWYER, J. R. & DUNHAM, K. 1980. The striking resemblance of high-resolution G-banded chromosomes of man and chimpanzee. *Science*, 208: 1145-1148.
- YUNIS, J. J. & PRAKASH, O. 1982. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science*, 215: 1525-1530.
- ZUCKERKANDL, E. & PAULING, L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving genes and proteins* (V. Bryson & H. J. Vogel, eds.). Academic Press. New York: 97-166.