Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
127° (2009), Vol. XXXIII, P. II, t. I, pp. 7-26

VALERIO SBORDONI *

Il problema della specie in biologia: da Darwin e Wallace al DNA barcode **

Introduzione

Ho accolto con viva gratitudine l'invito del Presidente dell'Accademia dei XL a presentare la prolusione inaugurale dell'anno accademico 2010. Ho accettato comunque nella consapevolezza di affrontare un problema, come quello della specie in biologia, di grande rilevanza storica e complessità metodologica e in cui le possibilità di proporre idee e soluzioni innovative sono davvero assai ridotte.

Non a caso, già agli albori della Sintesi Moderna, Theodosius Dobzhansky (1935) rilevava le difficoltà legate alla definizione di specie: «*The species concept is one of the oldest and most fundamental in biology. And yet it is almost universally conceded that no satisfactory definition of what constitutes a species has ever been proposed*».

Cercherò di esporre sinteticamente il mio pensiero, maturato nel corso di molti decenni dedicati allo studio della sistematica e dell'evoluzione, dove il problema di classificare le specie mi ha spesso stimolato ad affrontare sfide concettuali e metodologiche, tutte sostenute dal privilegio di essermi potuto dedicare con continuità allo studio di una grande varietà di organismi, in massima parte animali, in natura ed in laboratorio.

Nel sistema di classificazione biologica introdotto da Linneo la specie rappresenta la categoria basale, quella universalmente definita attraverso un binomio, come *Homo sapiens*, *Quercus pubescens* o *Escherichia coli*. Il binomio sta ad indicare il rango della specie come categoria subordinata a quella del genere. Ma, a dif-

* Socio XL. Dipartimento di Biologia, Università di Roma «Tor Vergata».
E-mail: sbordoni@bio-uniroma2.it

** Prolusione tenuta durante l'inaugurazione del 227° anno accademico, Roma 22 maggio 2009 presso la Biblioteca dell'Accademia.

ferenza di tutte le altre categorie, dal genere in su nella scala gerarchica della classificazione, alle quali si attribuisce valore puramente convenzionale, alla specie vengono riconosciuti meriti speciali. Le specie sono infatti considerate unità fondamentali in molti settori della biologia, dall'anatomia alla biologia dello sviluppo, alla paleontologia, all'ecologia, al comportamento, alla genetica, all'evoluzione biologica. Nella Sintesi Moderna, e nei successivi sviluppi, le specie sono gruppi di individui o popolazioni che condividono un comune pool genico, ma rappresentano anche le unità terminali di un albero filogenetico.

L'enfasi su l'una o l'altra di queste proprietà ha stimolato il proliferare di definizioni alternative di specie: Mayden (1997) ne riconosce almeno 24. Eppure definire in maniera univoca la specie è diventata una necessità non solo nella sistematica biologica ma anche in tutti quegli ambiti dell'attività umana in cui sono richiesti criteri certi per la diagnosi e classificazione degli organismi. Tra questi risaltano settori come la biomedicina e la parassitologia medica, il mercato alimentare, la biologia applicata alla tutela delle specie, la biologia forense, e tutte le normative nazionali e internazionali relative a questi ambiti.

In ecologia, la lista delle specie di una particolare comunità biotica è in grado di offrire una significativa rappresentazione dello stato di un ecosistema, esprimendo in sintesi un ampio spettro di fenomeni quali l'indicazione dello stadio seriale della successione ecologica, oppure l'occorrenza di cambiamenti a breve termine dovuti all'alterazione dell'habitat prodotta dall'uomo o da altri fattori. Il concetto di conservazione ha molto a che fare con le specie, a partire dal numero di specie descritte che già dispongono di un nome (circa 1.5 milioni di animali e 400.000 piante). Questa cifra è certamente sottostimata ed è destinata ad aumentare ad almeno 5-10 milioni di specie viventi nella biosfera: altre proiezioni estendono il numero di specie fino a trenta milioni. Questi enormi numeri e la variegata comunità di utenti delle informazioni tassonomiche sottolineano la necessità di un sistema stabile di classificazione e di criteri certi per definire le specie.

La necessità di disporre di classificazioni condivise è oggi ancora più pressante per dare valore ed efficacia all'enorme quantità di informazioni accessibili sul web, dove monografie, checklist e cataloghi di specie, banche di dati sulla biodiversità alle varie scale, da quella locale a quella globale, si moltiplicano ad un tasso crescente. Tra le numerose banche dati sulla diversità biologica a livello tassonomico, genetico ed ecologico, e analoghe iniziative a carattere globale si ricordano: Global Biodiversity Information Facility (GBIF), Encyclopedia of life, Tree of Life, Life Watch, EDIT, Species 2000, GenBank (NCBI), Barcode of Life Consortium (CBOL); in tutte si evidenzia in maniera eclatante il problema della difformità delle classificazioni biologiche.

Sono sufficienti pochi esempi per illustrare la portata applicativa della tassonomia nell'ambito di una classificazione biologica stabile e condivisa.

Un primo esempio, molto significativo, è rappresentato dalla malaria umana, che è provocata da quattro delle oltre 260 specie conosciute nel genere *Plasmo-*

dium. Ricercatori del World Health Organization hanno stimato l'esistenza di 300-500 milioni di casi di malaria l'anno, con tassi di mortalità fino a tre milioni l'anno in Africa (Volkman *et al*., 2001), dove l'agente più virulento è il *Plasmodium falciparum*. Le decisioni sul trattamento della malaria dipendono da una corretta identificazione della specie di *Plasmodium.* In molti casi è sufficiente l'analisi microscopica, ma a bassi livelli di parassitemia (<20 parassiti/µl) l'identificazione è diventata possibile solo di recente, tramite l'amplificazione quantitativa di sequenze del gene 18S rRNA (real-time QT-NASBA; Mens *et al*., 2006). Oltre al Plasmodio è però necessario diagnosticare i vettori, rappresentati da alcune decine di specie di zanzare del genere *Anopheles*, una minoranza rispetto alle 484 specie descritte nel genere. Non è facile diagnosticare le specie, in particolare nel gruppo di *Anopheles gambiae*, dove sono state identificate, dapprima attraverso cromosomi politenici e successivamente attraverso sequenze di DNA, ben sette specie criptiche, cioè non distinguibili morfologicamente (Coluzzi *et al*., 1979; 2002). Le diverse specie differiscono notevolmente nella loro ecologia e comportamento e, in particolare, nella capacità vettrice del Plasmodio.

L'importanza di una tassonomia stabile e condivisa è particolarmente evidente nell'ambito della conservazione biologica e delle relative normative. Nella comune pratica sistematica è piuttosto frequente il caso in cui una determinata specie viene suddivisa in base a nuovi caratteri diagnostici. Questi cambiamenti, però, possono provocare indesiderati effetti sull'efficacia delle leggi e normative dirette alla tutela della flora e della fauna, sia nei loro habitat originari, sia attraverso regolamenti che ne limitano il commercio (convenzione CITES sul commercio internazionale delle specie selvatiche minacciate di estinzione). Tra i numerosi esempi segnalo quello della Salamandrina dagli occhiali, un piccolo anfibio endemico italiano protetto in base all'Allegato 2 della Direttiva «Habitat»dell'Unione Europea. Grazie all'analisi di sequenze di DNA mitocondriale, quella che era considerata una singola specie è oggi riconosciuta essere costituita da due specie distinte, *Salamandrina terdigitata* e *Salamandrina perspicillata*, distribuite allopatricamente nell'Italia peninsulare (Mattoccia *et al*., 2005). La prima specie, diffusa a sud del fiume Volturno, ha mantenuto il suo nome e di conseguenza il suo status di specie protetta, ma la seconda, diffusa più a nord fino alla Liguria, ha perso tale privilegio avendo cambiato nome. Questo tipo di problema si ripropone spesso nelle tematiche relative alla conservazione della biodiversità.

Appare dunque necessario definire regole precise, operative per la delimitazione delle specie, ma questa necessità si scontra con la natura intrinseca delle specie stesse, e con i diversi concetti che, apparentemente, sottendono all'idea di specie.

Esistono le specie in natura?

Ma l'idea di specie corrisponde a qualcosa di esistente in natura, o è l'espressione di una nostra esigenza di interpretare la realtà sistematizzandola in categorie?

Una scuola di pensiero, il nominalismo, nega l'oggettività delle specie. In alter-

nativa alla visione essenzialista della specie linneana alcuni tassonomi, prevalentemente di cultura francese, adottarono una visione della specie coerente con la filosofia di Occam (sec. XIV). La principale caratteristica di questa linea di pensiero consiste nella negazione di «tipi» universali.

Per i nominalisti esistono soltanto gli individui; la specie, in quanto categoria-tipo, diventa un «nome» e, ritenuta vuota di ogni realtà fisica, si configura come pura astrazione intellettuale. Tra i più illustri interpreti del pensiero nominalista va annoverato Charles Darwin che in uno dei vari passi sulla specie del suo libro più celebre afferma: «*From this remarks it will be seen that I look at the term species as one arbitrarily given, for the sake of convenience, to a set of individuals closely resembling each other, and that it does not essentially differ from the term variety, which is given to less distinct and more fluctuating forms. The term variety, again, in comparison with mere individual differences, is also applied arbitrarily, for convenience' sake*». (Darwin, 1859). La posizione di Darwin era verosimilmente influenzata dall'esigenza di sottrarsi alla logica tipologica per sostenere il ruolo del cambiamento evolutivo come il fondamentale processo alla base dei viventi. Col tempo anche questa concezione, al pari di quella tipologica, si dimostrò inadeguata, sul piano speculativo e su quello operativo, a cogliere la realtà biologica della specie. Il pensiero nominalista non è mai stato completamente abbandonato, e ancora oggi si registrano proposizioni di una visione nominalista della specie pensata come un continuum, non categorizzabile, tra varietà, razze ecologiche e specie (Mallet, 2008).

La maggior parte dei biologi e dei naturalisti tende ad attribuire valore oggettivo alla specie. In una visione adimensionale, quella del naturalista locale che osserva l'ambiente che lo circonda attraverso una definita finestra spazio-temporale, le specie esistono in quanto sono individuate dagli stessi organismi. Che senso avrebbero altrimenti i rituali, a volte particolarmente elaborati, di corteggiamento se non quello di comunicare segnali specie-specifici ai propri potenziali partner? Il carattere oggettivo delle specie emerge anche dal confronto di tassonomie sviluppate, in totale indipendenza, da culture diverse. Particolarmente eloquente è l'esempio riportato da Mayr sulla popolazione Papua dei Monti Arfak (Irian Jaya, Nuova Guinea). Secondo Mayr (1963) la lingua indigena disponeva di centotrentasei nomi diversi per le centotrentasette specie di uccelli presenti nella zona confondendo due sole specie di essi. Gli ornitologi ne individuano infatti centotrentasette, ma una coppia di specie è considerata sibling e quindi difficilmente discriminabile in base ai caratteri morfologici!

A favore del carattere oggettivo delle specie va considerato lo stretto rapporto con la nicchia ecologica, tale da consentire, in qualche caso, di pronosticare l'esistenza di una determinata specie. Un'Orchidea del Madagascar: *Angraecum sesquipedale* è caratterizzata da un nettario particolarmente profondo, lungo 25-30 cm. Darwin (1862) ipotizzò che, come le altre specie congeneri, questa orchidea dipendesse per la sua riproduzione da una farfalla pronuba dotata di una spiritromba eccezionalmente lunga. Pochi anni dopo Wallace (1867), incuriosito da questa predizione, produsse un disegno di una falena della famiglia Sphingidae (Fig. 1) che si

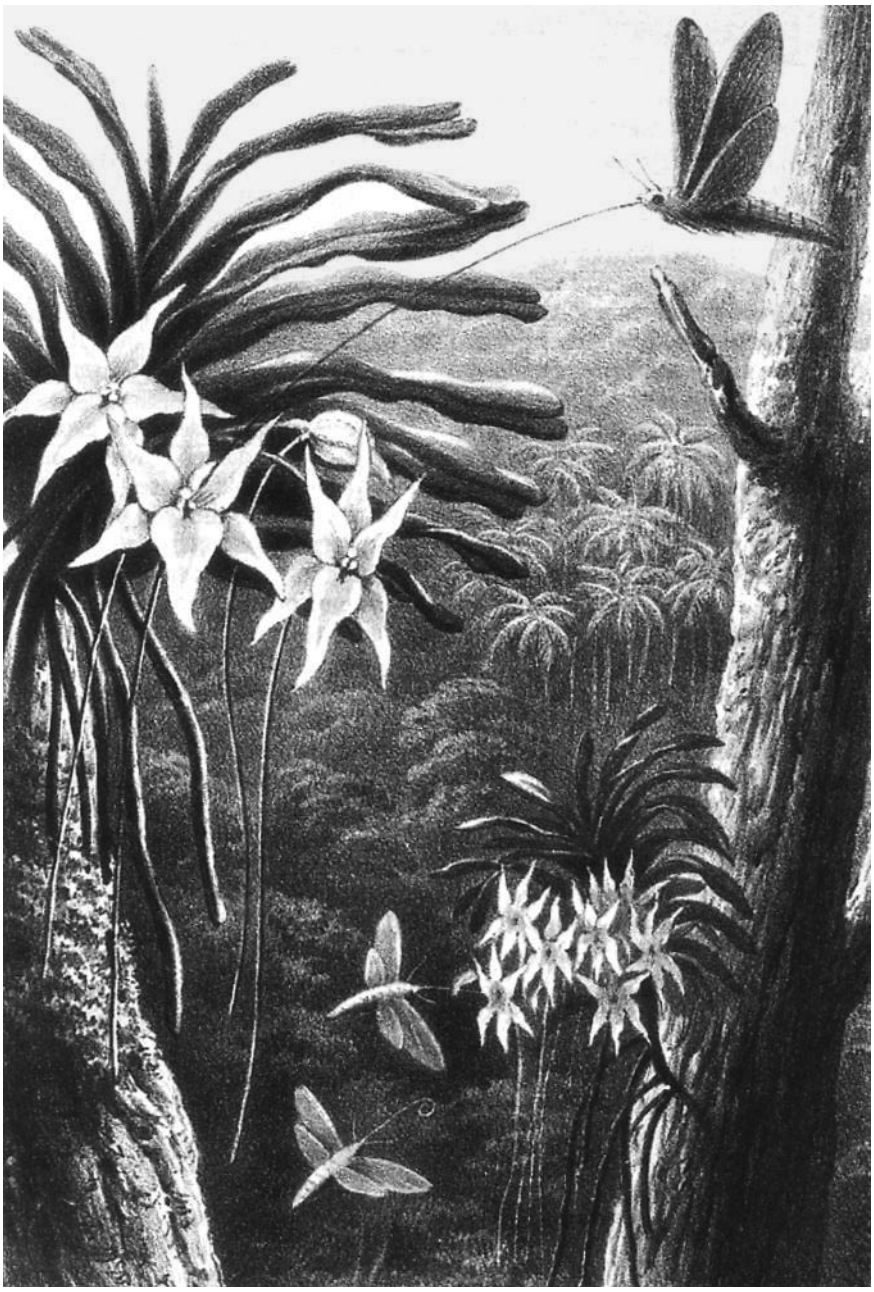

Fig. 1. L'esistenza di una specie può talvolta essere pronosticata. Il disegno che riproduce l'orchidea del Madagascar: *Angraecum sesquipedale* Thouars e il suo pronubo, una farfalla della famiglia Sphingidae, immaginato da Darwin e riprodotto da Wallace (1867). La farfalla fu scoperta e descritta successivamente come *Xanthopan morgani praedicta* Rothschild & Jordan.

rivelò straordinariamente simile a quella che fu effettivamente descritta, circa quarant'anni dopo, da Rothschild & Jordan (1903). Non a caso la farfalla fu nominata dai suoi descrittori: *Xanthopan morgani praedicta*.

Quanti concetti di specie?

Secondo il pensiero di Ernst Mayr, espresso in una lunga serie di suoi scritti, la maggior parte delle numerose definizioni di specie che sono state proposte ricadono essenzialmente in tre distinte concezioni: quella nominalistica, che abbiamo già esaminato, quella tipologica, e quella biologica.

Successivamente sono state proposte varie altre definizioni che non necessariamente ricadono nelle tre categorie di Mayr. Alcune di queste rivestono un valore storico e filosofico, altre contengono criteri operativi per la delimitazione delle specie. Il più accreditato è il concetto biologico di specie, e a questo fanno di norma riferimento i biologi moderni ma, come vedremo, anche la specie biologica presenta limitazioni e interpretazioni conflittuali.

Sul criterio tipologico si fonda la sistematica Linneana. I caratteri utilizzati sono tradizionalmente quelli morfologici. Su questa base il sistematico stabilisce quello che viene indicato come tipo, cioè un individuo tipico con funzione di modello della specie. Con il tipo sono di volta in volta confrontati i vari individui che è necessario identificare tassonomicamente. Se gli esemplari in esame presentano le stesse caratteristiche morfologiche del tipo conosciuto essi vengono automaticamente ascritti a quella specie (di norma il tipo, detto anche *holotypus*, di ogni specie descritta viene custodito nelle collezioni dei principali musei naturalistici). Se, invece, gli esemplari manifestano variazioni troppo grandi rispetto a tutti i tipi conosciuti, allora proprio la diversa espressione dei caratteri morfologici, viene ritenuta elemento necessario e sufficiente per procedere alla descrizione di una nuova specie. Questo metodo comparativo si prestava (e si presta anche oggi), alla catalogazione degli organismi intrapresa da Linneo; inoltre consente, in prima approssimazione, di valutare i rapporti di parentela tra i vari organismi, soppesando somiglianze e differenze. È evidente che molte variazioni morfologiche inter-individuali legate all'età, alla stagione, al dimorfismo sessuale, ai polimorfismi a base genetica, o al semplice polifenismo guidato dalla norma di reazione non potrebbero, in linea di principio, essere interpretate in un'ottica tipologica. La soluzione di queste problematiche è quindi affidata alla capacità e all'esperienza del tassonomo.

Oggi, l'utilizzo sempre più frequente di sequenze nucleotidiche per discriminare le specie può, per analogia, essere visto in chiave tipologica. La nozione di «tipo» può infatti essere associata ad un individuo opportunamente identificato e reso fruibile alla comunità scientifica (voucher) dai cui tessuti è stato estratto e sottoposto a sequenziamento il frammento di DNA diagnostico, a sua volta tracciabile e depositato presso la GenBank, o altre banche dati di sequenze nucleotidiche. La filosofia della tassonomia molecolare basata sul DNA barcode si sta infatti velocemente affermando presso un numero sempre più elevato di biologi e sistematici.

Il concetto biologico di specie (CBS) si è andato affermando nel secondo trentennio dello scorso secolo, grazie allo sviluppo della genetica delle popolazioni e al contributo interdisciplinare di numerosi ricercatori. Il CBS ha rappresentato uno dei capisaldi della Teoria Sintetica dell'Evoluzione. Tra i protagonisti che contribuirono a questo rinnovamento ricordiamo T. Dobzhansky, B. Rensch, J. Huxley, G.G. Simpson e, soprattutto, E. Mayr. Il CBS si basa sul principio dell'interfecondità e ancora oggi costituisce il riferimento comune per sistematici, genetisti, paleontologi e biologi evoluzionisti. Esso si concentra su un importante attributo biologico, il potenziale di scambio genico tra individui e popolazioni, caratteristica che è sottolineata sia nelle definizioni che privilegiano l'isolamento (Mayr, 1942, 1963, Bock, 1986), sia in quelle che sottolineano l'esistenza di un comune pool genico (Dobzhansky, 1950) o di un comune sistema di fecondazione (Paterson, 1978, 1985).

Tuttavia, le varie definizioni derivanti dal CBS possono essere applicate chiaramente e obiettivamente soltanto a gruppi di organismi a riproduzione sessuata anfigonica che vivono in simpatria. Come già ampiamente riconosciuto, queste definizioni non riescono a garantire un sufficiente criterio metodologico per riconoscere e discriminare taxa a livello di specie su una gamma geografica di popolazioni allopatriche, e su un periodo di tempo evolutivamente significativo. In altre parole il CBS è strettamente non dimensionale e vale per caratterizzare la specie come categoria; la sua applicazione pratica nel riconoscimento di taxa come vere e proprie unità specifiche in natura è limitata al caso molto particolare della simpatria e sincronia delle popolazioni in esame.

L'esistenza di diverse strategie riproduttive, differenti strutture genetiche e geografiche, e soprattutto la diversità dei meccanismi di speciazione, indicano che la stragrande maggioranza delle situazioni naturali non rientrano in questo concetto. Inoltre la presenza in varie aree geografiche di «zone ibride», ove si verificano diffusi episodi di ibridazione e introgressione tra popolazioni contigue, può talvolta rappresentare un problema interpretativo, anche se, paradossalmente, sono spesso proprio le zone ibride a fornire gli elementi necessari alla delimitazione delle specie (Remington, 1985; Harrison, 1990; Hewitt, 2001).

Il concetto filogenetico di specie (CFS), concentra l'attenzione sulla storia geografica e genealogica delle popolazioni. Le radici di questa idea possono essere rintracciate nel concetto evoluzionistico di specie, proposto da Simpson (1961) e Wiley (1978), che osservano come le linee di popolazioni ancestrali e discendenti mantengano la propria identità e il proprio destino storico. Sono stati sviluppati due CFS principali, entrambi riguardanti caratteri e filogenesi. Cracraft (1983) ha definito la specie come «il più piccolo gruppo diagnosticabile di organismi individuali all'interno del quale esiste un pattern parentale di ascendenza e discendenza», che possiedono, cioè, almeno un carattere diagnostico con base genetica. Un CFS alternativo (Donoghue, 1985; de Queiroz and Donoghue, 1988) ha dato invece risalto al criterio della monofilia, sottolineando che una specie è il più piccolo gruppo esclusivo composto da tutti i discendenti di un particolare antenato.

Anche in questo caso, sono state fatte molte obiezioni (vedi Baum, 1992). L'approccio di Cracraft può essere semplice in pratica, ma il numero di taxa riconosciuti a livello di specie può aumentare senza una ragione valida e il riconoscimento dell'affinità genealogica (monofilia) può essere distorto. Il secondo approccio non è applicabile in pratica alle popolazioni interfeconde, perché il riconoscimento della monofilia dovrebbe utilizzare l'esistenza di sinapomorfie, e laddove siano presenti polimorfismi espressi in modo diverso nelle differenti linee evolutive, a bassi livelli tassonomici, subentrano difficoltà. In particolare, l'esistenza di relazioni complesse tra popolazioni naturali, come la speciazione per ibridazione ed altri processi che producono genealogie reticolate, dischiudono ampie aree di conflitto con la teoria. Inoltre, da un punto di vista pratico, l'adozione di un CFS soffocherebbe la classificazione in favore del sistema filogenetico, con serie implicazioni per la nomenclatura e la struttura binomiale linneana dei nomi delle specie. In sintesi, il dibattito sulla specie filogenetica ha certamente fornito nuovi spunti e focalizzato l'attenzione sui processi genealogici in sistematica, ma non può rappresentare una soluzione al problema della specie, soprattutto rispetto alla classificazione. Come saggiamente osservato da Minelli (1991), la classificazione non dovrebbe essere accantonata in favore della sistematizzazione. La loro coesistenza è assolutamente auspicabile, ma un sistema stabile fondato sulla ricostruzione filogenetica non è realizzabile, a causa del suo carattere ipotetico.

L'analisi di tutti i concetti di specie proposti ci porterebbe lontano, ed esula dagli scopi della presente esposizione. Qui prenderò in considerazione solo quegli aspetti che, a mio avviso, contribuiscono maggiormente a caratterizzare la specie come livello significativo di aggregazione ed espressione del materiale vivente. Tra questi, riveste particolare importanza la relazione con l'ambiente. G. Evelyn Hutchinson (1957) è stato tra i primi a sottolineare l'esclusivo rapporto che esiste tra specie e nicchia ecologica. Non mancano le definizioni ecologiche della specie, a partire da quella di Van Valen (1976) che la rappresenta come «*a lineage that occupies an adaptive zone minimally different from that of any other lineage in its range*». L'idea fu ripresa dallo stesso Mayr che la combinò con la sua definizione classica «*a species is a reproductive community of populations (reproductively isolated from others) that occupies a specific niche in nature*» (Mayr, 1982).

La specie, eterno conflitto tra evoluzione e classificazione

Le specie si collocano, come più o meno durevoli momenti di equilibrio, nel continuo divenire degli organismi orchestrato dall'evoluzione biologica. Il processo evolutivo è continuo nel tempo, ma produce gruppi di organismi talora assai diversi con discontinuità che si accentuano con la distanza geografica. Bisogna tuttavia riconoscere che l'organizzazione del materiale vivente, alle sue diverse scale, non è sempre riducibile a unità gerarchiche definite e identificabili, e questo vale per gli individui, le popolazioni e le specie, la cui essenzialità non è in discussione in molti taxa, ma sfuma, complicandosi in altri.

L'arduo e necessario compito del sistematico è quello di classificare il mondo vivente suddividendolo in specie. In questa sfida egli deve fare i conti con i vincoli posti da un lato dalle proprietà biologiche attribuite alla specie e, dall'altro lato, dal rappresentare, le specie stesse, i punti terminali dei rami di un albero filogenetico.

Un primo punto da risolvere è capire se esiste davvero incompatibilità tra i diversi *concetti* di specie, o se l'apparente diversità concettuale riguardi piuttosto i *criteri* utilizzati per la discriminazione tra le specie. In altre parole è necessario distinguere le proprietà necessarie della specie dai metodi per la definizione e identificazione dei confini tra le specie.

I diversi concetti e le varie definizioni di specie differiscono a seconda della prospettiva tematica, così mentre la specie biologica intesa, nella sua accezione pluridimensionale come metapopolazione, è riconosciuta dal genetista di popolazioni, il criterio filogenetico sarà favorito dal paleontologo. Endler (1989) ritiene che è improduttivo e fuorviante applicare un concetto di specie in grado di rispondere a tutte le domande, ma è anche vero che non possiamo che adottare un unico sistema di classificazione, condiviso, in grado di far fronte a tutte le esigenze. Pertanto è necessario un quadro concettuale per stabilire quale tipologia di specie dovrebbe essere inclusa in tale classificazione. Idealmente tale concetto dovrebbe essere sufficientemente generale da rappresentare sia gli organismi a riproduzione asessuata o uniparentale, sia quelli a riproduzione anfigonica, tipicamente riconosciuti nel CBS. Vale a dire, una specie dovrebbe essere riconoscibile come unità genetica, unità di riproduzione, entità filogenetica e come unità ecologica, nella misura in cui queste proprietà possano essersi sviluppate coerentemente.

Una visione di questo tipo che tende a coniugare le varie proprietà biologiche delle specie è quella proposta da Templeton (1989) nel suo concetto coesivo della specie (CCS), che deriva direttamente dai meccanismi evolutivi responsabili della speciazione (vale a dire flusso genico, selezione naturale e deriva genica) e le loro conseguenze genetiche. Ma il CCS è inadeguato quando cerchiamo di renderlo operativo.

Gli strumenti della genetica molecolare: il DNA-barcoding

A partire dal 2003, vari gruppi di ricerca hanno iniziato ad accumulare dati molecolari, con lo scopo di realizzare una sorta di inventario della vita, in cui la biodiversità potesse essere inventariata sotto forma di sequenze di DNA specie-specifiche. In particolare, l'idea lanciata da Paul Hebert dell'Università canadese di Guelph (Hebert *et al.*, 2003; Ratnasingham and Hebert, 2007) fu di utilizzare un tratto del gene COI, codificante per la citocromo ossidasi I, come «firma molecolare» per identificare una specie. La scelta di questo gene per esplorare i confini tra specie tiene conto dei vantaggi pratici dell'utilizzo del DNA mitocondriale, e del largo uso che di questo gene era stato fatto negli anni precedenti in una grande varietà di organismi. Sequenze di COI sono inoltre correntemente utilizzate a vari

livelli tassonomici, in studi di filogenesi, filogeografia e genetica di popolazione, con il grande vantaggio di avere già a disposizione, non solo protocolli già avviati di amplificazione, ma anche un gran numero di sequenze da poter elaborare sotto l'ottica barcode. La sequenza del gene COI sarebbe quindi assimilabile al codice a barre presente su tutti i prodotti venduti nei supermercati e permetterebbe di determinare la specie di appartenenza di animali e piante raccolti in natura, anche in assenza di specifiche conoscenze tassonomiche. Il progetto ha lo scopo di creare una banca dati della diversità della vita, basata su questo frammento di DNA, accessibile online e consultabile da chiunque. Attraverso l'identificazione di valori soglia di differenziamento genetico, entro cui far rientrare individui appartenenti alla stessa specie, l'approccio barcode permette di indagare ed approfondire i confini tra le specie e le varie questioni legate a questo tema.

Un ulteriore vantaggio del DNA barcoding è rappresentato dalla possibilità di identificare specie criptiche, ovvero di distinguere come appartenenti a specie diverse individui che, essendo morfologicamente simili, sono stati considerati come appartenenti ad un'unica specie. Questo sarebbe fattibile riuscendo ad identificare valori limite di differenziamento genetico entro i quali due individui possono essere considerati appartenenti alla medesima specie e, oltre i quali, dovrebbero considerarsi appartenenti a specie diverse. Anche se la soglia sembra essere in qualche modo taxon dipendente, è stato osservato che un valore di distanza genetica tra due sequenze di DNA-barcode che sia uguale o maggiore del tre per cento (D=0.03) individua specie distinte (Fig. 2).

Al momento sono attivi numerosi progetti di DNA barcoding, sia di vertebrati che di invertebrati, che hanno messo a disposizione della comunità scientifica enormi quantità di dati. Alla luce di questi ultimi sviluppi, un tratto del gene mitocondriale COI è divenuto il marcatore mitocondriale in assoluto più utilizzato, soprattutto per gli organismi animali. Lo stesso marcatore, preferibilmente in associazione con sequenze di DNA nucleare, viene comunemente impiegato anche in studi più ampi di filogenesi. La scelta di un marcatore specifico per le piante e i funghi è più problematica, ma sembra oggi orientata, almeno nelle Angiosperme, verso l'utilizzo della sequenza *trnH-psbA*, uno spaziatore intergenico nel DNA plastidico (Kress *et al.* 2005; Chase e Fay, 2009).

In che misura, dunque, il DNA barcode è in grado di risolvere il problema dell'identificazione dei confini tra le specie? E può questo approccio essere risolutivo nelle diverse tipologie di specie?

Alla luce dei dati finora prodotti possiamo rispondere che il DNA barcoding è in grado di risolvere problemi di classificazione specifica in un vasto spettro di organismi e situazioni, ma molti taxa si sono dimostrati intrattabili con questo approccio (Waugh, 2007).

Proviamo a cercare di capire perché. Come biologi ed evoluzionisti sappiamo che le specie sono il risultato di processi storici, soprattutto la speciazione e le dinamiche dell'areale. Conoscere queste storie aiuta ad interpretare l'essenza delle

	n	Taxa	Comparisons	Min Dist(%)	Mean Dist(%)	Max Dist(%)	SE Dist(%)
Within Species	3291	564	24493	0	6.198	75	0.129
Within Genus	3370	266	59422	0	17.863	75	0.108

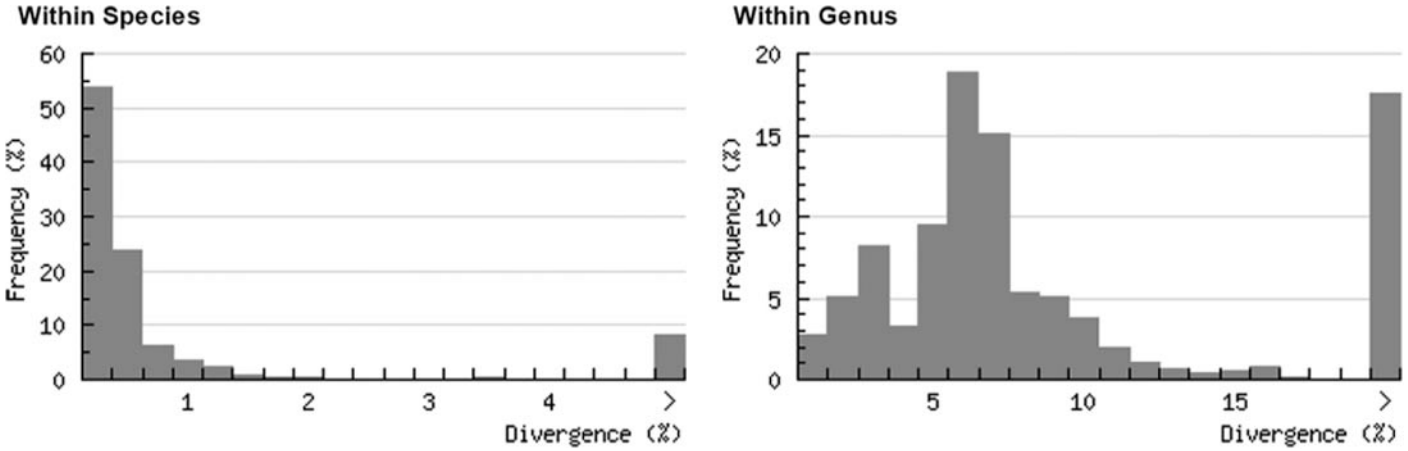

Fig. 2. Distribuzione dei valori di distanza genetica intra- ed inter-specie, determinati su coppie di campioni di uccelli del Nord America. I valori calcolati tra individui conspecifici sono, in media, largamente inferiori al 3%, al contrario di quelli registrati tra specie. Dati analizzati da sito «Barcode of Life Data Systems (BOLD)»: www.barcodinglife.org/

specie. Infatti le specie riflettono, nelle loro proprietà, la firma della modalità di speciazione, ove assumono ruoli più o meno predominanti:

– Il sistema genetico.
– La selezione naturale.
– Il tempo evolutivo.

Il sistema genetico, cioè l'organizzazione dei geni e di altro materiale genetico nei cromosomi, può facilitare, accelerandolo, il processo di speciazione, soprattutto quando questo è basato su meccanismi robertsoniani, o polimorfismi da inversione o, nel caso estremo della speciazione istantanea, su meccanismi di poliploidia, particolarmente frequenti nelle piante.

La selezione naturale può avere un ruolo determinante in quei fenomeni di speciazione simpatrica legati a cambiamenti (shift) della nicchia trofica, frequenti soprattutto negli insetti fitofagi. In questi casi la pressione selettiva può accelerare notevolmente il processo di diversificazione adattativa dei genotipi che hanno intrapreso il nuovo cammino evolutivo.

Infine, in assenza di pressioni selettive divergenti, anche la semplice condizione di allopatria di due popolazioni originariamente conspecifiche, può in tempi lunghi condurre alla speciazione, a patto che perduri la barriera al flusso genico. È in questo che si esplicita il ruolo del tempo evolutivo. Più lungo sarà il tempo trascorso in isolamento, maggiore sarà il numero di sostituzioni nucleotidiche differenti nelle sequenze di DNA dei due pool genici interessati. L'accumulo di mutazioni divergenti in tutto il genoma condurrà inevitabilmente alla speciazione per deriva genetica, e la velocità del processo sarà inversamente proporzionale alla dimensione effettiva della popolazione.

Questa rapida analisi dei tempi e modi di speciazione ci aiuta ad interpretare il significato biologico delle stime di distanza genetica su cui si basa la logica del DNA barcode. La soglia del 3% di divergenza genetica funzionerà relativamente bene nel separare specie che sono il risultato di un processo graduale di speciazione geografica guidato dall'accumulo di mutazioni divergenti, come succede ad esempio negli animali adattati alla vita cavernicola (Sbordoni, 1982) e, in particolare, negli ortotteri del genere *Dolichopoda* (Allegrucci *et al.*, 2009) (Fig. 3).

Valori molto più piccoli, anche di un fattore 10, non consentono di discriminare tramite barcode due specie che differiscono per una o più inversioni cromosomiche come avviene in alcune *Anopheles* (Coluzzi *et al.,* 2002), o due specie recenti originatesi in simpatria per "shift" adattativo, come rilevato nelle mosche della frutta del genere *Rhagoletis* (Smith and Bush, 1997) (Fig. 4). È molto probabile che, nel caso di *Dolichopoda*, il processo di divergenza abbia coinvolto gran parte del genoma, riflettendosi anche nei geni mitocondriali. Al contrario, negli altri due esempi, la divergenza dovrebbe aver interessato, in tempi relativamente brevi, soltanto pochi geni bersaglio della selezione, o particolari combinazioni di essi, senza mostrare alcun effetto nelle sequenze di DNA mitocondriale. Non a caso il DNA mitocondriale viene spesso utilizzato come orologio molecolare (Allegrucci e Sbordoni, 2008).

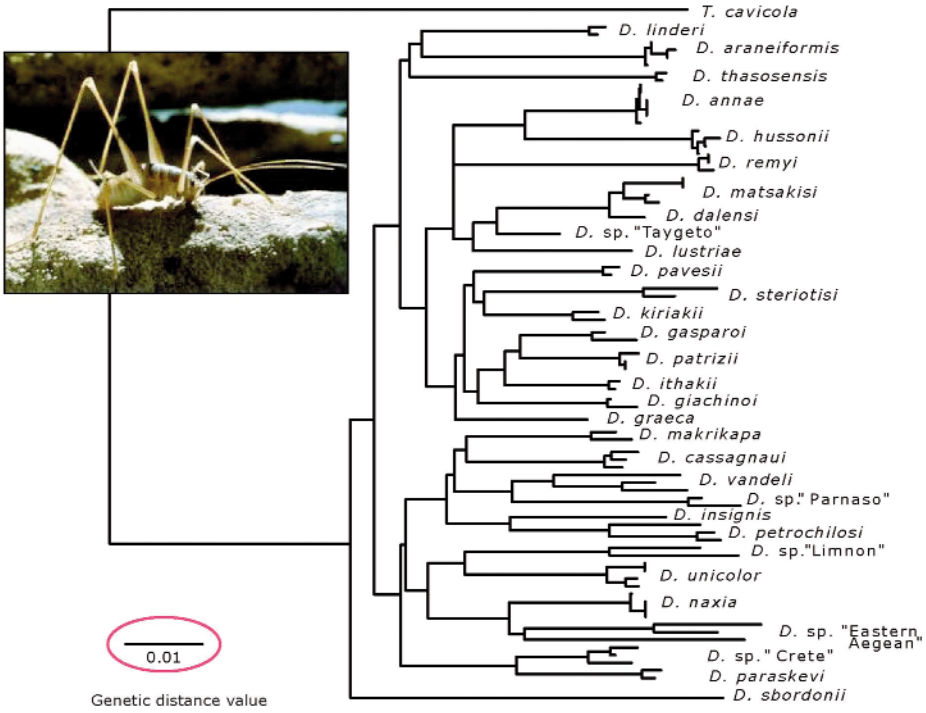

Fig. 3. Filogenesi molecolare degli ortotteri cavernicoli del genere *Dolichopoda* del Mediterraneo Orientale, basata su un tratto del gene mitocondriale COI. L'albero filogenetico è costruito con il metodo di neighbor-joining, dove la distanza genetica tra due taxa è misurata dalla somma della lunghezza dei rami che li riguardano. Anche in questo caso il DNA barcode si rivela uno strumento adeguato a discriminare le specie, come è evidente dalle distanze tra specie che risultano largamente superiori a quelle che separano popolazioni conspecifiche rappresentate dalle politomie terminali dei rami (dati da Allegrucci *et al.*, 2009).

Un approccio operazionale

Il dibattito sulle proprietà della specie mostra, come abbiamo visto, diverse sfaccettature: una più classica che pone in contrapposizione il «concetto biologico di specie, CBS» a quello «tipologico, CTS» (Mayr, 1942), ed una più moderna che individua un conflitto, apparentemente insanabile, tra il CBS ed il «concetto filogenetico, CFS» (Donoghue, 1985).

Ma se analizziamo la natura delle contrapposizioni dobbiamo convenire che i tre concetti non fanno altro che focalizzare proprietà della specie tra loro non contrapposte e tutte coerenti con una visione della specie come prodotto in itinere del processo evolutivo e dobbiamo quindi convenire che una specie, oltre a rappresentare «*the smallest monophyletic group of common ancestry* (de Quieroz and Donoghue, 1990)», esprime il suo pool genico distinto (CBS), avendo eventualmente acquisito quei caratteri distintivi avocati dal concetto tipologico.

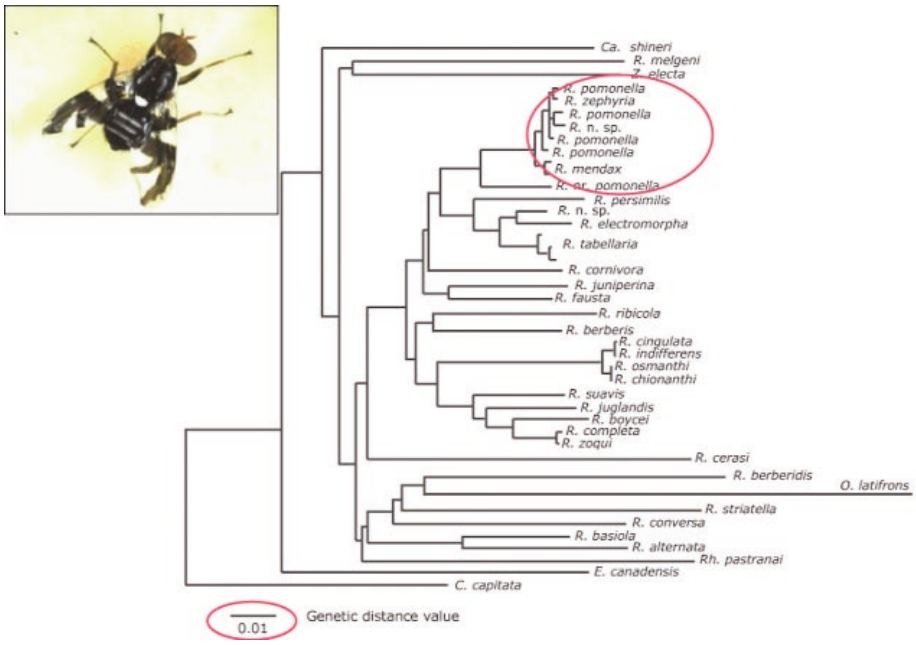

Fig. 4. Filogenesi molecolare di un gruppo di specie delle mosche della frutta del genere *Rhagoletis*, basata su un tratto del gene mitocondriale COII. Confrontando questa figura con la precedente si osserva la stretta similarità genetica tra specie, soprattutto nel gruppo di *R. pomonella*. Le basse distanze genetiche rilevate mostrano che la logica del DNA barcode per discriminare le specie non si adatta a questo tipo di organismi (vedi testo; da Smith e Bush, 1997).

In pratica, nel loro lavoro di routine, molti sistematici tendono ad utilizzare approcci operazionali alla specie, che sono basati su caratteri morfologici unici e condivisi o gerarchie di questi. Sebbene ciò non venga esplicitamente dichiarato, queste specie sono basate su filosofie che vanno dal classico concetto tipologico, a quello filogenetico, a quello fenetico. Le tradizionali definizioni fenetiche di specie sono basate essenzialmente sull'indagine numerica degli intervalli che separano gruppi (cluster) di individui feneticamente simili (Michener, 1970; Sneath and Sokal, 1973). Per questa valutazione vengono presi in esame parecchi differenti tipi di caratteri tassonomici «non pesati», ma il loro significato biologico non viene valutato. Il «concetto» fenetico è stato fortemente criticato, perché ritenuto insufficiente per descrivere le complesse interrelazioni che esistono tra gruppi di popolazioni simili. Ciononostante, questo tipo di approccio possiede vantaggi operazionali di valore pratico e, di conseguenza, è ampiamente adottato ed utilizzato dai sistematici.

Poiché la specie è per sua natura una entità complessa, essa richiede un approccio multidimensionale che tenga conto dell'intero repertorio di caratteri tassonomici. Oggi, il grande sviluppo delle metodologie di analisi multivariata, nonché il vastissimo assortimento di tecnologie utili alla misura di parametri in vari campi,

dall'analisi dell'immagine, alla cronobiologia, hanno notevolmente arricchito il kit di caratteri a disposizione del moderno sistematico. Per non parlare dei progressi tecnici e concettuali nel campo della biologia molecolare che hanno reso relativamente facile e veloce l'acquisizione e l'interpretazione filogenetica dei dati di sequenza che contengono un'enorme quantità di informazioni. L'uso abituale di questi caratteri ha migliorato sostanzialmente la nostra capacità di comprendere la struttura genetica delle specie, e ci ha permesso di scoprire l'esistenza di criptospecie.

Ma DNA e proteine non rappresentano i soli depositari della storia evolutiva. Qualsiasi altro tipo di carattere è potenzialmente idoneo a dare il proprio contributo alla delimitazione di una specie. Ad esempio, molto del ruolo ecologico (nicchia) di un organismo, è scritto nella sua morfologia, ma non esiste alcuna garanzia che il divario ecologico tra due specie affini corrisponda ad un gap genetico, anche se tale coincidenza si verifica nella maggior parte dei casi. Il valore diagnostico di ogni carattere varia a seconda del taxon, o di specifiche situazioni evolutive, geografiche ed ecologiche. Nella maggior parte dei taxa gli specialisti sanno molto bene quali caratteri sono più propensi a rappresentare le proprietà biologiche delle specie. Questa discussione ci porta a riconsiderare l'utilità dell'approccio fenetico, ma con le opportune cautele e modifiche. Dal momento che diversi descrittori hanno valori diversi a seconda dell'organismo, non ci si può affidare a procedure discriminanti automatiche, ma certamente si potrà disporre di tutto l'insieme di algoritmi e procedure multivariate messe a punto in campo sistematico ed ecologico. La responsabilità della decisione finale dovrà inevitabilmente poggiare sulla competenza ed esperienza dello specialista. È opportuno sottolineare che i caratteri tassonomici non solo non variano necessariamente in maniera coordinata, ma sono spesso in conflitto tra di loro. Il vaglio e la pesatura dei caratteri hanno sempre avuto e continuano ad avere un ruolo fondamentale nel processo di delimitazione delle specie.

Utilizzando questa logica, e con queste premesse, le specie sono considerate come «*gruppi di individui che sono effettivamente separati da altri gruppi nello spazio definito dai loro descrittori*» (Sbordoni, 1993). Come nelle precedenti definizioni fenetiche le specie sono viste come nubi di probabilità in un iperspazio. Ma qui i caratteri vengono pesati, e viene dato valore ai descrittori genetici, ecologici ed inter-riproduttivi, cioè proprio quelli che caratterizzano la specie come gruppo monofiletico, come cluster di genotipi e come gruppo di individui che condividono una speciale relazione con l'ambiente. Una riduzione «ad hoc» di tale iperspazio rende questo concetto multidimensionale operativo. Per esempio, la tipica specie biologica diventa un caso particolare laddove i rapporti genetici e riproduttivi tra popolazioni sono quantificati e analizzati come sottoinsieme di un più ampio set di descrittori. Ma l'utilizzo dell'approccio multidimensionale dovrebbe rivelarsi particolarmente utile per gli organismi a riproduzione asessuata o uniparentale, includendo batteri, protisti, funghi, rotiferi e molti taxa partenogenetici, per i quali è tradizionalmente difficile o impossibile l'applicazione del concetto biologico di specie, permettendo così di superare il vincolo della riproduzione anfigonica e con-

sentendo, non solo in linea teorica, di valutare l'identità di cluster definiti dai descrittori rilevanti. Nella letteratura tassonomica, non solo recente, troviamo vari esempi di questo approccio, adottato con successo in ortotteri cavernicoli (Sbordoni *et al.*, 1991), farfalle (Cesaroni *et al.*, 1994), pesci (Barluenga *et al.*, 2006), Ostracodi fossili (Gross *et al.*, 2008), Rotiferi (Fontaneto *et al.*, 2007), etc. (Fig. 5).

La grande maggioranza delle definizioni di specie, che privilegiano l'una o l'altra proprietà, sono riconoscibili all'interno di questo approccio, ma qui mi piace ricordare in particolare una definizione poco nota di Alfred Russell Wallace, riportata incidentalmente in un suo scritto dove polemizza con Galton, che recita così:

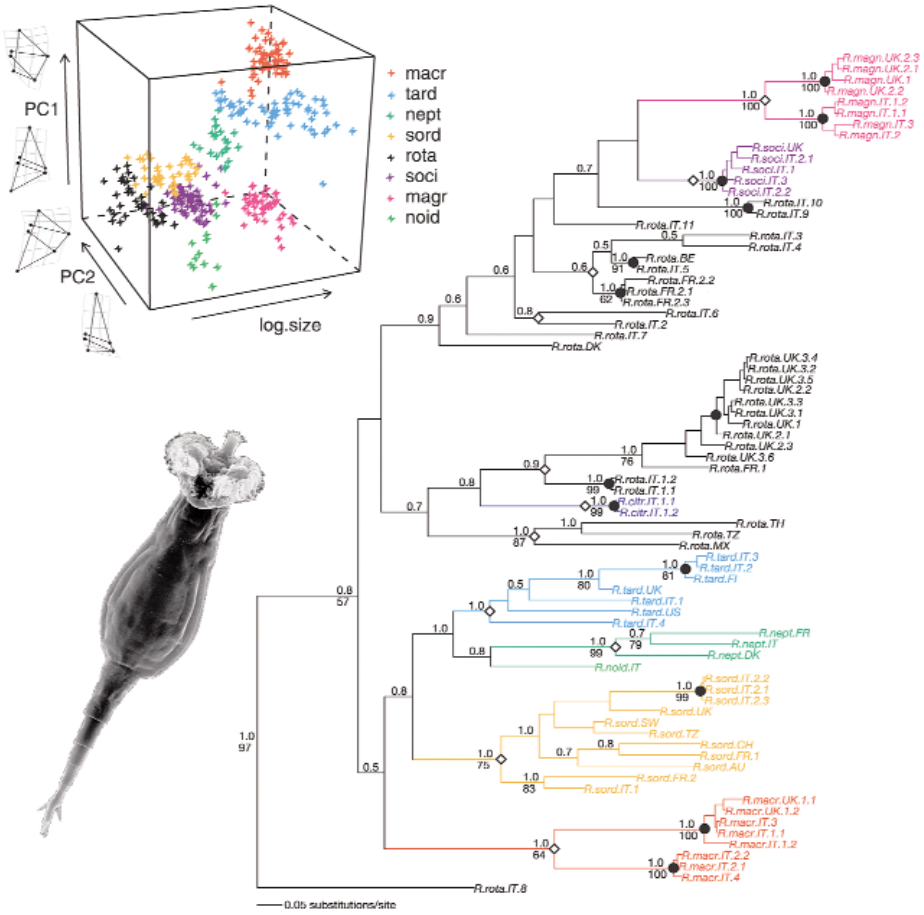

Fig. 5. Risultati di un approccio multidimensionale alla discriminazione di specie nei Rotiferi del genere *Rotaria* utilizzato tramite la scelta di un set di caratteri genetici e morfologici. Nonostante il sistema di riproduzione unisessuale, l'approccio identifica chiaramente cluster specifici separati nello spazio dei descrittori, dove emerge il significato della morfologia come espressione dell'adattamento a nicchie ecologiche distinte (modificato da: Fontaneto *et al.*, 2007).

«*A species … is a group of living organisms, separated from all other such groups by a set of distinctive characteristics, having relations to the environment not identical with those of any other group of organisms, and having the power of continuously reproducing its like*» (Wallace, 1895).

Questa definizione, proposta molti anni prima dello sviluppo della Teoria Sintetica, fa riferimento a tutte le proprietà emergenti della specie: il set di caratteri distintivi (evidenziato dal concetto tipologico), la relazione con l'ambiente (concetto ecologico) ed infine il potere di riprodurre le proprie caratteristiche che sottende alle proprietà del materiale ereditario. Rispetto a molte altre definizioni, quella di Wallace ha certamente il merito di evidenziare la multidimensionalità, concetto che, come ho cercato di dimostrare, esprime la migliore soluzione operativa al problema della delimitazione delle specie.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare Giuliana Allegrucci, Donatella Cesaroni, Marina Cobolli e Renata Landotti per aver letto il manoscritto, permettendomi di eliminare errori e imprecisioni.

LAVORI CITATI

Allegrucci G., Sbordoni V. (2008). L'orologio molecolare: uno strumento per la misura dei tempi dell'evoluzione. Accademia Nazionale dei Lincei, 34° Seminario sull'Evoluzione Biologica, *Contributi Centro Linceo Interdisciplinare «B. Segre»*, 119: 185-217.

Allegrucci G., Rampini M., Gratton P., Todisco V. and Sbordoni V. (2009). Testing phylogenetic hypotheses for reconstructing the evolutionary history of *Dolichopoda* cave crickets in the eastern Mediterranean. *J. Biogeography* 36: 1785-1797.

Barluenga M., Stolting K.N., Salzburger W., Muschick M., Meyer A. (2006). Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature* 439: 719-23.

Baum D. (1992). Phylogenetic species concepts. *Trends EcoL EvoL* 7: 1-2.

Bock W.J. (1986). Species concepts, speciation, and macroevolution. In *Modern Aspects of Species* (Iwatsuki K., Raven P.H. and Bock W.J., eds.), pp. 31-57. University of Tokyo Press, Tokyo.

Cesaroni D., Lucarelli M., Allori P., Russo F. and Sbordoni V. (1994). Patterns of evolution and multidimensional systematics in graylings (Lepidoptera: Hipparchia). *Biol. J. Linn. Soc.* 52: 101-119.

Chase M.W. and Fay M.F. (2009). Barcoding of Plants and Fungi. *Science* 325: 682-683.

Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V. and Di Deco M.A. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **73**, pp. 483-497.

Coluzzi M., Sabatini A., della Torre A., Di Deco M.A. and Petrarca V. (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* 298: 1415-1418.

Cracraft J. (1983). Species concepts and speciation analysis. In *Current Ornithology* (Johnston, R.F., ed.), pp. 159-187. Plenum Press, New York.

Darwin C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection & c.*, John Murray.

Darwin C. (1862). On the Various Contrivances by which British and Foreign Orchids are Fertilised by lnsects, and on the Good Effects of lntercrossing. London, John Murray: 197-203.

Dobzhansky T. (1935). A Critique of the Species Concept in Biology. *Philosophy of Science* 2: 344-355.

Dobzhansky T. (1950). Mendelian populations and their evolution. *Am. Nat.* 84: 401-418.

Donoghue M.J. (1985). A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist* 88: 172-181.

Endler J.A. (1989). Conceptual and other problems in speciation. In *Speciation and its Consequences* (Otte D. and Endler J., ed.), pp. 625-648. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Fontaneto D., Herniou E.A., Boschetti C., Caprioli M., Melone G., Ricci C. and Barraclough T.G. (2007). Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *Plos Biology*, doi: 10.1371/journal.pbio.0050087.

Gross M., Minati K., Danielopol D.L. and Piller W.E. (2008). Environmental changes and diversification of *Cyprideis* in the Late Miocene of the Styrian Basin (Lake Pannon, Austria) *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments* 88: 161-181.

Harrison R.G. (1990). Hybrid zones: windows on evolutionary process. In *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, Vol. 7 (Futuyma D. and Antonovics J., eds), pp. 69-128. Oxford University Press, Oxford.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. and de Waard J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313-321.

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

Hutchinson G.E. (1957). Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 22: 415-427.

Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A. and Janzen D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS* 102: 8369-8374.

Mallet J. (2008). Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363: 2971-2986.

Mattoccia M., Romano A. and Sbordoni V. (2005). Mitochondrial DNA sequence analysis of the spectacled salamander, *Salamandrina t*erdigitata (Urodela: Salamandridae), supports the existence of two distinct species. *Zootaxa* 995: 1-19.

Mayden R.L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In *Species: the Units of Biodiversity* (Claridge M.F. *et al*., eds.), pp 381-424, Chapman & Hall.

Mayr E. (1942). Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. New York: Columbia University Press.

Mayr E. (1963). Animal Species and Evolution. Cambridge, MA. Harvard University Press.

Mayr E. (1982). The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance (Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, MA).

Mayr E. (2001). Wu's genic view of speciation. *J . Evol. Biol.* 14: 866-867.

Mens P.F., Schoone G.J., Kager P.A. and Schallig H.D. (2006). Detection and identification of human *Plasmodium* species with real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Malaria Journal* 5: 80, doi: 10.1186/1475-2875-5-80.

Michener C.D. (1970). Diverse approaches to systematics. *Evol. Biol.* 4: 1-38.

Minelli A. (1991). Names for the system and names for the classification. In *Improving the Stability of Names: Needs and Options* (Hawksworth D.L. ed.), pp. 183-189. Koeltz Scientific Books, Königstein.

Paterson H.E.H. (1978). More evidence against speciation by reinforcement. *South African J. Sci.* 74: 369-371.

Paterson H.E.H. (1985). The recognition concept of species. In *Species and Speciation* (Vrba E.S., ed.), pp. 21-29. Transvaal Museum, Pretoria.

de Queiroz K. and Donoghue M.J. (1988). Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics* 4: 317-338.

de Queiroz K. and Donoghue M.J. (1990). Phylogenetic systematics and species revisited. *Cladistics* 6: 83-90.

Ratnasingham S. and Hebert P.D.N. (2007). Barcoding Bold: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x

Remington C. (1985). Genetical differences in solutions to the crisis of hybridization and competition in early sympatry. In *Genetics and Ecology in Contact Zones of Populations* (Sbordoni V. ed.). *Boll. Zool.* 52 (1-2): 21-43.

Rothschild W. and Jordan K. (1903). *A* Revision of the Lepidopterous Family Sphingidae. London and Aylesbury, Hazell, Watson and Viney: 30-32.

Sbordoni V. (1982). Advances in speciation of cave animals. pp. 219-240. In «*Mechanisms of speciation*», Barigozzi C. ed., A.R. Liss Inc., New York.

Sbordoni V. (1993). Molecular systematics and the multidimensional concept of species. *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 39-42.

Sbordoni V., Allegrucci G. and Cesaroni D. (1991). A multidimensional approach to the evolution and systematics of *Dolichopoda* cave crickets. In *Molecular Techniques in Taxonomy* (Hewitt G.M. *et al*., ed.), pp. 171-199. NATO ASI Series, Vol. H57. Springer, Berlin.

Simpson G.G. (1961). *Principles of Animal Taxonomy* Columbia University Press, New York.

Smith J.J. and Bush G.L. 1997. Phylogeny of the genus Rhagoletis (Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase II. *Mol. Phyl. Evol.* 7: 33-43.

Sneath E.H.A. and Sokal R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*, Freeman W.H., San Francisco.

Templeton A.R. (1989). The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In *Speciation and its Consequences* (Otte D. and Endler J., eds.), pp. 3-27. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Van Valen L. (1976). Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* 25: 233-239.

Volkman S.K., Barry A.E., Lyons E.J., Nielsen K.M., Thomas S.M., *et al.* (2001). Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science* 293: 482-484.

Wallace A.R. (1867). Creation by law. *Quarterly Journal of Science* 4: 470-488.

Wallace A.R. (1895). The method for organic evolution. *Fortnightly Review (N.S.)* 57: 435-445, London.

Waugh J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* 29: 188-197.

Wiley E.O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* 27: 17-26.