

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA VEGETALE

XIX CICLO

SETTORE DISCIPLINARE: BIO-01

**“Analisi dell’isolamento riproduttivo nelle orchidee
mediterranee”**

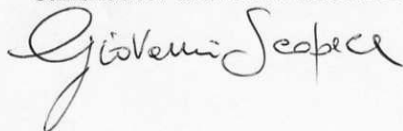
Coordinatore: CHIAR.MA PROF. SSA ANNA MARIA INNOCENTI



Tutor: CHIAR.MO PROF. ALDO MUSACCHIO



Candidato: GIOVANNI SCOPECE



ANNO ACCADEMICO 2005-2006

"... from these 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" DARWIN 1859

"Species are groups of actually or potentially interbreeding natural populations which are reproductively isolated from other such groups" MAYR 1942

"The origin of new species, signifying the origin of essentially irreversible discontinuities with entirely new potentialities, is the most important single event in evolution" MAYR 1963

"If one accepts some version of biological species concept, then the central problem of speciation is understanding the origin of those isolation barriers that actually or potentially prevent gene flow in sympatry" COYNE ed ORR 2004

La speciazione, ovvero il processo attraverso il quale si formano nuove specie, è uno dei più appassionanti e controversi fenomeni evolutivi (*OTTE* ed *ENDLER* 1989; *COYNE* ed *ORR* 1998; *HOWARD* e *BERLOCHER* 1998; *TURELLI et al.* 2001). Comprendere in che modo si formano nuove specie equivale infatti a comprendere i misteri che sono alla base della diversificazione degli organismi viventi.

Da quando, con *DARWIN* (1859), si è superato il dogma della fissità della specie, moltissimi studiosi si sono cimentati su tale argomento. Tuttavia tali studi, condotti con diversi approcci metodologici, più che chiarire i meccanismi attraverso i quali la speciazione avviene, hanno invece suscitato infinite discussioni e controversie. Tale disaccordo tra gli studiosi è derivato dalle difficoltà, non solo di ordine pratico, ma anche di ordine teorico, che lo studio della speciazione presenta. I vari gruppi di organismi differiscono infatti nei modi e nei tempi della speciazione e questi dipendono da caratteristiche geografiche, ecologiche, riproduttive e genetiche (*MAYR* 1942) che variano da gruppo a gruppo se non addirittura da specie a

specie. Inoltre la speciazione è generalmente un processo lento e pertanto difficilmente osservabile in tempo reale (*PRESGRAVES* 2002). La questione che sembra più ostica è tuttavia di ordine teorico. La nostra visione di come avviene la speciazione dipende infatti da cosa noi consideriamo essere una specie (*CRACRAFT* 1983; *HARRISON* 1998) e, allo stato attuale, non esiste ancora una definizione di tale concetto universalmente accettata.

1 DEFINIZIONI DI SPECIE

La maggior parte degli studiosi concorda sul fatto che esistano delle discontinuità tra gli organismi e che dunque esistano dei raggruppamenti naturali di individui (specie). Tuttavia, a quasi 150 anni dalla pubblicazione dell'*Origine delle Specie* (*DARWIN* 1859), non si è ancora affermata una definizione condivisa di tali raggruppamenti ed anzi tutte le proposte avanzate nel corso di questo tempo, si sono sempre rivelate suscettibili a critiche.

Un *excursus* sulle varie definizioni del concetto di specie non può prescindere da ciò che *DARWIN* indicava con tale termine. Il grande naturalista inglese riteneva che la categoria di specie si dovesse applicare a gruppi di organismi sulla base di criteri puramente di comodo. Egli cioè riteneva che le specie non fossero entità chiaramente distinte tra loro ed anzi sottolineava la mancanza di discontinuità in natura ed il carattere arbitrario dei confini delle specie.

Come detto in precedenza, tuttavia, ad oggi la maggior parte degli studiosi concorda nell'individuare delle discontinuità tra gli esseri viventi e pertanto nel corso dell'ultimo secolo si sono prodotte molte definizioni volte alla comprensione di tali discontinuità.

Nel 1978 *CRONQUIST* definì le specie come *i più piccoli gruppi costantemente e persistentemente distinti, e distinguibili sulla base di mezzi ordinari*. Questa definizione, nota come *concetto tassonomico* o *morfologico di specie*, poneva l'accento su caratteri morfologici senza prendere in considerazione alcun aspetto di tipo evolutivo. Tale definizione, pur avendo il pregio di essere facilmente applicabile, ha sollevato una serie di critiche difficilmente trascurabili. Il regno vivente infatti è caratterizzato da una grande variabilità anche tra gli individui appartenenti ad una stessa specie e, pertanto, è spesso difficile porre dei confini attraverso caratteri di tipo morfologico. Inoltre, molto frequentemente i due sessi di una stessa specie possono differire notevolmente dal punto di vista morfologico (*dimorfismo sessuale*): il pavone maschio ed il pavone femmina appartengono dunque a due specie distinte?

All'opposto invece, non è raro che importanti cambiamenti nel pool genico o nell'etologia di due specie, non siano accompagnati da altrettanto importanti variazioni morfologiche (*criptospecie*).

Nel 1983, *CRACRAFT* propose una definizione che vedeva le specie come *il più piccolo gruppo diagnosticabile di organismi individuali tra i quali c'è un modello parentale di ascendenza e di discendenza*. In tale ottica, la

specie era considerata come la minima unità monofiletica comprendente i membri di una determinata linea evolutiva. Questa definizione è molto simile a quella nota come *concetto filogenetico di specie* che vedeva la specie come *la più piccola aggregazione di popolazioni (sessuali) o stirpi (asessuali) identificabili attraverso una combinazione unica di caratteri individuali* (NIXON e WHEELER 1990). Queste definizioni tendono ad inquadrare le specie in un'ottica evolutiva ed a sottolineare come la classificazione debba riflettere la filogenesi degli organismi o meglio l'ipotesi filogenetica più accreditata.

Tuttavia anche queste definizioni non sono esenti da limiti. Analogamente a quanto detto per il *concetto morfologico di specie* infatti, non è chiaro in base a quali criteri stabilire le divergenze filogenetiche né quali di esse debbano essere considerate rilevanti ai fini della distinzione tra le specie. Inoltre, in natura non sono rari i casi di specie di origine ibridogena per i quali definizioni come quelle precedentemente enunciate sono totalmente inapplicabili.

Le definizioni del concetto di specie si sono storicamente adeguate al progredire delle conoscenze sull'evoluzione. Le definizioni di DOBZHANSKY e di MAYR, si collocano sempre all'interno di un contesto evolutivo.

DOBZHANSKY nel 1937, definì la specie come *quel gradino del processo evolutivo in corrispondenza del quale gruppi di individui realmente o potenzialmente in grado di incrociarsi tra loro segregano in due o più gruppi che sono fisiologicamente incapaci di incrociarsi tra loro*. Tale definizione prendeva per la prima volta in considerazione l'interfertilità degli individui

appartenenti ad una stessa specie. Tuttavia la definizione di *DOBZHANSKY* non tenne conto della possibilità di formazione degli ibridi né della possibilità che taxa fisiologicamente interfertili potessero essere isolati in condizioni naturali da meccanismi di tipo preriproduttivo. Tale obiezione non è irrilevante se si considera che moltissime specie, in condizioni naturali, mantengono la loro integrità attraverso meccanismi pre-riproduttivi che nulla hanno a che vedere con la capacità fisiologica di riprodursi tra loro.

Tale limite venne superato nella definizione di specie proposta in seguito da *MAYR* (*concetto biologico di specie*, *MAYR* 1942). Egli, infatti, oltre a sottolineare l'importanza dei caratteri biologici, prese anche in considerazione ciò che realmente accade in natura. Secondo *MAYR* (1942) dunque, le specie sarebbero *popolazioni o gruppi di popolazioni naturali che realmente o potenzialmente si riproducono tra loro e che sono riproduttivamente isolate da altri gruppi analoghi*.

In questa visione il carattere discriminante è dunque l'isolamento riproduttivo e questo è considerato la reale base da cui muove la divergenza delle specie. Sebbene la concezione delle specie come comunità riproduttive isolate sia ritenuta dalla maggior parte degli studiosi la migliore finora ideata, anch'essa non sfugge ad alcune critiche. Innanzitutto, essa si adatta bene solo agli organismi con riproduzione sessuale e tra questi solo a quelli nei quali la riproduzione è incrociata. Sono dunque esclusi da tale definizione tutti gli organismi con riproduzione asessuata e tutti quelli autogami. Inoltre, il *concetto biologico di specie* sembra essere difficilmente applicabile in condizioni di allopatria dal momento che una prova dell'interfertilità, in queste

condizioni, potrebbe essere data solo da esperimenti di incrocio improponibili su larga scala. Un'altra critica a questa definizione si riferisce poi agli organismi fossili per i quali è difficilmente ipotizzabile la possibilità di ottenere una prova di interfertilità.

VAN VALEN nel 1976 propose una definizione oggi nota come *concetto ecologico di specie*. Secondo tale definizione la specie sarebbe un *gruppo di organismi adattati ad una nicchia ecologica minimamente differente da quella occupata da altri gruppi analoghi*. In questo caso, la definizione includeva le specie non sessuali, e sottolineava la relazione fra organismo e ambiente, aspetto trascurato dalle altre definizioni. Il limite di tale definizione tuttavia risiede nel fatto che, come è difficile definire i confini tra le specie, così è anche difficile individuare quelli delle nicchie ecologiche. In pratica tale definizione sposta il problema ma non lo risolve.

Come abbiamo visto, oltre un secolo di intenso dibattito non è dunque bastato per mettere d'accordo tutti su una definizione del concetto di specie. In un recente lavoro, *PIGLIUCCI* (2003) propone quella che lui chiama la *dis-soluzione* del problema delle specie. Secondo la sua visione, una vera ed univoca definizione di specie non può esistere. Egli sottolinea che ogni definizione funziona bene se riferita ad alcuni gruppi, mentre è totalmente inapplicabile se applicata ad altri. La *dis-soluzione* del problema della specie potrebbe dunque risiedere nella categoria filosofica del *cluster concept* le cui basi andrebbero ricercate in una serie di caratteristiche come le relazioni filogenetiche, le

somiglianze genetiche, la compatibilità riproduttiva e le caratteristiche ecologiche. Queste caratteristiche assumono maggiore o minore rilevanza a seconda del gruppo al quale uno è interessato, in funzione della sua particolare biologia. Dunque, in questa ottica, ad un gruppo con riproduzione sessuale si potrà applicare il *concetto biologico di specie*, mentre gruppi di organismi clonali potranno essere meglio definiti attraverso il *concetto filogenetico di specie*.

A dispetto di tante controversie, tuttavia, tra gli evoluzionisti c'è un sostanziale accordo nell'attribuire all'isolamento riproduttivo un ruolo fondamentale nella formazione e nel mantenimento delle specie in natura. In tale ottica, la speciazione può dunque essere vista come l'evoluzione dei meccanismi di isolamento riproduttivo (COYNE 1994; COYNE ed ORR 1998; FUTUYMA 1998; NOOR 2002).

2. MECCANISMI DI ISOLAMENTO RIPRODUTTIVO

I meccanismi attraverso i quali le specie si isolano riproduttivamente tra loro sono generalmente distinti a seconda che agiscano nel ridurre la probabilità che gameti di specie diverse si uniscano a formare uno zigote vitale (barriere prezigotiche) o che riducano la vitalità o il potenziale riproduttivo dell'ibrido interspecifico (barriere postzigotiche).

Nelle piante, i meccanismi che ostacolano il flusso genico interspecifico sono distinti in pre e post-impollinazione. Le barriere pre-impollinazione, che sono esclusivamente pre-zigotiche, includono

fattori ecologici a causa dei quali due specie adattate ad habitat differenti, non si trovano a vivere abbastanza vicino da potersi incrociare e fattori riproduttivi che vanno dalla mancanza di sovrapposizione del periodo di fioritura a differenze morfologiche nella struttura florale che rendono impossibile, o quantomeno improbabile, l'incrocio (*LEVIN* 1978).

Le barriere post-impollinazione possono invece essere sia pre che postzigotiche (*SNOW* 1994) e comprendono l'incompatibilità o altri meccanismi di interazione tra polline e stigma, ma anche la formazione di embrioni abortivi, la mortalità e la sterilità dell'ibrido.

Nel corso degli ultimi decenni, la ricerca sull'isolamento riproduttivo ha avuto un grande slancio e molti lavori sono stati pubblicati nell'ampia letteratura scientifica relativa a tale argomento.

2.1 MECCANISMI PRE-RIPRODUTTIVI

In generale, ai meccanismi di isolamento pre-riproduttivi è stato attribuito un ruolo più importante nella delimitazione delle specie animali rispetto a quelle vegetali (*BAKER* e *BAKER* 1990; *ARNOLD* 1997). Questa idea deriva dal fatto che gli animali hanno evoluto comportamenti sessuali come il corteggiamento e la scelta del partner che possono contribuire in maniera decisiva all'instaurarsi dell'isolamento riproduttivo. Il canto degli uccelli, il richiamo delle rane, la luminescenza delle lucciole sono solo alcuni esempi di caratteristiche sessuali che possono aver avuto un ruolo nella divergenza di

popolazioni, precedentemente unite, o nel mantenimento dell'isolamento tra popolazioni già distinte.

Al contrario, la natura sessile degli organismi vegetali ha spesso portato ad una sottovalutazione di meccanismi di questo tipo. Ciononostante, sono noti molti casi di specie vegetali che mantengono l'isolamento attraverso meccanismi pre-riproduttivi e probabilmente una rivalutazione del loro ruolo evolutivo sarebbe opportuna.

Lo sfalsamento temporale del ciclo riproduttivo delle specie (*isolamento fenologico*) rappresenta un primo tipo di meccanismo di isolamento preimpollinazione. Questo meccanismo, molto frequente nelle piante, può riguardare diverse fasi del ciclo riproduttivo di una specie, rendendo impossibile l'incontro tra gameti di specie diverse.

Le barriere *fenologiche* possono essere determinate da una mancata sovrapposizione del periodo di fioritura tra specie diverse o anche da uno sfalsamento temporale nella produzione, nella dispersione o nella funzionalità dei gameti.

Uno degli esempi più notevoli di tale tipo di isolamento proviene da un gruppo di orchidee tropicali appartenenti al genere *Dendrobium*. I fiori di queste specie si aprono all'alba, in conseguenza di stimoli ambientali, ed avvizziscono al sopraggiungere della notte. La fioritura di queste tre specie, avviene in risposta allo stesso stimolo ambientale, tuttavia, l'intervallo di tempo che intercorre tra l'arrivo di questo stimolo e la fioritura cambia nelle tre specie. In tal modo la fecondazione tra le tre specie risulta praticamente impossibile.

Su questo tipo di isolamento si basano anche alcuni esempi di speciazione simpatica proposti recentemente. *SAVOLAINEN et al.* (2006) hanno dimostrato che due palme, *Howea forsteriana* ed *H. belmoreana*, si sono evolute a partire da un progenitore comune su una piccola isola oceanica. Nel tentativo di spiegare come fosse stato possibile un evento di speciazione senza separazione geografica, i ricercatori hanno osservato che, differenze nella composizione del suolo sul quale le palme vivevano, determinavano uno sfalsamento del periodo di fioritura. Pertanto, gruppi di palme che si erano adattate a suoli differenti non fiorivano contemporaneamente e la riproduzione avveniva preferenzialmente all'interno di due gruppi. Questo assortimento non casuale, nel corso del tempo, avrebbe causato l'accumularsi di differenze tali da portare alla differenziazione delle due attuali specie.

Anche *VASEK e SAUER* (1971) studiando quattro specie simpatiche del genere *Clarkia*, trovarono che la loro diversa fenologia era determinata da differenze di temperatura e di umidità del suolo.

Le basi biologiche che determinano questo tipo di isolamento riproduttivo possono essere molto diverse. Come abbiamo visto, lo sfalsamento del periodo di fioritura può, in alcuni casi, essere il prodotto pleiotropico dell'adattamento ad ambienti differenti. Tuttavia, nell'esempio relativo alle orchidee del genere *Dendrobium*, tale sfalsamento è una conseguenza di una risposta differenziale ad uno stesso stimolo ambientale e dunque le cause dell'insorgenza di una barriera fenologica potrebbero anche risiedere nell'azione della selezione naturale su popolazioni simpatiche.

Le differenti caratteristiche ambientali ed il diverso utilizzo delle risorse da parte delle specie, oltre a poter indirettamente causare una variazione della loro fenologia, possono contribuire in maniera diretta all'isolamento riproduttivo (*isolamento ecologico*).

Lo stretto legame che esiste tra le specie e l'ambiente nel quale vivono fa in modo che, anche leggere differenze nell'utilizzo delle risorse, possano creare condizioni di allopatria e, conseguentemente, di isolamento.

Nel regno vegetale sono noti molti esempi di specie che mantengono la loro integrità attraverso barriere di questo tipo. *WANG et al.* (1997) hanno studiato due entità appartenenti alla famiglia delle Asteraceae: *Artemisia tridentata* subsp. *tridente* ed *A. tridentata* subsp. *vaseyana*. Queste due sottospecie crescono nel nord dello stato dell'Utah a diverse altitudini e, nelle aree di simpatria (ad altitudini intermedie) formano frequentemente zone di ibridazione. Nel tentativo di verificare se queste due entità fossero isolate tra loro da meccanismi di tipo ecologico, i ricercatori allestirono un esperimento di *common garden* e trovarono che, sia i parentali che l'ibrido da loro formato, mostravano un maggiore successo riproduttivo se poste nel suolo appartenente al loro habitat di provenienza. Dunque, sebbene vi fosse anche una barriera di tipo postzigotico (l'ibrido era infatti sterile), la separazione altitudinale di queste due entità era causata da un adattamento locale e rappresentava dunque un esempio di isolamento ecologico.

Un altro esempio analogo ci è fornito da *Horkelia fusca*, una specie che vive in California al di sopra dei 1000 m, e da altre due specie,

appartenenti allo stesso genere (*H. californiana* e *H. cunea*), che vivono lungo la costa al di sotto dei 1000 m. CLAUSEN ET AL. (1940) allestirono un esperimento di *transplanting* e trovarono che, mentre *H. fusca* mostrava bassa vitalità e produceva pochi fiori a basse quote, le specie adattate alle basse altitudini non sopravvivevano in condizioni montuose. Questo risultato dunque dimostrava che tali specie, strettamente affini da un punto di vista filogenetico, mantenevano la loro integrità attraverso un isolamento di tipo ecologico.

Uno dei principali meccanismi di isolamento tra le piante a fiore deriva dalle loro interazioni con gli insetti impollinatori (*isolamento etologico*).

Nelle angiosperme, la selezione mediata da impollinatori è stata storicamente considerata la forza evolutiva responsabile della grande radiazione adattativa di questo gruppo di piante (GRANT 1949, 1971; PIJL 1960; STEBBINS 1970; MACIOR 1971; KIESTER *et al.* 1984). Al centro di questa considerazione c'è l'idea che gli impollinatori tendano a specializzarsi rispetto alle piante che visitano.

Tuttavia, sono noti molti casi di insetti di una determinata specie che visitano fiori di diverse specie e di fiori di una determinata specie visitati da più specie di impollinatori (WYATT 1983; HERRERA 1988; BRONSTEIN 1995; WASER *et al.* 1996; COZZOLINO *et al.* 2005). Questa frequente mancanza di specializzazione nei rapporti fiore-impollinatore, suggerisce dunque un ridimensionamento del ruolo di meccanismi di isolamento di tipo etologico nelle piante a fiore.

Ciononostante, esistono svariati esempi di specie che affidano il mantenimento della loro integrità a barriere di questo tipo. *Mimulus lewisii* e *M. cardinalis* sono due *sister species* adattate ad impollinatori diversi. *M. cardinalis* presenta dei fiori rossi caratterizzati da una stretta corolla al cui interno è contenuta una grossa quantità di nettare ed ha come principali impollinatori i colibrì; *M. lewisii* è invece impollinata prevalentemente da api e presenta dei fiori rosa o gialli con evidenti nettariovie. Studi genetici ed osservazioni di campo hanno dimostrato che le due specie differiscono proprio nelle caratteristiche che maggiormente sono riconosciute dai loro impollinatori (SCHEMSKE e BRADSHAW 1999). Pertanto è probabile che la selezione di questi tratti sia avvenuta proprio ad opera degli impollinatori e che dunque la formazione di queste due *sister species* sia stata causata da un meccanismo di tipo etologico.

Un altro esempio di questo tipo di isolamento ci è fornito da un gruppo di orchidee mediterranee (genere *Ophrys*). Queste specie attirano gli insetti attraverso un'elaborata mimesi florale ed ogni specie di *Ophrys* è adattata ad un'unica specie di impollinatore. Questo meccanismo di tipo etologico, consente a specie simpatriche di limitare la perdita di gameti (SCHIELSTL *et al.* 1999).

L'*isolamento meccanico*, un altro tipo di meccanismo pre-riproduttivo, si determina invece a seguito di incompatibilità morfologiche delle strutture riproduttive delle specie. Nelle piante, l'isolamento meccanico può insorgere a seguito di differenze morfologiche a carico del fiore o dell'impollinatore.

NILSSON (1983a) osservò che due orchidee, *Platanthera bifolia* e *P. chlorantha* erano visitate dagli stessi insetti impollinatori e che questi sembravano essere attratti da composti profumati prodotti da entrambe le specie. Tuttavia, i pollinodi di *P. bifolia* sono posizionati molto vicini gli uni agli altri e, quando prelevati, aderiscono alla base della proboscide dell'impollinatore, mentre i pollinodi di *P. chlorantha* sono più distanziati ed aderiscono alla zona oculare dell'impollinatore. La diversa posizione dei pollinodi di queste due specie sul corpo dell'impollinatore impedisce l'impollinazione interspecifica e funge pertanto da meccanismo di isolamento meccanico.

Di tipo meccanico è anche il cosiddetto *isolamento aerodinamico* tipico delle piante ad impollinazione anemofila. In questo caso, cambiamenti morfologici della struttura del polline o delle strutture riproduttive femminili favoriscono la cattura di polline conspecifico a sfavore di quello eterospecifico. Questo tipo di isolamento è stato osservato in popolazioni simpatriche di *Ephedra* (NIKLAS e BUCHMANN 1987) e di *Pinus* (LINDER e MIDGLEY 1996).

2.2 MECCANISMI POST-RIPRODUTTIVI

Quando i meccanismi finora descritti non impediscono l'incontro tra gameti di specie diverse, meccanismi postimpollinazione possono intervenire ad impedire il flusso genico interspecifico.

Se questi meccanismi agiscono in una fase successiva all'incontro dei gameti, ma precedente alla formazione dello zigote essi vengono classificati come meccanismi postimpollinazione di tipo prezigotico.

Nelle piante a fiore frequentemente il polline di una specie si deposita sullo stigma di un'altra, ma solo raramente vengono prodotti semi ibridi vitali. Questa barriera, definita come *incompatibilità gametica*, include tutte le barriere che agiscono dopo l'impollinazione e prima della fertilizzazione.

COYNE ed ORR (2004) definiscono un'incompatibilità gametica non competitiva ed una un'incompatibilità gametica competitiva.

L'incompatibilità gametica non competitiva si verifica quando sullo stigma di una specie è presente solo polline extraspecifico. Questa incompatibilità può essere determinata da diversi meccanismi. Tra questi si può ricordare l'inibizione dello sviluppo del tubetto pollinico (HESLOP-HARRISON 1982) che rende impossibile la fecondazione degli ovuli che si trovano alla base dello stigma. Questo meccanismo è stato ben descritto in *Rhododendron* ed in molte Graminaceae (HESLOP-HARRISON 1982; WILLIAMS e ROUSE 1990).

Il meccanismo di incompatibilità gametica competitiva (*competizione pollinica*) si verifica invece quando, pur essendo contemporaneamente presenti sullo stigma di una specie sia polline conspecifico che polline eterospecifico, la prole che si forma è preferenzialmente non ibrida. Poiché l'impollinazione interspecifica è un fenomeno molto frequente in natura, l'isolamento gametico competitivo potrebbe rappresentare una barriera riproduttiva molto comune. Ad oggi, tale barriera è stata osservata in popolazioni simpatriche di *Iris* (CARNEY *et al.* 1996), *Mimulus* (DIAZ e MACNAIR 1999) ed *Helianthus* (RIESEBERG *et al.* 1995).

Quando gameti di specie diverse si uniscono a formare uno zigote ibrido, intervengono ulteriori meccanismi di isolamento che possono evitare la formazione di individui adulti di origine ibridogena o che ne possono determinare la scarsa vitalità o la sterilità.

La *mortalità dello zigote* si determina quando la cellula uovo viene fecondata, ma lo zigote che ne deriva subisce uno sviluppo irregolare. Tale fenomeno può dipendere da anomalie nella mitosi, dalla mancanza di sufficienti sostanze nutritive nell'endosperma o dalla formazione difettosa degli organi. Lo zigote, pertanto, abortisce precocemente e non porta alla formazione di un individuo adulto di origine ibridogena.

I meccanismi di isolamento che determinano la *mortalità dell'ibrido* si verificano in conseguenza di uno squilibrio genotipico che provoca disturbi fisiologici gravi alla progenie ibrida oppure a seguito di uno scarso adattamento ecologico o etologico degli individui di origine ibridogena. In questo secondo caso la mortalità è dovuta al fatto che il genotipo dell'ibrido è meno adattato all'ambiente rispetto ai genotipi delle specie parentali. Pertanto, l'inferiorità ecologica o comportamentale dell'ibrido porta ad una riduzione delle sue possibilità di maturare sessualmente e di produrre una progenie.

In alcuni casi, gli zigoti ibridi possono svilupparsi e differenziarsi normalmente fino a raggiungere lo stadio adulto. Tuttavia, la maggior parte degli ibridi presenta un successo riproduttivo estremamente basso

e spesso è totalmente sterile. La *sterilità dell'ibrido* può essere parziale o assoluta e può essere determinata da molte differenti cause. Gli ibridi possono essere fisiologicamente incapaci di produrre gameti vitali o possono essere incapaci di riprodursi nonostante la formazione di gameti perfettamente funzionanti.

NILSSON (1983a) ha dimostrato che gli ibridi tra le orchidee *Platanthera bifolia* e *P. chlorantha* sono incapaci di riprodursi. Questa incapacità non dipende però da una intrinseca sterilità dell'ibrido ma dal fatto che la morfologia intermedia dei fiori dell'ibrido determina una difficoltà di adesione dei pollinodi al corpo degli impollinatori. In casi simili, quando cioè l'ibrido pur essendo sano e fertile, ha un successo riproduttivo (*fitness*) minore rispetto a quello dei parentali si parla di *insuccesso dell'ibrido*. Un ibrido formato dall'incrocio di specie con una biologia dell'impollinazione estremamente specializzata, ad esempio, può presentare caratteri fenotipici intermedi che quasi certamente non saranno adatti ad attirare alcun impollinatore. In questi casi, nonostante sia fertile, l'ibrido non riuscirà dunque a dare vita ad una progenie.

Molto spesso, gli ibridi sono invece sterili o scarsamente vitali. Queste tarde barriere postzigotiche, possono essere determinate da differenze cariotipiche che provocano problemi nell'appaiamento dei cromosomi durante la meiosi o dall'interazione disarmonica tra i geni dei due parentali.

La maggior parte delle specie animali e vegetali differiscono nel loro cariotipo (KING 1993) e pertanto molti autori hanno ipotizzato un importante ruolo dei cambiamenti cromosomici nei processi di speciazione. Questa idea trova anche sostegno nel fatto che i gruppi

che mostrano il più alto tasso di speciazione sono anche quelli con il più alto tasso di cambiamenti cromosomici (LEVIN e WILSON 1976; BUSH *et al.* 1977; BUSH 1981).

In letteratura, sono riportati molti esempi di sterilità e di mortalità dell'ibrido causati da riarrangiamenti cromosomici. *Lens culinaris* e *L. ervoides* sono due specie i cui cariotipi differiscono per una singola traslocazione. TADMOR *et al.* (1987) hanno osservato che gli ibridi con una vitalità del polline inferiore al 65% erano in eterozigosi per la traslocazione, laddove erano in omozigosi quelli con una vitalità pollinica superiore all'85%. Pertanto, la traslocazione cromosomica, in questo caso, rappresentava la barriera riproduttiva che manteneva isolate le due specie.

Come detto in precedenza, la sterilità e la mortalità dell'ibrido possono dipendere anche da un'incompatibilità genica tra le specie parentali. Il modello più ampiamente accettato è quello proposto da DOBZHANSKY (1937) e prevede che un gene di una specie interagisca negativamente con un gene di un'altra specie, causando sterilità o mortalità. Secondo WU e PALOPALI (1994), il gene responsabile della sterilità o della mortalità dell'ibrido agirebbe come una mutazione il cui effetto deleterio è soppresso da un altro gene all'interno della stessa specie. Quando però questo stesso gene interagisce con quello di un'altra specie, il suo effetto deleterio viene espresso. Evidenze di interazioni di geni nell'ibrido a seguito di incompatibilità tra le specie parentali provengono dalle analisi condotte su linee ibride sintetiche e su zone di ibridazione naturali tra le specie annuali *Helianthus annuus* e *H. petiolaris* (GARDNER *et al.* 2000; RIESEBERG *et al.* 1996). In generale

l'ibrido tra queste due specie mostra un successo riproduttivo minore a causa della sua ridotta fertilità. Nonostante il genoma delle due specie differisca per tre inversioni ed almeno sette traslocazioni, mappe genetiche basate sull'analisi di esperimenti di reincrocio degli ibridi indicano che, la maggior parte dei marcatori di *H. petiolaris* nelle regioni genomiche introgressano nel genoma di *H. annuus*, con una frequenza significativamente più bassa di quella attesa (RIESEBERG *et al.* 1996). Questo risultato suggerisce che i loci in queste regioni del genoma di *H. petiolaris* interagiscono negativamente con alcune componenti del genoma di *H. annuus*.

3. CRONOLOGIA DELL'ISOLAMENTO RIPRODUTTIVO

Il principale obiettivo degli studi sull'isolamento riproduttivo è quello di comprendere in che ordine siano comparse le diverse barriere che isolano tra loro le specie. In particolare, l'obiettivo è la comprensione di quali meccanismi di isolamento siano stati determinanti nelle fasi precoci della separazione tra due popolazioni precedentemente unite.

Determinare la cronologia dell'insorgenza dell'isolamento riproduttivo è estremamente difficile quando si prendono in esame singole coppie di specie. Nella maggior parte dei casi, infatti, queste coppie sono isolate attraverso molte diverse barriere che concorrono nel limitare il flusso genico. Valutare il ruolo attuale di tali barriere, può pertanto portare ad una sovrastima o ad una sottostima della loro reale

importanza storica. Le barriere attualmente più importanti infatti non hanno necessariamente sempre avuto un ruolo preminente.

Diversi approcci sono stati proposti per superare queste difficoltà. Alcuni autori hanno ipotizzato che, incentrare l'attenzione su coppie di specie il cui isolamento fosse determinato da un unico meccanismo, potesse consentire di superare questi ostacoli. Questo tipo di approccio è stato utilizzato molto spesso su specie di origine poliploide. Gli individui poliploidi presentano infatti fortissime barriere di tipo postzigotico (sterilità dell'ibrido) il che suggerisce che questo tipo di barriere possa aver giocato un ruolo molto importante nel processo di speciazione.

Un approccio di questo tipo, tuttavia, non è in grado di far luce su sistemi più complessi e non è capace di fornire un'immagine reale dei processi di speciazione ma anzi porta ad una inevitabile sovrastima dell'incidenza di meccanismi come la poliploidia.

Un altro approccio, proposto per cercare di fare luce sui meccanismi di isolamento che agiscono nelle prime fasi del processo speciativo, consisteva nello studio di sciami ibridi formati a seguito di disturbi di tipo ecologico. L'idea alla base di questa proposta era che, se la perdita di una barriera poteva indurre due popolazioni prima isolate a riunificare il loro *pool genico*, a quella barriera bisognava attribuire un ruolo preminente nel mantenimento e probabilmente anche nella formazione dei confini tra le specie. Questo approccio tuttavia non è risultato essere privo di controindicazioni. Innanzitutto, in particolare nelle piante, è molto complicato riconoscere con esattezza quali siano le barriere riproduttive influenzate da disturbi ecologici. Infatti,

l'isolamento ecologico, etologico e fenologico possono tutti essere determinati da disturbi ambientali. Inoltre, se è vero che la formazione di uno sciame ibrido a seguito di un disturbo ecologico è una prova dell'importanza di un determinato tipo di barriera, non è altrettanto vero che la mancata ibridazione sia una prova della scarsa importanza di quella barriera. La variazione delle condizioni ambientali infatti può portare due specie, isolate fenologicamente, a fiorire contemporaneamente; se queste specie continuano a conservare la loro integrità in seguito a tale cambiamento però, questo non significa che l'isolamento fenologico non sia stato importante nella fase di speciazione ma indica soltanto che altre barriere, che possono essersi evolute successivamente, sono adesso sufficienti a prevenire l'ibridazione. A dispetto di queste controindicazioni, questo approccio presenta il vantaggio che, nelle piante, frequentemente l'ibridazione avviene a seguito di un disturbo dell'habitat (STEBBINS 1950). Un esempio classico di questo fenomeno riguarda due popolazioni di *Iris fulva* ed *I. hexagona* lungo il delta del Mississippi. In questa zona, le due specie sono isolate attraverso adattamenti ecologici ad habitat differenti. Tuttavia, in seguito al disturbo ecologico causato dall'agricoltura, esse formano un massiccio sciame ibrido suggerendo che l'isolamento dell'habitat possa aver avuto un ruolo importante nella divergenza di queste due specie (RILEY 1938; ANDERSON 1949; ARNOLD E BENNET 1993).

Sebbene studi condotti con questi approcci possano fornire utili indicazioni sul tipo di barriera riproduttiva implicata in eventi di

speciazione individuali, essi non consentono di generalizzare le conclusioni all'interno di gruppi più ampi.

Per comprendere invece quale sia la forza evolutiva responsabile della radiazione di interi gruppi animali o vegetali è dunque necessario un approccio diverso. Negli ultimi venti anni, in seguito alle ricerche pionieristiche di COYNE ed ORR su *Drosophila* (1989), si è affermato un metodo di indagine sperimentale con un approccio di tipo comparativo. Tale metodo richiede la scelta di gruppi per i quali siano ben conosciute, sia la forza assoluta delle varie barriere riproduttive, sia il tempo relativo di divergenza tra le varie specie.

In assenza di testimonianze fossili, il tempo di divergenza tra le specie può essere stimato attraverso il cosiddetto *orologio molecolare* (GRAUR e LI 2000). Le differenze che si riscontrano nelle sequenze di DNA infatti sono dovute a mutazioni casuali che si verificano con una frequenza nota. Conoscendo tale frequenza e conoscendo il numero delle mutazioni in un determinato tratto di DNA rispetto alla sequenza che si ritiene ancestrale, è possibile stabilire la quantità di tempo che è stata necessaria affinché quel dato insieme di mutazioni si accumulassero. Tale tempo dunque rappresenta il tempo di divergenza tra i taxa considerati. WILSON *et al.* (1974) misurarono la distanza immunologica tra albumine in 31 coppie di specie di mammifero ed in 50 coppie di specie di rane, con i rappresentanti di ciascuna coppia capaci di produrre ibridi vitali. Essi trovarono che, mentre nei mammiferi capaci di dare ibridi, la distanza immunologica equivaleva allo 0,6%, le rane potevano produrre ibridi fino a quando la loro distanza immunologica raggiungeva il 7,4%. Questo dato fu assunto

come prova del fatto che l'isolamento postzigotico tra specie di mammiferi evolve più rapidamente che tra specie di rane.

Dati più completi relativi all'evoluzione dell'isolamento riproduttivo provengono da studi condotti all'interno di singoli gruppi. Tali studi sono stati condotti nella maggior parte dei casi su modelli animali.

COYNE ed ORR (1989, 1997) hanno analizzato 171 coppie di specie di *Drosophila* per le quali erano note informazioni relative almeno ad una delle tre forme di isolamento presenti (isolamento preriproduttivo, sterilità dell'ibrido e mortalità dell'ibrido). All'interno di questo gruppo erano anche note informazioni relative alla divergenza genetica tra le specie. Essi trovarono che l'isolamento riproduttivo, sia pre che postzigotico, era correlato con la distanza genetica e cioè con il tempo di divergenza tra le specie. Analizzando solo coppie di specie separatesi da meno tempo (distanza genetica $< 0,5$), essi trovarono che l'isolamento comportamentale (prezigotico) era significativamente più alto dell'isolamento postzigotico. In questo modo, essi riuscirono dunque a dimostrare che, in *Drosophila*, l'evoluzione dell'isolamento comportamentale precede quella dell'isolamento postzigotico. Inoltre essi testarono la presenza di differenze nei patterns di evoluzione dell'isolamento in condizioni di allopatria e di simpatria per verificare la presenza di meccanismi di *reinforcement* simpatico dell'isolamento riproduttivo.

I loro risultati dimostrarono che, i taxa simpatici in *Drosophila*, sviluppano meccanismi di isolamento comportamentale significativamente prima rispetto a quelli allopatrici. Infine,

combinando assieme sia i dati sull'isolamento prezigotico che quelli sull'isolamento postzigotico essi stimarono la velocità evolutiva dell'isolamento riproduttivo (*tempo di speciazione*). Essi dunque, utilizzando l'orologio molecolare, calcolarono che un grado di isolamento del 90% evolveva in circa 1,1 milioni di anni per i taxa allopatrici ed in circa 0,1 milioni di anni in quelli simpatrici. Questa grande differenza nella velocità di speciazione tra taxa allopatrici e simpatrici era dovuta alla maggiore velocità di evoluzione dell'isolamento comportamentale. D'altra parte, alcune forme di isolamento, come quello gametico o quello ecologico, rinforzati dalla competizione in condizioni di simpatria, possono non evolvere tra taxa allopatrici e, tra taxa simpatrici molto isolati, forme addizionali di isolamento riproduttivo possono comparire, dopo che la speciazione è completa, per prevenire la perdita di gameti o la competizione con la prole ibrida (*reinforcement*).

Diversi studi sono stati condotti con questo metodo su altri taxa animali ma tutti si sono limitati ad esaminare solo l'isolamento postzigotico (*SASA et al.* 1998; *PRESGRAVES* 2002; *PRICE* e *BOUVIER* 2002; *RUSSELL* 2003).

SASA et al. (1998) hanno analizzato le relazioni tra la distanza genetica ed i meccanismi di isolamento postzigotici in 46 specie di rane. Anche in questo caso i ricercatori hanno trovato una correlazione positiva tra isolamento e distanza genetica. Sebbene questo studio non prenda in esame l'isolamento prezigotico, altri lavori condotti sulle rane suggeriscono che anche in questo gruppo, l'isolamento prezigotico

(fenologico ed ecologico) possono precedere l'evoluzione dell'isolamento postzigotico (HILLIS 1981).

PRESGRAVES (2002) ha analizzato i patterns di isolamento postzigotico nei lepidotteri. Anche in questo gruppo, l'isolamento postzigotico è risultato essere positivamente correlato con la distanza genetica. Inoltre, un'analisi comparativa della velocità evolutiva di questo tipo di isolamento, ha consentito di dimostrare che nei lepidotteri i meccanismi postzigotici compaiono più rapidamente rispetto a quanto avviene nelle rane ed in *Drosophila*.

Negli uccelli, PRICE e BOUVIER (2002) hanno osservato che il processo di speciazione si conclude molto prima dell'evoluzione delle barriere postzigotiche. Questo dato suggerisce che la speciazione negli uccelli, così come in *Drosophila* e nelle rane, sia dovuta soprattutto all'isolamento prezigotico, mentre l'isolamento postzigotico compare solo in un secondo momento (PRICE e BOUVIER 2002).

Nel solo studio effettuato sulle piante, MOYLE *et al.* (2004) hanno comparato l'evoluzione dell'isolamento pre e postzigotico in 3 generi di angiosperme: *Glycine*, *Silene* e *Streptanthus*. Anche nelle piante l'isolamento, sia pre che postzigotico, aumenta con il tempo di divergenza tra le specie anche se i dati sono in parte contraddittori. Inoltre, la distanza genetica associata con l'isolamento riproduttivo totale (come definito da COYNE ed ORR 1989) è risultata essere molto più bassa nelle piante che negli animali. Solo in un genere (*Glycine*) gli autori sono anche stati in grado di dimostrare che, al contrario di quanto osservato nei gruppi animali (COYNE ed ORR 1989; SASA *et al.* 1998), l'isolamento postzigotico evolve più rapidamente rispetto a

quello prezigotico. In questo studio si è anche testata la differenza nei patterns di isolamento riproduttivo tra taxa simpatrici ed allopatrici e, a differenza di quanto osservato in *Drosophila*, in questi tre gruppi di angiosperme, non sono state trovate evidenze di *reinforcement*.

L'approccio metodologico proposto da COYNE ed ORR (1989) ha dunque consentito notevoli passi in avanti nella comprensione dei patterns evolutivi dell'isolamento riproduttivo. Innanzitutto, si è potuto osservare che le barriere postzigotiche (sterilità e mortalità dell'ibrido) evolvono gradualmente con l'aumentare della divergenza tra le specie. Tra i diversi meccanismi postzigotici, inoltre, si è potuto osservare che la sterilità dell'ibrido evolve prima della mortalità dell'ibrido (COYNE ed ORR 1997; WU 1992; PRESGRAVES 2002; RUSSELL 2003). Inoltre il confronto tra i risultati ottenuti nei diversi gruppi ha anche consentito di osservare come il ritmo con il quale l'isolamento riproduttivo evolve, non sia costante. Ad esempio, la mortalità dell'ibrido evolve più velocemente nelle rane e in *Drosophila* e più lentamente nei lepidotteri e negli uccelli (LIJTMAYER *et al.* 2003).

Queste disparità non sorprendono se si considerano le diverse forze evolutive che agiscono su ognuno di questi gruppi.

Sfortunatamente invece, la mancanza di informazioni sull'isolamento sessuale in gruppi al di fuori di *Drosophila*, non ci consente di testare la generalità delle conclusioni di COYNE ed ORR rispetto all'esistenza del *reinforcement*.

Tutti questi risultati dimostrano la validità di un approccio che, utilizzando un contesto filogenetico, esamina l'isolamento all'interno di interi gruppi biologici. Tuttavia, per generalizzare i dati ottenuti finora e

per comprendere la reale incidenza delle varie forme di isolamento è necessario espandere le indagini ad altri gruppi animali ma soprattutto vegetali.

4 IBRIDAZIONE

La rottura delle barriere riproduttive responsabili della formazione e della differenziazione delle specie è un fenomeno abbastanza comune in natura e determina un rimescolamento dei pool genici delle specie parentali.

Nel regno animale, come detto in precedenza, l'ibridazione è spesso impedita da meccanismi di isolamento riproduttivo che prevengono l'accoppiamento tra individui appartenenti a specie diverse. Nel regno vegetale invece, l'incontro tra gameti di specie diverse è un fenomeno molto più comune e l'ibridazione è generalmente evitata grazie a meccanismi di isolamento postimpollinazione.

L'idea che gli ibridi fossero sempre caratterizzati da bassi livelli di fertilità e di vitalità ha portato per lungo tempo ad una sottovalutazione del ruolo evolutivo dell'ibridazione (*MAYR* 1963, 1992; *WAGNER* 1969, 1970; *BARTON* ed *HEWITT* 1985). Ciononostante, molti dati di letteratura suggeriscono un importante ruolo di tale fenomeno nei processi di speciazione. Secondo alcuni autori, particolarmente quelli di estrazione zoologica, l'ibridazione costituirebbe una sorta di *rumore di fondo* nei processi di speciazione (*MAYR* 1992; *SCHEMSKE* 2000). Secondo altri, di estrazione botanica, l'ibridazione potrebbe invece aver svolto un'importante funzione evolutiva e potrebbe aver giocato un

ruolo determinante in molti casi di speciazione (*ANDERSON* 1949; *ARNOLD* 1997; *RIESEBERG* e *CARNEY* 1998; *RIESEBERG et al.* 2003). Si ritiene, infatti, che molte specie vegetali possano essere di origine ibridogena (*ELLSTRAND et al.* 1996; *RIESEBERG* 1997) e secondo alcune stime (*STACE* 1987), sembra che il 50-70% delle angiosperme attualmente esistenti possa essersi originato in seguito ad ibridazione.

Le conseguenze evolutive dell'ibridazione possono essere molteplici (*STEBBINS* 1959) e molte ricerche sono state condotte con lo scopo di comprendere i possibili scenari evolutivi che eventi di ibridazione possono produrre.

L'introggressione, descritta *ANDERSON* ed *HUBRICHT* (1938) come il principale risultato dell'ibridazione, è stata anche definita come l'incorporazione di materiale genetico, proveniente da una specie, nel pool genico di un'altra. Questo fenomeno naturale può portare alla fusione delle specie parentali (*disintegrazione genetica*; *O'BRIEN* e *MAYR* 1991), ma può anche favorire gli incontri conspecifici ed incrementare l'isolamento riproduttivo (*reinforcement*; *HOWARD* 1986). Inoltre, l'introggressione può consentire il trasferimento di materiale genetico tra le specie, facilitando potenzialmente l'evoluzione adattativa e di conseguenza la formazione di una nuova specie, il cui genotipo è capace di colonizzare nuovi habitat (*LEWONTIN* e *BIRCH* 1966).

In casi di introggressione molto spinta, i geni possono muoversi attraverso i confini che delimitano le specie parentali. *ANDERSON* (1949) è stato il primo a comprendere la funzione degli ibridi di ponte per lo scambio di caratteri adattativi tra le specie. Più recentemente, *MARTINSEN et al.* (2001), hanno suggerito che gli ibridi possano agire

come un filtro evolutivo, lasciando passare solo geni vantaggiosi e prevenendo l'introggressione di quelli negativi. Il processo di introggressione di caratteri adattativi sembra pertanto essere il principale contributo evolutivo dell'ibridazione nelle piante (ANDERSON 1949; LEWONTIN e BIRCH 1966).

La potenziale funzione *creativa* dell'ibridazione dipende tuttavia, in modo determinante, dal successo riproduttivo dell'ibrido (ARNOLD ed HODGES 1995). Come abbiamo visto, la fitness degli ibridi può essere influenzata sia da una fattori endogeni (mortalità o incapacità fisiologica di produrre gameti fertili) che da fattori esogeni (scarso adattamento all'ambiente e basso tasso di impollinazione).

In generale, la maggior parte degli ibridi, anche se capace di produrre una prole fertile, mostra un successo riproduttivo più basso rispetto a quello delle specie parentali. Il genotipo ibrido è infatti il risultato della fusione dei genotipi delle specie parentali e pertanto non ha subito l'azione adattativa della selezione naturale. Tuttavia, occasionalmente, il genotipo ricombinante può essere in grado di adattarsi meglio dei parentali ad alcuni ambienti (ANDERSON 1948; MOORE 1977; ARNOLD 1997).

In generale, si ritiene che la vitalità e la fertilità degli ibridi di prima generazione siano più basse di quelle dei parentali a causa della rottura dell'associazione genica tra loci coinvolti nell'adattamento (DOBZHANSKY 1937). Questa ipotesi è stata confermata soprattutto per le specie che presentano forti barriere postimpollinazione ed è stata verificata in *Helianthus* (HEISER 1947), *Layia* (CLAUSEN 1951), *Gilia* (GRANT 1966) ed *Oryza* (LI *et al.* 1997).

Il fatto che generalmente gli ibridi mostrino un basso successo riproduttivo, tuttavia, non esclude la possibilità che alcuni genotipi ibridi possano avere una fitness uguale o maggiore di quella delle specie parentali. Recenti lavori hanno descritto situazioni nelle quali una piccola quantità di individui di origine ibridogena erano in grado di superare il successo riproduttivo delle specie parentali nel loro stesso ambiente (BARTON 2001).

Una significativa associazione genotipo-ambiente è stata osservata in sciami di ibridi che si ritrovavano in ambienti diversi da quelli dei parentali. Presumibilmente ciò indica che ci possa essere una selezione positiva per il genotipo ibrido quando si trova in un ambiente ad esso favorevole (STEBBINS e DALY 1961; POTTS e REID 1985; CRUZAN ed ARNOLD 1993, 1994; ARNOLD 1997). In questo caso, dunque, l'ibrido può occupare una differente nicchia ecologica e generare una nuova linea evolutiva.

Da quanto detto, appare chiaro che l'ibridazione può rappresentare un'importante forza evolutiva nel regno vegetale (RIESEBERG 1997), e pertanto le zone di ibridazione sono state utilizzate da molti ricercatori per studiare il processo della speciazione (BARTON e HEWITT 1985; BURKE ed ARNOLD 2001; RIESEBERG *et al.* 2002).

Fino a pochi anni fa, lo studio delle zone di ibridazione e la stima degli effetti dell'introggressione in popolazioni naturali, basandosi esclusivamente su analisi morfometriche, non avevano prodotto risultati significativi. Recentemente, invece, l'applicazione di marcatori molecolari genetici ha notevolmente facilitato gli studi sull'ibridazione e

sull'introggressione consentendo alla ricerca di fare notevoli avanzamenti nella comprensione dell'architettura genetica delle zone di ibridazione.

5 MODELLI DI SPECIAZIONE

Gli studi volti a chiarire l'incidenza ed i patterns evolutivi dei meccanismi di isolamento riproduttivo mirano a comprendere le modalità con cui si attua il processo di speciazione e cioè l'insieme di eventi attraverso i quali da una specie madre si originano due o più specie figlie o, come nel caso dell'ibridazione, da due specie si origina una specie figlia.

Tra tutte le controversie che hanno caratterizzato il dibattito sulla speciazione, la più affascinante è quella che riguarda la sua biogeografia. In generale, si tende a classificare il processo di speciazione in base alla presenza o all'assenza di flusso genico tra popolazioni all'inizio della loro divergenza. In altri termini si tende a fare una distinzione tra i processi speciativi che avvengono in *simpatria* rispetto a quelli che avvengono tra popolazioni totalmente (*allopatria*) o parzialmente (*parapatria*) separate tra loro (COYNE ed ORR 2004).

Si parla di *speciazione allopatrica*, quando gruppi di individui vengono a trovarsi isolati geograficamente a causa di una qualche barriera geografica. La separazione fisica, interrompendo lo scambio genico tra le due popolazioni, fa sì che i fattori che modificano la frequenza genica (*selezione naturale* e *deriva genetica*) operino in modo indipendente. Pertanto se due popolazioni separate da una barriera,

sono sottoposte a pressioni ambientali diverse o se esse sono abbastanza piccole da subire deriva genetica, potranno accumularsi tra esse differenze genetiche notevoli.

La divergenza genetica in allopatria si determina anche in conseguenza di mutazioni casuali che, accumulandosi gradualmente, possono portare due specie ad isolarsi anche in assenza di selezione divergente o di deriva genetica. L'accumulo di tali mutazioni è, tuttavia, un processo molto lento e, conseguentemente, la separazione geografica, in assenza di altre forze evolutive, porta ad eventi di speciazione solo se è molto prolungata nel tempo.

Quando la barriera fisica responsabile della separazione viene meno, gli individui delle due popolazioni possono essere incapaci di reincrociarsi e possono dunque aver completato il processo di speciazione. In altri casi, tuttavia, l'isolamento riproduttivo non viene raggiunto in modo completo nel corso dell'isolamento geografico e le due popolazioni una volta in contatto possono subire una forte selezione verso l'evoluzione di meccanismi di isolamento che consentano di risparmiare gameti e di evitare la competizione con gli ibridi in condizioni di simpatria (*reinforcement*).

Vari evoluzionisti ritengono che l'isolamento geografico sia responsabile della maggior parte dei casi di speciazione, soprattutto all'interno del regno animale.

La possibilità che un evento di speciazione possa avvenire in presenza di flusso genico è stata oggetto di intenso dibattito.

Attualmente tale possibilità è quasi universalmente accettata, ma gli esempi di *speciazione simpatica* sono ancora pochi e spesso controversi.

In generale, si ritiene che la *speciazione simpatica* rappresenti un modello di speciazione istantaneo a differenza di quella allopatrica che è, invece, più graduale. Per consentire l'interruzione del flusso genico tra organismi che occupano lo stesso habitat, è infatti ritenuto necessario un evento evolutivo puntuale che determini l'instaurarsi dell'isolamento riproduttivo. Un evento di questo tipo può essere rappresentato dall'ibridazione che, come detto in precedenza, può portare a processi di speciazione. Inoltre, se una mutazione colpisce uno o più geni implicati nel processo riproduttivo di un individuo, questa può, in rari casi, determinare l'instaurarsi dell'isolamento riproduttivo e portare dunque ad un evento di speciazione.

Il primo tipo di speciazione simpatica ad essere stato universalmente accettato è quello dovuto ad aberrazioni cromosomiche (*speciazione per poliploidia*). La *poliploidia* consiste nell'acquisizione di copie multiple di cromosomi in conseguenza della mancata divisione meiotica. Quasi tutte le piante e gli animali sono diploidi, avendo cromosomi appaiati. Può capitare, però, soprattutto nel regno vegetale, che, una cellula uovo fecondata, duplichi i suoi cromosomi e non si divida in due cellule figlie portando alla formazione di una cellula tetraploide. Gli individui tetraploidi sono di norma perfettamente in grado di portare a termine la meiosi per formare gameti vitali. Tuttavia, se i gameti maschili di una pianta tetraploide fecondano una cellula uovo di un individuo diploide, ne risulta una progenie triploide che,

all'atto della divisione meiotica, non riuscirà ad accoppiare tutti i suoi cromosomi, essendo questi in numero dispari (tre). La meiosi pertanto fallisce, i gameti non si formano correttamente e, conseguentemente, gli ibridi triploidi risultano sterili. L'individuo tetraploide è perciò riproduttivamente isolato dal suo progenitore diploide ma può incrociarsi con altri individui dello stesso tipo oppure, se è in grado di autofecondarsi o moltiplicarsi per via asessuale, può comunque riprodursi e fondare così una nuova specie.

La presenza di questi tipi di speciazione simpatica (per mutazione, per ibridazione e per poliploidia) sono oggi ampiamente accettati. Quello che è invece ancora oggetto di dibattito è la possibilità che la speciazione in presenza di un libero flusso genico possa essere causato da una selezione divergente. Di questo tipo di speciazione simpatica, allo stato attuale, non esistono infatti prove definitive.

La *speciazione parapatrica* rappresenta una via di mezzo tra quella allopatrica e quella simpatica. In effetti si definisce parapatrico un evento di speciazione che avviene tra popolazioni che scambiano flusso genico ma non liberamente.

Dal punto di vista della genetica di popolazione, la *speciazione parapatrica* ha maggiore probabilità di avvenire rispetto a quella simpatica. Secondo la genetica di popolazione infatti le popolazioni possono divergere attraverso l'adattamento a condizioni locali soprattutto se contemporaneamente esiste un flusso genico limitato (HALDANE 1948; SLATKIN 1973). Sembra probabile che l'isolamento riproduttivo, specialmente di tipo ecologico, possa evolvere tra

popolazioni che scambiano migranti. Infatti, per ogni livello di ibridazione, esiste un valore limite di selezione o di deriva genetica che può annullare l'azione di rimescolamento di questo flusso genico e consentire un evento di speciazione.

La speciazione paraptrica, al contrario di quella allopatrica, non richiede la presenza di una barriera totalmente impermeabile ma semplicemente una riduzione di flusso genico unito a differenti condizioni ambientali tra le popolazioni.

Il primo a proporre un tale modello di speciazione fu *FISHER* (1930), il quale definì la possibilità che l'adattamento a condizioni ambientali locali, potesse favorire la selezione di un basso livello di flusso genico prevenendo il movimento di individui verso aree nelle quali i loro geni siano poco adattati. Questo modello teorico trovò poi successivamente una conferma matematica negli studi di *BALKAU* e *FELDMAN* (1973).

6 LA FAMIGLIA DELLE ORCHIDACEAE

La famiglia delle Orchidaceae è la seconda per numero di specie all'interno del regno vegetale. Sono infatti almeno 20.000 le specie fino ad oggi attribuite a questa grande famiglia. Le orchidee sono oggetto di particolare interesse, sia per gli scienziati che per i semplici appassionati, a causa della loro straordinaria variabilità morfologica e biologica.

La famiglia delle Orchidaceae ha colonizzato tutte le terre emerse ad eccezione dei deserti ed è riuscita ad adattarsi alle più svariate condizioni ambientali.

Nella regione mediterranea, sono presenti più di 200 specie appartenenti a questa famiglia. Adattandosi alle condizioni locali, le orchidee che occupano questa regione, sono piante erbacee perenni con apparati sotterranei attraverso i quali riescono a superare la stagione secca.

L'alta variabilità delle strutture fiorali di questa famiglia sembra essere determinata da tre caratteristiche morfologiche fondamentali che ne distinguono il fiore da quello delle altre famiglie: un tepalo modificato, detto *labello*, con funzioni vessillari; gli organi maschili e femminili fusi all'interno del fiore a formare una struttura, detta *ginostemio*; la presenza di un unico stame residuo formato da un'antera con due sacchi pollinici contenenti i granuli di polline agglutinati a formare due masse compatte claviformi dette *pollinodi*.

Queste profonde modificazioni della struttura fiorale sembrano essere alla base della straordinaria varietà dei meccanismi di impollinazione delle orchidee (DRESSLER 1993). I fiori delle orchidee, infatti, sono altamente specializzati nell'attrazione degli insetti, ed hanno stabilito con essi intricate interazioni.

La variabilità nella morfologia fiorale riflette, dunque, l'importanza degli insetti nell'evoluzione delle orchidee ed ha fatto ipotizzare che le interazioni pianta-impollinatore siano la forza evolutiva responsabile della straordinaria diversificazione di questo gruppo di piante.

Oltre a questa straordinaria variabilità florale, le orchidee hanno evoluto interessanti strategie anche in altri aspetti della loro biologia. I frutti delle orchidee, ad esempio, producono moltissimi semi di piccole dimensioni che vengono dispersi dal vento anche su grandi distanze. Essendo praticamente privi di endosperma, tali semi hanno bisogno di instaurare una relazione simbiotica con dei funghi presenti nel terreno senza i quali la loro germinazione è impossibile.

6.1 IMPOLLINAZIONE ED ISOLAMENTO NELLE ORCHIDEE

I primi studiosi ad individuare negli insetti i vettori del polline delle orchidee furono *SPRENGEL* (1793) e *BROWN* (1831). Da allora sono stati osservati e descritti numerosissimi adattamenti di questi fiori e dei loro impollinatori. La grande diversità di questo gruppo di piante è stata spesso spiegata con le strette ed intricate interazioni che esse hanno evoluto nei confronti dei loro impollinatori e la specificità dell'impollinazione è stata considerata il principale meccanismo di isolamento riproduttivo tra le specie di orchidee (*GILL* 1989; *VAN DER PIJL* e *DODSON* 1966; *DRESSLER* 1993). In effetti, sulla base dei dati disponibili in letteratura, è stato stimato che il 60–70% delle orchidee è impollinato in modo altamente specie-specifico (*TREMBLAY et al.* 2005). Questa stima si riferisce, nella maggior parte dei casi, ad orchidee tropicali che offrono una ricompensa ai loro impollinatori, stabilendo con essi un rapporto di reciproco vantaggio (*TREMBLAY* 1992). La ricompensa offerta dalle orchidee è, generalmente, di tipo nutrizionale ed è costituita da soluzioni zuccherine o, in rari casi, da oli (*VÖGEL*

1974; STEINER 1989), da polline (GREGG 1991; KORYAN ed ENDRESS 2001) o da pseudopolline (DODSON e FRYMIRE 1961; GOSS 1977; DAVIES *et al.* 2000). In letteratura, sono anche descritte orchidee che producono sostanze cerose o resinose che sono collezionate da vespe ed api presumibilmente per la costruzione dei loro nidi (BRAGA 1977).

Tuttavia, molte specie di orchidee, contrariamente alle precedenti, non producono alcun tipo di ricompensa ed attirano i loro impollinatori attraverso strategie basate sull'inganno. Strategie simili si sono evolute in diversi gruppi di angiosperme, ma generalmente sono sempre limitate a poche specie per famiglia. Al contrario, circa un terzo delle Orchidaceae e la maggior parte di quelle presenti nella regione mediterranea, ha evoluto strategie riproduttive basate sull'inganno degli insetti impollinatori (ACKERMAN 1986) ed allo stato attuale, non è ancora del tutto chiaro quale sia il livello di specificità di questi tipi di strategia.

L'inganno sessuale rappresenta, senza dubbio, la strategia meglio studiata. Tra le orchidee della regione mediterranea, questa strategia si è evoluta nelle specie appartenenti al genere *Ophrys* ed, indipendentemente, in due specie appartenenti ai generi *Anacamptis* ed *Orchis*. I fiori di queste specie attuano una elaborata mimesi, sia visiva che olfattiva, delle femmine degli insetti dai quali sono impollinate ed attirano pertanto i maschi che tentano di riprodursi (SCHIESTL *et al.* 1999). Questa strategia altamente specie-specifica consente alle specie che la adottano di trovarsi in condizioni di simpatria senza condividere gli impollinatori e pertanto limita il flusso genico interspecifico e l'ibridazione ai soli rari casi di errore da parte degli insetti. In queste

orchidee, dunque, l'idea che l'integrità delle specie sia mantenuta grazie alla specializzazione dei meccanismi di impollinazione trova conferma anche in un gruppo nel quale si è sviluppata una strategia di inganno.

Tuttavia, non è ancora chiaro se l'alta specificità dell'impollinazione sia la regola o l'eccezione nelle orchidee prive di nettare. In larga parte questo è dovuto alle non ancora esaustive conoscenze sulla specificità dei rapporti orchidea-insetto nelle specie che adottano una strategia di inganno basata sulla mimesi alimentare. Questa è la più diffusa tra le strategie di inganno e le orchidee che la adottano possono attrarre in maniera poco selettiva differenti specie di impollinatori (NILSSON 1992; DAFNI 1987). La mimesi alimentare può essere sia specializzata che generalizzata e può cioè consistere in una mimesi di una specie nettarifera oppure in una mimesi generalizzata di caratteristiche tipiche di specie nettarifere. Nel primo caso, se due specie imitano due differenti specie nettarifere che a loro volta attraggono distinti impollinatori allora esse possono crescere in simpatria senza incorrere nella formazione di ibridi. Nel secondo caso, invece, le coppie di specie possono condividere gli impollinatori e di conseguenza possono andare incontro a fenomeni di ibridazione e di introgressione.

Nelle orchidee mediterranee, sono stati documentati solo pochi casi di uno stretto rapporto con una singola pianta nettarifera come modello (DAFNI ed IVRY 1981; VÖTH 1982; VAN DER CINGEL 1995). Questa strategia di impollinazione in cui una specie non nettarifera imita una specie nettarifera è un esempio di *mimetismo Batesiano* (DAFNI 1984, 1987; ROY e WIDMER 1999). Forti evidenze dell'esistenza di

questo tipo di strategia sono state trovate in *Orchis israelitica* i cui fiori hanno come modello la liliacea *Bellevalia flexuosa* (DAFNI ed IVRY 1981; GALIZIA *et al.* 2005). In questo caso si è notato che la presenza del modello determina un aumento del successo riproduttivo dell'orchidea (DAFNI ed IVRY 1981). La maggior parte delle orchidee mediterranee con mimesi alimentare, tuttavia, attira ed inganna soprattutto impollinatori inesperti attraverso una mimesi generalizzata (DAFNI 1987; NILSSON 1992). Gli impollinatori di queste orchidee sono dotati di forme di apprendimento associativo tali da consentirgli di discriminare tra fiori con ricompensa e fiori privi di ricompensa. Questa capacità degli insetti ha portato le orchidee, che adottano questa strategia riproduttiva, a sincronizzare il periodo di fioritura con quello in cui gli insetti emergono. In questo modo il successo riproduttivo della pianta è garantito dall'inesperienza dei pronubi che non hanno ancora imparato a distinguere i fiori nettariiferi da quelli privi di nettare.

I dati di letteratura disponibili (NILSSON 1980, 1983*b*, 1984) riportano per queste specie un relativamente grande numero di impollinatori appartenenti a diverse specie ed il confronto di questi dati (VAN DER CINGEL 1995 e referenze in esso contenute) mostra chiaramente che esiste una sovrapposizione nel set di impollinatori di queste specie di orchidee. Inoltre, recentemente, l'applicazione di marcatori molecolari e di metodologie di microscopia elettronica (SEM) all'identificazione di pollinodi ritrovati sugli insetti ha confermato chiaramente che, anche in condizioni di simpatria, gli impollinatori sono condivisi tra le differenti specie (WIDMER *et al.* 2000; COZZOLINO *et al.* 2005). Pertanto, nella maggior parte delle specie, la

mimesi alimentare rappresenta un metodo di impollinazione poco specifico che non previene il rischio di un errato trasporto di polline tra differenti specie che vivono in simpatria e che hanno una sovrapposizione del periodo di fioritura.

La frequente e ben documentata ibridazione tra queste specie (*WILLING e WILLING 1977; 1985*) può essere dunque spiegata con la continua condivisione di impollinatori e non con un occasionale errore da parte dell'insetto, al contrario di ciò che avviene nelle specie che adottano la mimesi sessuale (*SOLIVA e WIDMER 2003*). Tuttavia, anche se sono state descritte moltissime combinazioni di ibridi, vere e proprie zone di ibridazione sono sorprendentemente rare (*DAFNI 1987*) e sono tipicamente costituite da uno o pochi individui di origine ibridogena di generazioni precoci (*PELLEGRINO et al. 2000a; 2005a*) e scarsamente fertili (*D'EMERICO et al. 1996*), suggerendo la presenza di meccanismi di isolamento riproduttivo che agiscano successivamente all'impollinazione.

Recentemente, un'analisi comparativa delle differenze cariotipiche ha mostrato che le specie che presentano una sovrapposizione nel set di impollinatori hanno cariotipi significativamente più divergenti rispetto alle specie che, essendo impollinate da specifici impollinatori, non presentano tale sovrapposizione (*COZZOLINO et al. 2004*). Queste differenze cariotipiche, causate da riarrangiamenti cromosomici, possono influenzare l'appaiamento dei cromosomi e possono dunque portare ad una anomala segregazione o ricombinazione durante la meiosi nella progenie ibrida (*D'EMERICO et al. 1996; RIESEBERG 2001*). Questi risultati concordano e forse spiegano l'osservato basso successo

riproduttivo degli ibridi (D'EMERICO *et al.* 1996; PEAKALL *et al.* 1997) ed indicano che nelle orchidee che adottano l'inganno alimentare, nelle quali la specificità degli impollinatori è debole o assente, possono esistere tarde barriere riproduttive postzigotiche (COZZOLINO *et al.* 2004).

Un altro gruppo di orchidee mediterranee prive di nettare ha evoluto una diversa strategia di attrazione. Le specie appartenenti al genere *Serapias*, infatti, hanno fiori tubulari che vengono utilizzati dagli insetti come rifugio (DAFNI *et al.* 1981). E' stato dimostrato che all'interno del fiore esistono temperature di vari gradi più alte rispetto all'esterno (FELICOLI *et al.* 1998) e numerosi insetti sono stati ritrovati all'interno di questi fiori in una situazione di riposo (VAN DER CINGEL 1995). Per lungo tempo, si è ritenuto che la forma e le dimensioni delle varie strutture floreali, selezionando gli insetti nell'ingresso ai fiori, potessero limitare o impedire il flusso genico tra le specie simpatriche di *Serapias*. Tuttavia le strutture floreali di queste orchidee mostrano un'elevata variabilità intra ed interspecifica che ha suggerito che i confini tra queste specie fossero poco definiti (BATEMAN *et al.* 2003; PRIDGEON *et al.* 1997).

Recentemente in uno studio condotto su alcune specie appartenenti a questo gruppo, PELLEGRINO *et al.* (2005b) hanno trovato un alto polimorfismo nei microsatelliti che suggeriva una buona differenziazione tra le specie studiate. Tali risultati lasciano aperta la questione riguardante la specificità dell'impollinazione e l'isolamento riproduttivo in questo interessante gruppo di orchidee mediterranee.

In conclusione, il mantenimento dei confini tra le specie e la limitazione del flusso genico interspecifico nelle orchidee mediterranee prive di nettare appare più complessa rispetto all'opinione generale che attribuisce alla specificità dell'impollinazione un ruolo quasi esclusivo. In tale contesto, si ripropone la necessità di studi più dettagliati che chiariscano l'entità della sovrapposizione degli impollinatori tra queste specie di orchidee e di test sperimentali che valutino l'effettivo ruolo dei meccanismi di isolamento che agiscono dopo l'impollinazione. Solo combinando questi approcci si potrà stabilire in maniera definitiva l'importanza relativa delle barriere preimpollinazione mediate dagli impollinatori rispetto a quelle postimpollinazione nelle orchidee.

6.2 IBRIDAZIONE E SPECIAZIONE NELLE ORCHIDEE

L'ibridazione naturale nelle orchidee mediterranee è ampiamente documentata in letteratura. L'eccezionale numero di ibridi ritrovati, anche se spesso risultanti da segnalazioni amatoriali che possono aver sovrastimato il loro reale numero, confermano una relativa riduzione della specificità d'impollinazione nell'ambiente mediterraneo.

Allo stesso tempo a causa del ruolo centrale dell'ibridazione nella formazione delle specie all'interno del regno vegetale (*RIESEBERG* 1997) è stato suggerito che la notevole frequenza degli eventi di ibridazione possa aver giocato un ruolo rilevante nei processi di speciazione delle orchidee mediterranee e possa aver fornito ulteriori stimoli alla diversificazione di questo gruppo (*STEBBINS* e *FERLAN* 1956; *VAN DER PIJL* e *DODSON* 1966; *EHRENDORFER* 1980).

Tuttavia, a dispetto del grande numero di segnalazioni di ibridi, sono pochi gli studi che hanno analizzato, in maniera approfondita, le zone di ibridazione tra orchidee e che hanno tentato di chiarire se l'ibridazione in questo gruppo di piante possa determinare la formazione di nuove specie.

In particolare la struttura genetica delle zone di ibridazione può fornire importanti informazioni su come agisce la selezione sul fenotipo ibrido e su quale sia il suo successo riproduttivo (*BURKE ed ARNOLD 2001*).

La stragrande maggioranza dei lavori che si riferiscono ad ibridi di orchidee sono semplici segnalazioni di ritrovamenti e forniscono una descrizione esclusivamente morfologica delle entità ibridogene. Inoltre, solo pochi lavori hanno analizzato un campione di individui ibridi sufficientemente grande. Questo è in parte dovuto al fatto che nonostante l'ibridazione tra le orchidee mediterranee sia un fenomeno relativamente comune, come detto in precedenza, le zone di ibridazione sono abbastanza rare e sono tipicamente costituite da pochi individui di origine ibridogena (*DAFNI 1984*).

Un primo tentativo di valutare l'ibridazione e l'introggressione tra due specie di orchidee è rappresentato dal lavoro di *STEBBINS e FERLAN (1956)*. Essi presero in esame gli ibridi prodotti da due specie appartenenti al genere *Ophrys* e notarono che la distribuzione delle caratteristiche morfologiche degli ibridi erano intermedie tra quelle delle specie parentali e potevano pertanto rappresentare ibridi di prima generazione. Una situazione opposta, invece, fu rilevata da *DAFNI e BAUMANN (1982)* che, analizzando, con lo stesso tipo di approccio una

popolazione ibrida di *Orchis caspia* ed *O. israelitica*, notarono che la maggior parte degli ibridi erano morfologicamente più vicini ad *O. caspia*.

Zone di ibridazione studiate in maniera più approfondita, e con l'ausilio di metodologie molecolari, sono quelle tra *Anacamptis morio* ed *A. papilionacea*. Queste due specie oltre a condividere lo stesso habitat, sono entrambe impollinate da individui maschi del genere *Eucera* e dunque, non sembrano possedere un isolamento prezigotico molto forte. Quando queste due specie si trovano in simpatria è molto facile ritrovare l'ibrido prodotto dal loro incrocio (*Anacamptis xgennari*). Analisi molecolari (basate sull'analisi di DNA ribosomiale e plastidiale) condotte su zone di ibridazione naturali hanno dimostrato chiaramente che l'ibridazione avviene in entrambe le direzioni (entrambe le specie contribuiscono cioè alla linea materna nella formazione dell'ibrido) ed anche che tutti gli individui ibridi sono di prima generazione (F_1) (ACETO *et al.* 1999). Sia le osservazioni di campo (fiori con pollinodi immaturi e capsule contenenti semi vuoti) che le analisi carilogiche (D'EMERICO *et al.* 1996), hanno rivelato che questi ibridi sono probabilmente sterili. *Anacamptis morio* ed *A. papilionacea* sono specie diploidi (rispettivamente $2n=36$ e $2n=32$). Gli ibridi normalmente hanno $2n=34$ e presentano un'elevata eteromorfia cromosomica ed un comportamento meiotico irregolare, suggerendo una ridotta omologia tra i genomi delle specie parentali (D'EMERICO *et al.* 1996). Simili risultati (formazione degli ibridi bidirezionale ed individui ibridi F_1), sono stati riscontrati anche in tre piccole popolazioni naturali di

Anacamptis xbornemanni ibrido tra *A. longicornu* (il taxon vicariante di *A. morio* in Sardegna) ed *A. papilionacea* (CAFASSO *et al.* 2001).

Un altro gruppo di specie nel quale è stato studiato il fenomeno dell'ibridazione è quello costituito da *Orchis mascula*, *O. pallens*, *O. pauciflora* ed *O. provincialis*. Tutte queste specie spesso condividono l'habitat, non presentano grandi differenze fenologiche ed attirano gli stessi insetti attraverso una mimesi alimentare determinata da una comune morfologia florale (lungo sperone, tepali esterni puntati verso l'esterno, labello trilobo con lobo mediano più lungo rispetto ai lobi laterali). I fiori di queste specie, tuttavia, presentano differenti colorazioni: giallo pallido in *Orchis pauciflora*, giallo intenso in *O. provincialis* ed *O. pallens* e viola in *O. mascula* (DELFORGE 1994). In due zone di ibridazione tra *O. mascula* subsp. *ichnusae* (sottospecie endemica della Sardegna) ed *O. provincialis* le analisi molecolari hanno dimostrato la bidirezionalità del flusso genico ed anche che, con poche eccezioni, la maggior parte degli ibridi sono di prima generazione. Dei 48 individui ibridi studiati, provenienti da due differenti zone di ibridazione, solo sei hanno mostrato una maggiore proporzione di DNA ribosomiale di una delle due specie parentali, suggerendo la possibilità della presenza di individui originatisi attraverso reincroci (PELLEGRINO *et al.* 2005a).

Risultati simili sono stati ottenuti da PELLEGRINO *et al.* (2000b) analizzando una zona di ibridazione dell'Italia meridionale tra *Orchis mascula* ed *O. pauciflora*. Gli autori, attraverso la tecnica del *southern blot* del DNA ribosomiale, hanno trovato che almeno 12, dei 16 ibridi studiati, erano di prima generazione. Allo stesso modo, in un più

recente e più esaustivo studio delle stesse zone di ibridazione, effettuato con l'ausilio di marcatori AFLP, l'analisi dell'indice di ibridazione ha mostrato che dei 55 individui di origine ibridogena, 40 erano di prima generazione (F_1) mentre i rimanenti individui erano reincroci verso *O. pauciflora* (COZZOLINO *et al.* 2006).

Precedentemente, STEINBRÜCK *et al.* (1986) avevano analizzato, mediante la tecnica dell'elettroforesi enzimatica, una piccola zona di ibridazione di *Orchis pallens* ed *O. mascula*. Tutti gli individui ibridi tranne due hanno mostrato un pattern ibrido F_1 per tutti gli enzimi che erano stati utilizzati per le specie parentali. Questi due individui, fissati per l'allele di *O. mascula* in un locus, potevano rappresentare il risultato di un reincrocio verso *O. mascula*.

Anacamptis laxiflora ed *A. palustris* sono due specie affini filogeneticamente che condividono l'habitat e si trovano spesso in simpatria lungo la penisola italiana in zone paludose costiere dove formano frequentemente zone di ibridazione. ARDUINO *et al.* (1996) hanno analizzato cinque zone di ibridazione tra queste specie. Dei 208 individui che sono risultati essere ibridi, ben 163 (78%) si sono rilevati essere di prima generazione (ricalcolato da ARDUINO *et al.* 1996)

In tutte queste differenti zone di ibridazione, non è stata trovata una chiara evidenza di introgressione genica tra le specie parentali, anche se è stato trovato qualche individuo originatosi da reincrocio. Tutti gli altri studi riportati in letteratura e basati sull'analisi molecolari di uno o di pochi individui (ROSSI *et al.* 1992; COZZOLINO ed ACETO 1994; CAPUTO *et al.* 1997; COZZOLINO *et al.* 1998; ACETO *et al.* 2000; PELLEGRINO *et al.* 2000a; BATEMAN e HOLLINGSWORTH 2004) hanno,

senza eccezioni, dimostrato la natura F_1 degli ibridi. Anche se questo pattern è decisamente affidabile, bisogna tenere in considerazione il fatto che gli ibridi sono tipicamente riconosciuti come tali quando presentano una morfologia intermedia tra le specie parentali, mentre generazioni ibride successive sono più difficili da riconoscere e possono pertanto sfuggire all'osservazione.

Un altro caso interessante è quello di *Orchis clandestina*, una specie rara con dubbia posizione tassonomica. Le analisi molecolari e citologiche hanno chiarito che questo taxon era il risultato di eventi di ibridazione tra *O. mascula* ed *O. patens*. (PELLEGRINO *et al.* 2000c). Queste analisi hanno confermato anche che tutti gli individui di *Orchis clandestina* erano ibridi di prima generazione ed hanno dunque escluso che si potesse trattare di un recente evento di speciazione via ibridazione, come era stato precedentemente ipotizzato. Inoltre è interessante notare che attualmente *O. clandestina* non è stata più ritrovata in tutte le località nelle quali anche una delle specie parentali era scomparsa.

Tutte queste informazioni che provengono dall'analisi di zone di ibridazione di orchidee mediterranee contrastano fortemente con quelli provenienti da simili studi condotti su un altro genere di orchidea, *Dactylorhiza*, strettamente affine a quelli finora discussi e con distribuzione maggiormente centro europea. In questo genere, studi citologici e molecolari hanno rivelato numerosi casi di ibridazione e di possibile speciazione allopoliploide (HEDRÈN 1996; HEDRÈN *et al.* 2001). Mentre nel genere *Dactylorhiza*, infatti, molti taxa sono risultati essere poliploidi, le analisi condotte su generi di orchidee più

tipicamente mediterranei (*Anacamptis*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Orchis*, *Serapias*), con le uniche notevoli eccezioni di *Orchis pallens* e di *Serapias lingua*, non hanno mostrato evidenza di specie con numero cromosomico poliploide (D'EMERICO 2001 e le referenze in esso contenute). Questo dato suggerisce che l'ibridazione e la poliploidizzazione, importanti nel genere *Dactylorhiza*, non rappresentano invece un elemento importante nei processi di speciazione delle orchidee mediterranee. Tuttavia, ulteriori studi, in particolare tra le orchidee con mimesi sessuale, sono necessari per chiarire in modo definitivo le conseguenze evolutive dell'ibridazione nelle orchidee.

OGGETTO E SCOPO DELLA RICERCA

Come detto in precedenza, nelle orchidee, tradizionalmente, la specificità delle strategie di impollinazione è stata considerata il principale meccanismo di isolamento riproduttivo. Tale visione ha portato ad una sopravvalutazione del ruolo delle barriere prezigotiche nel mantenimento dell'isolamento riproduttivo in questo gruppo di piante. La maggior parte degli studi, si sono pertanto incentrati sulla descrizione e sull'analisi dei meccanismi di isolamento preimpollinazione, a discapito dei meccanismi postimpollinazione. Tuttavia, come abbiamo visto, tra le orchidee mediterranee, sono presenti gruppi altamente specializzati nell'attrazione degli impollinatori e gruppi che invece attirano in maniera poco selettiva diverse specie di insetti.

La presente ricerca si pone come obiettivo l'individuazione dei patterns di evoluzione dei diversi meccanismi di isolamento

riproduttivo pre e postimpollinazione (pre e postzigotici) in due gruppi di orchidee mediterranee con diversi livelli di specificità dell'impollinazione. In linea con le più recenti ricerche, questo studio è stato condotto utilizzando un contesto filogenetico che ci ha consentito di analizzare la cronologia dell'insorgenza dei diversi meccanismi di isolamento. Obiettivo ultimo del presente lavoro è stato dunque quello di verificare se differenze nella biologia riproduttiva, in gruppi filogeneticamente affini, possano riflettersi in differenti modelli di speciazione.

BIBLIOGRAFIA

- ACETO S, S COZZOLINO, L GAUDIO, R NAZZARO e DE LUCA P**, 1999. *Pollination flow in hybrid formation between *Orchis morio* and *Orchis papilionacea* (Orchidaceae) in two different habitats*. Int. J. Pl. Sci. 160: 1153-1156.
- ACETO S, P CAPUTO, L GAUDIO, R NAZZARO e COZZOLINO S**, 2000. *Molecular approach to the identification and characterization of natural hybrids between *Orchis pauciflora* and *O. quadripunctata* (Orchidaceae)*. Bot. Helv. 110: 31-39.
- ACKERMAN JD**, 1986. *Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids*. Lindleyana 1: 108-113.
- ANDERSON E**, 1948. *Hybridization of the habitat*. Evolution 2: 1-9.
- ANDERSON E**, 1949. *Introgressive Hybridization*. John Wiley, New York.
- ANDERSON E ed HUBRICHT L** 1938. *Hybridization in Tradescantia*. III. *The evidence for introgressive hybridization*. Am. J. Bot. 25, 396-402.
- ARDUINO P, F VERRA, R CIANCHI, W ROSSI, B CORRIAS e BULLINI L**, 1996. *Genetic variation and natural hybridization between *Orchis laxiflora* and *O. palustris* (Orchidaceae)*. Pl. Syst. Evol. 202: 87-109.
- ARNOLD ML**, 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- ARNOLD ML ed HODGES SA**, 1995. *The fitness of Hybrids - A response to Day and Schluter*. Trends Ecol. Evol. 10: 289.
- ARNOLD ML e BENNETT BD**, 1993. *Natural hybridization in Louisiana irises: Genetic variation and ecological determinants*. In: *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*, RG Harrison ed., Oxford: Oxford University Press, pp. 115-139.
- BAKER MC e BAKER EM**. 1990. *Reproductive behaviour of female buntings: isolating mechanisms in a hybridizing pair of species*. Evolution. 44: 332-338.
- BALKAU BJ e FELDMAN MW** 1973. *Selection for migration modification*. Genetics 74: 171-174.
- BARTON NH e HEWITT GM**, 1985. *Analysis of Hybrid Zones*. Annu. Rev. Ecol. Syst. 16: 113-148.
- BARTON NH**, 2001. *The role of hybridization in evolution*. Mol. Ecol. 10:551-568.
- BATEMAN RM e HOLLINGSWORTH PM**, 2004. *Morphological and molecular investigation of the parentage and maternity of *Anacamptis xalbufereensis* (*A. Fragrans* x *A. Robusta*), a new hybrid from Mallorca, Spain*. Taxon 53: 43-54.
- BATEMAN RM, PM HOLLINGSWORTH, J PRESTON, L YI-BO, AM PRIDGEON e CHASE MW**, 2003. *Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae)*. Bot. J. Linn. Soc. 142:1-40.
- BRAGA PIS**, 1977. *Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina na Amazônia Central*. Acta Amazonica 7: 1-89.
- BROWN R**, 1831. *On the organs and modes of fecundation in Orchideae and Asclepiadaceae*. Trans. Linn. Soc. Bot. 16: 685-746.
- BRONSTEIN JL**, 1995. *The plant-pollinator landscape*. In: *Mosaic Landscapes and Ecological Processes* (eds L. Hansson, L. Fahrig and G. Merriam), pp. 257-288. Chapman & Hall, London.

- BURKE JM** ed **ARNOLD ML**, 2001. *Genetics and fitness of hybrids*. Annu. Rev. Genet. 35: 31-52.
- BUSH GL**, **SM CASE**, **AC WILSON** e **PATTON JL**, 1977. *Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3942-3946.
- BUSH GL**, 1981. *Stasipatric speciation and rapid evolution in animals*. In: Evolution and Speciation: Essays in Honor of M. J. D. White, (W. R. Atchley and D. S. Woodruff, eds.) pp. 201-218. Cambridge University Press, Cambridge.
- CAFASSO D**, **G PELLEGRINO**, **A MUSACCHIO**, **A SCRUGLI** e **COZZOLINO S**, 2001. *Molecular characterization of hybrids between *Orchis longicornu* and *O. papilionacea* (Orchidaceae) in different localities in Sardinia*. J. Eur. Orch. 33: 881-890.
- CAPUTO P**, **S ACETO**, **S COZZOLINO** e **NAZZARO R**, 1997. *Morphological and molecular characterization of a natural hybrid between *Orchis laxiflora* and *O. morio* (Orchidaceae)*. Pl. Syst. Evol. 205: 147-155.
- CARNEY SE**, **SA HODGES** ed **ARNOLD ML**, 1996. *Effects of differential pollen-tube growth on hybridization in the Louisiana irises*. Evolution 50: 1871-1878.
- CLAUSEN J**, 1951. *Stages in the Evolution of Plant Species*. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- CLAUSEN J**, **DD KECK** ed **HIESEY WM**, 1940. *Experimental studies on the nature of species I. Effect of varied environments on western North American plants*. Publ. Carnegie Inst. Wash. 520: 1-452 (296-324).
- COYNE JA**, 1994. *Ernst Mayr and the origin of species*. Evolution 48: 19-30.
- COYNE JA** ed **ORR HA**, 1989. *Patterns of speciation in *Drosophila**. Evolution 43: 362-381.
- COYNE JA** ed **ORR HA**, 1997. *Patterns of speciation in *Drosophila* revisited*. Evolution 51: 295-303.
- COYNE JA** ed **ORR HA**, 1998. *The evolutionary genetics of speciation*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353: 287-305.
- COYNE JA** ed **ORR HA**, 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland.
- COZZOLINO S** ed **ACETO S**, 1994. *Morphological and molecular characterization of *XOrchiaceras bergonii* (Nanteuil) E. G. Cam.* Giornale Botanico Italiano 121: 861-867.
- COZZOLINO S**, **S ACETO**, **P CAPUTO** e **MENALE B**, 1998. *A characterization of *Orchis xdiatriciana* Bogenh., a natural orchid hybrid*. Pl. Biosystems. 132: 71-76.
- COZZOLINO S**, **S D'EMERICO** e **WIDMER A**, 2004. *Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity*. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 271: 259-262.
- COZZOLINO S**, **AM NARDELLA**, **S IMPAGLIAZZO**, **A WIDMER** e **LEXER C**, 2006. *Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones?* Biol. Cons. 129:14-23.
- COZZOLINO S**, **FP SCHIESTL**, **A MÜLLER**, **O DE CASTRO**, **AM NARDELLA** e **WIDMER A**, 2005. *Evidence for pollinator sharing in Mediterranean nectar-mimic orchids: absence of premating barriers?* Proc. Roy. Soc. Lond. B. 272: 1271-1278.
- CRACRAFT J**, 1983. *Species concepts and speciation analysis*. Current ornithology 1: 159-187
- CRONQUIST A**, 1978. *Once again, what is a species?* Pp. 3-20. In: L. Knutson, ed. *BioSystematics in Agriculture*. Alleheld Osmun, Montclair, NJ.

- CRUZAN MB** ed **ARNOLD ML**, 1993. *Ecological and genetic associations in an Iris hybrid zone*. Evolution 47:1432-1445.
- CRUZAN MB** ed **ARNOLD ML**, 1994. *Assortative mating and natural selection in an Iris hybrid zone*. Evolution 48:1946-1958.
- DAFNI A**, 1984. *Mimicry and deception in pollination*. Annual Review of Ecology and Systematics 15: 259-278.
- DAFNI A**, 1987. *Pollination in Orchis and related genera: evolution from reward to deception*. In: *Orchid Biology, Reviews and Perspectives* (Arditti, J., ed.), pp. 79–104, Cornell University Press.
- DAFNI A** e **BAUMANN H**, 1982. *Biometrical analysis on populations of Orchis israelitica, O. caspia, and their hybrids (Orchidaceae)*. Pl. Syst. Evol. 140: 87-94
- DAFNI A**, **Y IVRI** e **BRANTJES NMB**, 1981. *Pollination of Serapias vomeracea Brig (Orchidaceae) by imitation of holes for sleeping solitary males bees (Hym)*. Acta Bot Neerl 30:69–73.
- DAFNI A** ed **IVRY Y**, 1981. *Floral mimicry between Orchis israelitica BAUMANN & DAFNI (Orchidaceae) and Bellevalia flexuosa BOISS. (Liliaceae)*. Oecologia 49: 229-232.
- DARWIN C**, 1859. *On the Origin of Species*. London: John Murray.
- DAVIES KL**, **C WINTERS** e **TURNER MP**, 2000. *Pseudopollen: its structure and development in Maxillaria (Orchidaceae)*. Annals of Botany 85: 887–895.
- DELFORGE P**, 1994. *Guide des Orchidées d'Europe d'Afrique du Nord et du Proch-Orient*. Delachaux et Niestlé, Lausanne.
- D'EMERICO S**, **P BIANCO** e **PIGNONE D**, 1996. *Cytomorphological characterization of diploid and triploid individuals of Orchis x gennarii Reichenb fil (Orchidaceae)*. Caryologia 49, 153–161.
- D'EMERICO S**, 2001. *Tribe Orchideae cytogenetics*. Pp. 216-224 In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW and Rasmussen FN (eds.), *Genera Orchidacearum. Orchidoideae (Part 1)*. Oxford University Press, Oxford.
- DOBZHANSKY T**, 1937. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- DODSON CH** e **FRYMIRE GP**, 1961. *Natural pollination of orchids*. Missouri Botanical Gardens Bulletin 49: 133–139.
- DIAZ AM** e **MACNAIR R**, 1999. *Pollen tube competition as a mechanism of prezygotic reproductive isolation between Mimulus nasutus and its presumed progenitor M. guttatus*. New Phytol. 144: 471-478.
- DRESSLER RL**, 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Cambridge University Press.
- EHRENDORFER F**, 1980. *Polyploidy and distribution*. Pp. 45-60 In: W. H. Lewis (editor), *Polyploidy, Biological Relevance*. Plenum Press, New York and London.
- ELLSTRAND NC**, **WHITKUS R** e **RIESEBERG LH**, 1996. *Distribution of spontaneous plant hybrids*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 5090–5093.
- FISHER RA**, 1930 *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press.
- FELICOLI A**, **F STRUMIA**, **L FILIPPI** e **PINZAUTI M**, 1998. *Observations on the relation between orchids of the genus Serapias and their pollinators in an area of central Tuscany*. Frustula Entomol 21:103–108.

- FUTUYMA DJ**, 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- GALIZIA CG, J KUNZE, A GUMBERT, AK BORG-KARLSON, S SACHSE, C MARKL** e **MENZEL R**, 2005. *Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system*. *Behav. Ecol.* 16: 159-168.
- GARDNER K, A BUERKLE, J WHITTON** e **RIESEBERG LH**, 2000. *Inferring epistasis in wild sunflower hybrid zones*. In: *Epistasis and the Evolutionary Process* (eds Wolf J, Brodie B, Wade MJ), pp. 264–279. Oxford University Press, New York.
- GILL DE**, 1989. *Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids*. In: D. Otte and J. A. Endler (eds.), *Speciation and Its Consequences*, pp. 458-481. Academy of Natural Sciences Publications, Philadelphia.
- GOSS GH**, 1977. *The reproductive biology of the epiphytic orchids of Florida*. 6. *Polystachya flavescens* (Lindley). *American Orchid Society Bulletin* 46: 990–994
- GRANT V**, 1949. *Pollination systems as isolating mechanisms in Angiosperms*. *Evolution* 3: 82–97.
- GRANT V**, 1966. *Linkage between viability and fertility in a species cross in Gilia*. *Genetics* 54: 867–880.
- GRANT V**, 1971. *Plant speciation*. Columbia University Press, New York
- GRANT V** e **GRANT KA**, 1965. *Flower pollination in the Phlox family*. Columbia University Press, New York.
- GRAUR D** e **LI WH**, 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland.
- GREGG KB**, 1991. *Defrauding the deceitful orchid: pollen collection by pollinators of Cleites divaricata and C. bifaria*. *Lindleyana* 6: 214–220.
- HALDANE JBS**, 1948. *The theory of a cline*. *J. Genet.* 28: 277-284.
- HARRISON RG**, 1998. *Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation*. In: *Endless Forms: Species and Speciation* (D. J. Howard and S. H. Berlocher, eds), pp. 19-31. Oxford University Press, Oxford.
- HEDRÉN M**, 1996. *Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European Dactylorhiza (Orchidaceae): evidence from allozyme markers*. *Pl. Syst. Evol.* 201: 31-55.
- HEDRÉN M, MF FAY.** e **CHASE MW**, 2001. *Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in Dactylorhiza (Orchidaceae)*. *Amer. J. Bot.* 88: 1868-1880.
- HEISER CB**, 1947 *Hybridization between the sunflower species Helianthus annuus and H. petiolaris*. *Evolution* 1: 249-262.
- HERRERA CM**, 1988. *Variation in mutualisms: the spatiotemporal mosaic of a pollinator assemblage*. *Biol. J. Linn. Soc.* 35, 95–125.
- HESLOP-HARRISON J**, 1982. *Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses*. *Science* 215: 1358-1364.
- HILLIS DM**, 1981. *Premating isolating mechanisms among three species of the Rana pipiens complex in Texas and southern Oklahoma*. *Copeia* 1981:312–319.
- HOWARD DJ**, 1986. *A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species*. *Evolution* 40: 34–43.
- HOWARD DJ** e **BERLOCHER SH**, eds. 1998. *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, Oxford.

- KIESTER AR, LANDE R e SCHEMSKE DW**, 1984. *Models of coevolution and speciation in plants and their pollinators*. Am. Nat. 124: 220–243.
- KING M**, 1993 *Species evolution: the role of chromosome change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KORYAN A ed ENDRESS PK**, 2001. *Floral structure and development of *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasioideae) and their relationships to other Orchidaceae*. Intern. J. Plant Sci. 162: 847–867.
- LEVIN DA**, 1978. *The origin of isolating mechanism in flowering plants*. Evol. Biol. 11: 185-315.
- LEVIN DA e WILSON AC**, 1976. *Rates of evolution in seed plants: Net increase in diversity of chromosome numbers and species numbers through time*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:2086-2090.
- LEWONTIN RC e BIRCH LC**, 1966. *Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments*. Evolution 20:315-336.
- LI HB, J WANG, AM LIU, KD LIU, QF ZHANG e ZOU JS**, 1997. *Genetics of low-temperature-sensitive sterility in indica-japonica hybrids of rice as determined by RFLP analysis*. Theor. Appl. Genet. 95: 1092-1097.
- LINDER HP e MIDGLEY JJ**, 1996. *Anemophilous plants select pollen from their own species from the air*. Oecologia 108: 85-87
- LIJTMAR DA, MAHLER B e TUBARO P**, 2003. *Hybridization and postzygotic isolation patterns in pigeons and doves*. Evolution 57: 1411–1418.
- MACIOR LW**, 1971. *Co-evolution of plants and animals: systematic insights from plant-insect interactions*. Taxon 20:17–28.
- MARTINSEN GD, TG WHITHAM, RJ TUREK e KEIM P**, 2001. *Hybrid populations selectively filter gene introgression between species*. Evolution 55:1325-1335.
- MAYR E**, 1942 *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- MAYR E**, 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge.
- MAYR E**, 1992. *A local flora and the biological species concept*. Am. J. Bot. 79: 222–238.
- MOYLE LC, MS OLSON e TIFFIN P**, 2004. *Patterns of reproductive isolation in three angiosperm genera*. Evolution 58: 1195-1208.
- MOORE WS**, 1977. *An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates*. Q. Rev. Biol. 52:263-78.
- NIKLAS KJ e BUCHMANN SL**, 1987. *The aerodynamics of pollen capture in two sympatric *Ephedra* species*. Evolution 41: 104-123.
- NILSSON LA**, 1980. *The pollination ecology of *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae)*. Bot. Not. 133: 367-385.
- NILSSON LA**, 1983a. *Processes of isolation and introgressive interplay between *Platanthera bifolia* (L) Rich and *P. chlorantha* (Custer) Reichb. (Orchidaceae)*. Bot. J. Linn. Soc. 87: 325-350.
- NILSSON LA**, 1983b. *Anthecology of *Orchis mascula* (Orchidaceae)*. Nordic J. Bot. 3: 157-179.
- NILSSON LA**, 1984. *Anthecology of *Orchis morio* (Orchidaceae) at its outpost in the north*. Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsal. C3: 167-179.
- NILSSON LA**, 1992. *Orchid pollination biology*. Trends Ecol. Evol. 7: 255–259.

- NIXON KC** e **WHEELER QD**, 1990. *An amplification of the phylogenetic species concept*. Cladistics 6: 211–223.
- NOOR MAF**, 2002. *Is the Biological Species Concept showing its age?* Trends in Ecology and Evolution 17: 153-154.
- O'BRIEN SJ** e **MAYR E**, 1991. *Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies*. Science, 251(4998): 1187-1188.
- OTTE D** e **ENDLER JA**, eds. 1989. *Speciation and Its Consequences*. Sinauer Assoc. Sunderland, MA.
- PEAKALL R**, **BOWER CC**, **LOGAN AE** e **NICOL HI**, 1997. *Confirmation of the hybrid origin of *Chiloglottis X pescottiana* R. S. Rogers (Orchidaceae: Diurideae). 1. Genetic and morphometric analysis*. Aust. J. Bot. 45: 839–855.
- PELLEGRINO G**, **P CAPUTO**, **S COZZOLINO**, **B MENALE** e **MUSACCHIO A**, 2000b. *Molecular characterization of a hybrid zone between *Orchis mascula* and *Orchis pauciflora* in Southern Italy*. Biol. Plant. 43, 13–18.
- PELLEGRINO G**, **S COZZOLINO**, **S D'EMERICO** e **GRUNANGER P**, 2000c. *The taxonomic position of the controversial taxon *Orchis clandestina* (Orchidaceae): Karyomorphological and molecular analysis*. Bot. Helv. 110: 101-107.
- PELLEGRINO G**, **R NAZZARO**, **A MUSACCHIO**, **B MENALE** e **COZZOLINO S**, 2000a. *Hybrid between *Orchis mascula* and *O. provincialis*: a not common finding*. J. Eur. Orch. 32: 539-546.
- PELLEGRINO G**, **S D'EMERICO**, **A MUSACCHIO**, **A SCRUGLI** e **COZZOLINO S**, 2005a. *Confirmation of hybridization among sympatric insular populations of *Orchis mascula* and *O. provincialis**. Plant Syst. Evol. 251: 131–142.
- PELLEGRINO G**, **MUSACCHIO A**, **NOCE ME**, **PALERMO AM** e **WIDMER A**, 2005b. *Reproductive Versus Floral Isolation Among Morphologically Similar *Serapias* L. Species (Orchidaceae)*. Journal of Heredity 96(1): 15-23.
- POTTS BM** e **REID JB**, 1985. *Analysis of a hybrid swarm between *Eucalyptus risdonii* HOOK. F. and *E. amygdalina* LABILL.* Aust. J. Plant Phys. 33 543-562.
- PIGLIUCCI M**, 2003. *Species as family resemblance concepts: the (dis-)solution of the species problem?* BioEssays 25: 596-602.
- PRESGRAVES DC**, 2002. *Patterns of postzygotic isolation in lepidoptera*. Evolution 56: 1168-1183.
- PRICE TD** e **BOUVIER MM**, 2002. *The evolution of F1 postzygotic incompatibilities in birds*. Evolution 56: 2083-2089.
- PRIDGEON AM**, **RM BATEMAN**, **AV COX**, **JR HAPEMAN** e **CHASE MW**, 1997. *Phylogenetics of Subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato**. Lindleyana 12: 89-109.
- RIESEBERG LH**, 1997. *Hybrid origins of plant species*. Annu. Rev. Ecol. Syst. 28: 359-389.
- RIESEBERG LH**, 2001. *Chromosomal rearrangements and speciation*. Trends Ecol. Evol. 16: 351–358.
- RIESEBERG LH** e **CARNEY SE**, 1998 Tansley review number 102. Plant hybridization. *New Phytologist* 140: 599-624.
- RIESEBERG LH**, **AM DESROCHERS** e **YOUN SJ**, 1995. *Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of *Helianthus* (Asteraceae)*. Am. J. Bot. 82: 515-519.

- RIESEBERG LH, O RAYMOND, DM ROSENTHAL, Z LAI, K LIVINGSTONE, T NAKAZATO, JL DURPHY, AE SCHWARZBACH, LA DONOVAN e LEXER C**, 2003. *Major ecological transitions in annual sunflowers facilitated by hybridization*. Science 301:1211-1216.
- RIESEBERG LH, B SINERVO, CR LINDER, M UNGERER ed ARIAS DM**, 1996. *Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids*. Science 272:741-745.
- RIESEBERG LH, A WIDMER, AM ARNTZ e BURKE JM**, 2002. *Directional selection is the primary cause of phenotypic diversification*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 12242-12245.
- RILEY HP**, 1938. *A character analysis of colonies of Iris fulva, Iris hexagona var. giganticaerulea and natural hybrids*. Am. J. Bot. 25: 727-738.
- ROY BA e WIDMER A**, 1999. *Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon*. Trends Pl. Sci. 4: 325-330.
- ROSSI W, P ARDUINO, R CIANCHI e BULLINI L**, 1992. *A new natural hybrid in the genus Orchis L.: genetic data and description*. Lindleyana 7: 121-126.
- RUSSELL ST**, 2003. *Evolution of intrinsic post-zygotic reproductive isolation in fish*. Ann. Zool. Fenn 40: 321-329.
- SASA MM, PT CHIPPINDALE e JOHNSON NA**, 1998. *Patterns of postzygotic isolation in frogs*. Evolution 52: 1811-1820.
- SAVOLAINEN V, MC ANSTETT, C LEXER, I HUTTON, JJ CLARKSON, MV NORUP, MP POWELL, D SPRINGATE, N SALAMIN e BAKER WJ**, 2006. *Sympatric speciation in palms on an oceanic island*. Nature 441: 210-213.
- SCHEMSKE DW**, 2000. *Understanding the origin of species*. Evolution 54:1069-1073.
- SCHEMSKE DW e BRADSHAW HD**, 1999. *Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (Mimulus)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11910-11915.
- SCHIESTL FP, M AYASSE, HF PAULUS, C LOFSTEDT, BS HANSSON, F IBARRA e WITTKO F**, 1999. *Orchid pollination by sexual swindle*. Nature 399: 421-422.
- SLATKIN M**, 1973. *Gene flow and selection in a cline*. Genetics 75: 733-756.
- SNOW AA**, 1994. *Postpollination selection and male fitness in plants*. Am. Nat. 144: 69-83.
- SOLIVA M e WIDMER A**, 2003. *Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive Ophrys (Orchidaceae) species*. Evolution 57: 2252-2261.
- SPRENGEL CK, 1793**. *Das Entdeckte Geheimniss in der Natur im Bau und in der Befuchtung der Blumen*. Berlin.
- STACE CA**, 1987. *Hybridization and the plant species*. In: Differential Patterns in Higher Plants. (ed. Urbanska, K.M.) pp. 115-127. Academic Press, New York.
- STEBBINS GL**, 1950. *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- STEBBINS GL**, 1959. *The role of hybridization in evolution*. Proc. Am. Phil. Soc. 103: 231-251.
- STEBBINS G**, 1970. *Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms*. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1: 307-326.
- STEBBINS GL e DALY K**, 1961. *Changes in the variation of genome structure in the Solanaceae*. Genetics 152: 1183-1202.
- STEBBINS GL e FERLAN L**, 1956. *Population variability, hybridization, and introgression in some species of Ophrys*. Evolution 10: 32-46.

- STEINBRÜCK G, M SCHLEGEL, I DAHLSTRÖM e RÖTTGER B**, 1986. *Characterization of interspecific hybrids between *Orchis mascula* and *O. pallens* (Orchidaceae) by enzyme electrophoresis*. Plant Syst. Evol. 153: 229–241.
- STEINER KE**, 1989. *The pollination of *Disperis* (Orchidaceae) by oil-collecting bees in southern Africa*. Lindleyana 4: 164–183.
- TADMOR Y, ZAMIR D e LADIZINSKY G**, 1987. *Genetic mapping of an ancient translocation in the genus *Lens**. Theor Appl Genet 73:883-892.
- TREMBLAY RL**, 1992. *Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics*. Can. J. Bot. 70, 642–650.
- TREMBLAY RL, JD ACKERMAN, JK ZIMMERMAN e CALVO RN**, 2005. *Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification*. Biol. J. Linn. Soc. 84: 1–54.
- TURELLI M, NH BARTON e COYNE JA**, 2001. *Theory and speciation*. Trends Ecol. Evol. 16: 330-343.
- VASEK FC e SAUER RH**, 1971. *Seasonal progress of flowering in *Clarkia**. Ecology 52: 1038–1045.
- VAN DER CINGEL NA**, 1995. *An Atlas of Orchids Pollination – European Orchids*. Balkema, Rotterdam.
- VAN DER PIJL L**, 1960. Ecological aspects of flower evolution. Phyletic evolution. Evolution 14: 403-416.
- VAN DER PIJL L e DODSON CH**, 1966. *Orchid Flowers Their Pollination and Evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- VAN VALEN L**, 1976. *Domains, deductions, the predictive method, and Darwin*. Evolutionary Theory 1: 231-245.
- VÖGEL S**, 1974. *Ölblumen und ölsammelnde Bienen*. Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 7: 285–547.
- VÖTH W**, 1982. *Die ausgeborgten Bestäuber von *Orchis pallens* L*. Die Orchideen 33: 196-203.
- WAGNER WH**, 1969. *The role and taxonomic treatment of hybrids*. Bioscience 19: 785–789.
- WAGNER WH**, 1970. *Biosystematics and evolutionary noise*. Taxon 19: 146-151.
- WANG H, E DURANT McARTHUR, SC SANDERSON, JH GRAHAM e FREEMAN DC**, 1997. *Narrow Hybrid Zone Between Two Subspecies of Big Sagebrush (*Artemisia tridentata*: Asteraceae). IV. Reciprocal Transplant Experiments*. Evolution 51: 95-102.
- WASER NML, CHITTKA MV, PRICE NM ed OLLERTON WJ**, 1996. *Generalization in pollination systems, and why it matters*. Ecology 77: 1043-1060.
- WIDMER A, S COZZOLINO, G PELLEGRINO, M SOLIVA e DAFNI A**, 2000. *Molecular analysis of orchid pollinaria and pollinaria remains found on insects*. Molec. Ecol. 9: 1911-1914.
- WILLIAMS EG e ROUSE JL**, 1990. *Relationships of pollen size, pistil length and pollen tube growth rates in *Rhododendron* and their influence on hybridization*. Sexual Plant Reproduction 3: 7–17.
- WILLING B e WILLING E**, 1977. *Bibliographie über die Orchideen Europas und Mittelmeerländer. 1744-1976*. Willdenowia 11: 1-325.
- WILLING B e WILLING E**, 1985. *Bibliographie über die Orchideen Europas und Mittelmeerländer*. Englera 5: 1-280.

- WILSON AC, MAXSON LR e SARICH VM**, 1974. *Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 2843-2847.
- WU CI**, 1992. *A note on Haldane's rule: hybrid inviability versus hybrid sterility*. Evolution 46: 1584-1587.
- WU CI e PALOPOLI MF**, 1994. *Genetics of postmating reproductive isolation in animals*. Annu. Rev. Genet. 28: 283-308.
- WYATT R**, 1983. *Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems*. In: Real L. (ed.) pp. 51-95. *Pollination Biology*. Academic Press, Orlando.

Chapter 1: PATTERNS OF REPRODUCTIVE ISOLATION IN MEDITERRANEAN ORCHIDS

ABSTRACT

Comparative studies combining hybridization data and phylogenetic framework, have detected some general evolution patterns in animal as that reproductive isolation increases with genetic distance and that prezygotic isolation evolves faster than postzygotic one. Among plants, it is still unclear if similar patterns of evolution of reproductive isolation occur. Here we investigated pattern and mode of evolution of reproductive isolation in two groups of Mediterranean orchids with different pollination biology: an highly specialized sexually deceptive group and a less specialized food deceptive group. Through a large-scale experimental crosses we assessed the occurrence of three different stages of reproductive isolation (i.e. premating, postmating prezygotic and postzygotic) and, using a phylogenetical framework, we analysed their strength and their evolutionary rates.

Our results show quantitative and qualitative differences among the two studied groups. For premating isolation we found a widespread overlap in pollinators among food deceptive species and complete isolation among the sexually deceptive species while experimental crosses highlighted an important role for postmating (both pre and postzygotic) barriers among food deceptive species when compared to sexually deceptive species.

Correlation with the genetic distance among species show that, in the sexually deceptive group, reproductive isolation (both pre and postzygotic) doesn't evolves in a clock-like manner while in the food deceptive group postzygotic isolation is significantly affected by the time since species divergence.

Comparison of evolutionary rates, within a common interval of genetic distance, showed that the contribution of postmating barriers was more relevant in the food deceptive species than in the corresponding sexually deceptive species. Finally, we found that asymmetries in prezygotic isolation were widespread among food deceptive species and weak or absent in the sexually deceptive species.

Our research, highlights that in closely related groups such as in food and sexually deceptive orchids, difference in pollination specificity (i.e. different amount of early premating isolation) could be mirrored in different strength and evolutionary rates of subsequent stages of postmating reproductive isolation and, more likely, in the ways by which species arise.

Key words: speciation; premating barriers; postmating barriers; food deceptive orchids; sexually deceptive orchids.

Speciation, i. e. the way(s) in which species arise, is one of the most intriguing and controversial processes in evolutionary biology (Otte and Endler 1989; Coyne and Orr 1998; Howard and Berlocher 1998; Turelli et al. 2001), likely because taxa differ in their rates and mode of speciation, both being dependent on details of geography, ecology, mating system and genetics (Mayr 1942). Furthermore, speciation is generally slow and therefore unobservable in real time (Presgraves 2002), but maybe the crucial issue is that our view of how speciation occurs depends on our concept of what species are (Cracraft 1983; Harrison 1998) and biologists still now disagree about it (e.g., Mayden 1997; Hey 2001; Pigliucci 2003). A number of attempts have been made to define the conditions necessary and sufficient to delimit related taxa as different species, but none of these have been widely accepted, as each definition is open to some criticism. It has been proposed that species boundaries could be detected by the existence of reproductive isolation (biological species concept, Dobzhansky 1937; Mayr 1942), by traits differences that are consistent and easy to observe (morphological species concept, Cronquist 1978), by the nature of phylogenetic relationships between taxa (phylogenetic species concept, Nixon and Wheeler 1990) or by the detection of differences in the ecological niche (ecological species concept, Van Valen 1976). However, in spite of this debate, there is substantial agreement between evolutionists in assigning to reproductive isolation a key role in the formation and maintenance of species in nature.

In this context speciation can be viewed as the evolution of reproductive isolation between formerly interbreeding demes (Coyne 1994; Coyne and Orr 1998; Futuyma 1998; Noor 2002), and speciation research based on this framework has led to exciting advances in the understanding of the evolution of intrinsic reproductive isolating mechanisms (Coyne and Orr 1998; Howard and Berlocher 1998; Turelli et al. 2001; Via 2001, 2002).

Barriers to gene exchange (as processes that produce reproductive isolation) are often categorized in pre and postmating mechanisms. Premating barriers are exclusively prezygotic, while postmating barriers may result from prezygotic or

postzygotic mechanisms (Snow 1994). Typically, the maintenance of species' boundaries is the result of the combination of both processes, but the strength and permeability of pre and postmating barriers are highly variable among different taxa depending strongly on the peculiarity of their reproductive biology.

Comparative studies between the magnitude of reproductive isolation and genetic distance may allow to understand the effective contribution of pre and postmating barriers in the reproductive isolation among species, to identify the tempo and mode of their evolution and, more importantly, the relative contribution of each barrier type in the initial steps of the process underlying the species formation (Coyne and Orr 2004) but due to the high variability among taxa a large amount of available data are needed to make a comparative approach possible. The few analyses of the relationship between reproductive isolation and genetic distance in animal systems (Coyne and Orr 1989, 1997; Tilley et al. 1990; Gleason and Ritchie 1998; Sasa et al. 1998; Presgraves 2002; Mendelson 2003) have indicated that the magnitude of reproductive isolation between species pairs is generally positively associated with genetic distance, and therefore presumably with the time since the species divergence according to a rough "speciation clock" (Presgraves 2002; Coyne and Orr 1989, 1997; Sasa et al. 1998; Orr and Turelli 2001). On the contrary, in plants, the direct association between reproductive isolation, in terms of postmating isolation, and genetic distance have been only investigated in three angiosperm genera (Moyle et al. 2004) and results showed a more varied set of relationships ranging from a significantly positive correlations (*Silene*) to associations that are weak or absent (*Streptanthus*). Furthermore, potential differences between plant and animals systems due to typical plant characteristics as sessile nature, predominant hermaphroditism, gametophytic gene expression, etc. (Moyle et al. 2004; Stebbins 1999; Grant 1981) may have a significant impact in defining the rules of premating and postmating barriers. For example, in animals, due to the evolution of premating behaviour to prevent interspecific crosses (Baker and

Baker 1990; Arnold 1997) premating barriers, and related rule of sexual selection, seems to be particularly relevant compared to sessile organisms such as plants, where postmating barriers seems to be more important (Arnold et al. 1993; Howard and Gregory 1993; Moyle et al. 2004). Indeed, reproductive isolation in numerous animal groups has been found to evolve more rapidly for prezygotic than postzygotic traits (Coyne and Orr 1989; Gleason and Ritchie 1998; Mendelson 2003), a trend that has not been confirmed so far in plants (Arnold 1997; Moyle et al. 2004). Conversely, asymmetry in postmating reproductive isolation seems to be more common in plants than in animals (Tiffin et al. 2001) as probable consequence of a non strongly selective rule (as referring to pollen choice at pollination stage) of plant female component.

However, up to now, all published comparative studies on the evolution of reproductive isolation has been carried out using literature data (whose experimental plans were often not designed with this aim), and due to extreme variability of patterns among taxa, more data are needed, especially in plants, in order to understand the true incidence of the different kinds of reproductive isolation mechanisms and the patterns that underlie their evolution. Besides, in comparative studies based on literature data, not all stage of reproductive isolation can be examined (Moyle et al. 2004) and consequently the relative contribution of pre and postzygotic barriers is unknown, as is the degree to which diverse types of prezygotic and postzygotic barriers function to isolate species (Coyne and Orr 1998; Schemske 2000). For example, intrinsic postzygotic barriers have been the subject of considerable attention because of their ease of study in the laboratory, but it is not known if these reproductive barriers evolve before or after speciation is complete (Schemske 2000).

After, we combined these stage-specific measures following the methods proposed by Coyne and Orr (1989) to estimate total reproductive isolation and the relative contribution of the studied barriers to total isolation in deceptive orchids (Ramsey et al. 2003). With this aim we therefore carried out an experimentally performed comparative studies by investigating the rule, the

strength and the symmetry of pre and postmating (i.e. post-pollination) isolation in orchids.

In this evolutionary successfully plant group, the extraordinary floral diversity that reflects the importance of plant-pollinators (pre-mating) interaction has traditionally suggested a predominant role for pre-mating reproductive barriers in maintaining species boundaries and in promoting orchid diversification (Gill 1989). However, combined recent phylogenetic (Bateman et al. 2003; Cozzolino et al. 2001; Aceto et al. 1999) and ecological evidences (Schiestl 2005; Dafni 1987) indicate, among Mediterranean orchids, the occurrence of sister groups characterized by different level of specificity in pollination system, and more likely, differently relying on pre-mating and postmating barriers (Cozzolino and Widmer 2005).

One third of all the orchids are nectarless and thus attract pollinators through deceptive strategies (i.e. they offer no rewards to their pollinators). Among Mediterranean orchids different kinds of deceptive strategies have evolved, all of them well studied. In the *Ophrys* genus, all species attract and deceive the pollinator through an elaborate sexual mimicry that involves visual traits and odour compounds that mimic the pheromone of female insects (Schiestl et al. 1999). This strategy is highly specific and the orchid-pollinator relationship in this sexually deceptive group is strictly species-specific (Paulus and Gack 1990). In contrast, sister related food deceptive orchids genera offer no reward to pollinators, have large conspicuous flowers and are thought to attract and deceive mostly naive pollinators by generally mimicking nectar plants (Dafni 1987). Comparisons of available pollinator lists (Van der Cingel 1995 and reference therein) and, more recently, the application of molecular markers to the identification of pollinaria on insects clearly confirmed that pollinators are shared among different food deceptive orchid species when growing in sympatry (Widmer et al. 2000; Cozzolino et al. 2005). So, in contrast to the sexually deceptive orchids where highly specialized pollination occurs, food deception represents a relatively less specialized pollination mechanism, which does not

prevent the risk of incorrect pollen transfer among different species that grow in sympatry and have overlapping flowering phenologies (Cozzolino et al. 2005). While pre-mating barriers should secure species boundaries in the former system, in the latter pre-mating mechanisms seems to be weaker.

Our aim is therefore to investigate the evolution of post-mating reproductive isolation in orchids as the correlation between genetic distance and reproductive isolation, the comparison of the rate of pre-zygotic vs post-zygotic barrier evolution and the occurrence of asymmetric barriers. And, to verify whether difference in specificity of pollination strategies (i.e. pre-mating isolation) may affect these patterns we comparatively investigated two closely related groups of orchids with different pollination biology, the highly specialized sexually deceptive species (genus *Ophrys*) and the less specialized food deceptive species (genera *Orchis*, *Neotinea*, *Anacamptis*, *Dactylorhiza*). Species studied were all selected to be sympatric and co-flowering, i.e. the only form of pre-mating isolation being pollinator specificity and post-mating barriers were estimated by using experimental crosses in controlled conditions. Finally, orchids, with roughly 20,000 species are, together with composites, the most species-rich group of flowering plants and it seems worth asking if, together with the importance of plant-pollinator interactions, also post-mating isolating mechanisms could have played a substantial role in their extraordinary species diversification.

MATERIALS AND METHODS

Premating isolation

Pre-mating barriers, which are exclusively prezygotic, include ecological factors that prevent individuals from different lineages from growing close enough to exchange gametes and reproductive factors that result from genetic differences in flowering times and divergence of floral characters (Levin 1978).

The orchid groups that we included in our study embody coflowering species, with sympatric distribution, all of them living in the same or in similar and

contiguous habitats. We therefore didn't take into account isolating mechanisms based on phenology or on geographic and habitat isolation and to evaluate pre-mating isolation we based exclusively on their pollination biology.

With this aim, we surveyed available pollinator lists (Nilsson 1980; Dafni 1984; Van der Cingel 1995 and reference therein; Lang 2004; Cozzolino et al. 2005; Schatz 2006;) and we created a database of all reported orchid's pollinators. Then, for food deceptive orchids only, we listed pollinators in the Robertson's functional classes (Robertson 1928; Fenster et al. 2004) and we calculated pollinator isolation as $1 - (\text{number of functional classes of pollinators shared by a species pairs} / \text{total number of functional classes of pollinators of the two species})$. Values of this index vary from 0 (no isolation) to 1 (total isolation).

For sexually deceptive species, due to their highly specialized pollination strategy (Kullenberg 1961; Schiestl et al. 1999; Schiestl 2005) and to the accurate knowledge of *Ophrys* pollinators, we used data on pollinators without unify them in functional classes.

Postmating isolation

Hand-pollination experiments were performed in the Botanic Garden of Naples during the springs of 2004 and 2005 in order to measure postmating isolation indices.

All the plants were collected, at least one year before using them for crossing experiments, in two National Parks of Southern Italy, namely "*Cilento e Vallo di Diano*" and "*Vesuvio*".

In order to prevent uncontrolled pollination, the plants, before blooming, were placed in a cage covered with a thin net. Pollination experiments were performed removing pollinaria as soon as the flowers opened by tipping the anther cap with a plastic toothpick and placing them on the flower stigma of other plants of the same species (intraspecific pollination), and of a different species (interspecific pollination). We took care to pollinate part of the flowers of the same plant with pollen of the same species and part with pollen of a different species excluding

the first and the last flower of the spike. All crosses were performed bidirectionally with each species providing and receiving pollen.

Crosses were carried out between species belonging to two groups of Mediterranean orchids clearly defined by their pollination biology: sexually deceptive group (10 species belonging to the genus *Ophrys*) and food deceptive group (19 species belonging to the genera *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Neotinea* and *Orchis*).

Ripe fruits, when produced, were collected and stored in silica gel and refrigerated at 4°C in order to prevent their degradation. To highlight the presence of viable embryos, seeds from each fruit were then coloured by immersion in a 50% solution of lactic acid overnight (Cafasso et al. 2005). We choose this protocol after having also tested TTC protocol (Lakon 1949; Vujanovic et al. 2000), and having detected no significant differences in the percentage of viable seeds between the two methods. Coloured seeds were subsequently observed under an optical microscope with 100 enlargement and seeds were assigned to two categories (viable and unviable seeds) due to the presence or the absence of viable embryos. In crosses that produced less than 3 fruits all of those were used; in crosses that produced more than 3 fruits at least 3 fruits were used. We tallied at least 300 seeds per fruit.

In orchids, the female gametophyte development and subsequent ovary enlargement (i.e. fruit formation) is triggered by a signal produced by the pollen on the stigma (Zhang and O'Neill 1993), therefore the hand-pollination experiment allow us to individuate two stages of postmating reproductive isolation: postmating prezygotic isolation (ovule development, i.e. fruit formation) and postmating postzygotic (seeds viability). The effects of both these stages were evaluated as the combined postmating index.

Postmating prezygotic isolation (Post_{prezygotic}) was defined as the proportion of fruit formation in pollination attempts between species, relative to the proportion of fruit formation in pollination attempts within each parental species: Post

$\text{prezygotic} = 1 - (\% \text{ fruit formation in interspecific crosses} / \% \text{ fruit formation in intraspecific crosses})$ (McDade and Lundberg 1982).

Postmating postzygotic isolation ($\text{Post}_{\text{postzygotic}}$) was therefore calculated as the proportion of viable seeds in pollination attempts between species, relative to the proportion of viable seeds in pollination attempts within each parental species: $\text{Post}_{\text{postzygotic}} = 1 - (\% \text{ viable seeds in interspecific crosses} / \% \text{ viable seeds in intraspecific crosses})$.

For each cross, the number of seeds with viable embryo was used as the measure of embryo mortality (i. e. postmating postzygotic isolation) but obviously this value depends on the number of corresponding empty or unviable seed. A lack of fertilization of ovules by the heterospecific pollen cells (a prezygotic barrier) may also cause the production of empty or unviable seed in interspecific crosses. We assume, however, that, because we directly observing ripe seeds and not fecundated ovules, this causes was only responsible of a small fraction of unviable seeds (Zhang and O'Neill 1993).

Where we miss results of intraspecific crosses (for 9 species), we averaged results of all intraspecific crosses to obtain a mean value. This value was then used for the calculation of reproductive isolation for these nine species.

The combined postmating isolation was calculated, as suggested in Moyle et al. (2004), as the linear sequential combination of prezygotic and postzygotic isolation measures: $\text{Post}_{\text{combined}} = \text{Post}_{\text{prezygotic}} + (1 - \text{Post}_{\text{prezygotic}}) \times \text{Post}_{\text{postzygotic}}$. All measures of isolation varied between 0 (no isolation) and 1 (complete isolation).

Occasionally, interspecific crosses did better than intraspecific. When it occurred, reproductive isolation value was set to zero (Coyne and Orr 1989, 1997; Moyle et al. 2004).

In all circumstances but 11 combinations, where crosses were performed in one direction only, reproductive isolation was calculated as the average of crossing results where each species was both used as pollen donor and receiver.

Asymmetry in reproductive isolation

The strength of reproductive isolation may significantly differ depending on which species is used as a pollen parent and which is used as a seed parent (Tiffin et al. 2001), therefore asymmetries were calculated at each of the postmating stages of isolation (i.e. fruit formation and seeds viability).

Fisher's exact tests (Fisher 1922) were used to test whether the success of a cross was significantly affected by which species was the pollen parent and which species was the seed parent. Separate tests were conducted for each of the stages at which postmating isolation was measured. Computation for the asymmetry were performed both using the full dataset and using only phylogenetically independent species pairs.

We also correlated the presence of asymmetry with the premating isolation index to test whether degrees of asymmetries in reproductive isolation between species could be affected by the overlap in pollination biology of these species.

Correlations between reproductive isolation and genetic distance

We calculated genetic distances from the internal transcribed spacers (ITS), using sequences obtained from GeneBank or available upon request. Sequences were hand-aligned in Bioedit (Hall 1997) and genetic distances were then calculated in PAUP* 4.0 (Swofford 1999) under the best fit model of molecular evolution choose with Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 1998).

Being all the species involved in multiple crosses, a lot of datapoints within each dataset were not statistically independent. To make sure that the observations were phylogenetically and statistically independent, with the aim of assess the strength of relationship between reproductive isolation and genetic distance, we used two alternative methods. First, we used Coyne and Orr (1989) modification of Felsenstein's (1985) phylogenetically independent contrasts (PIC) method: we generated a reduced set of phylogenetically "corrected" species pairs, using nested averaging to reduce all pairwise comparisons across each internal

phylogenetic node to a single comparison (Fitzpatrick 2002). Second, we selected strictly independent species pairs in both groups in order to maximize the number of pairs that could be obtained from the available dataset (Felsenstein 1985). We used available published phylogenies estimated from molecular data (Bateman 2003; Aceto et al. 1999; Cozzolino et al. 2001; Soliva et al. 2001; Devey et al. in prep.), while phylogenies based on morphology were not used. Being the genetic distance and the isolation data not normally distributed, to test association between them, we used the nonparametric Kendall's τ rank correlation for full, corrected and strictly independent datasets using SPSS 13.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Comparisons between the two groups

Food deceptive group embodies species with a wide range of genetic distance (from 0,0084 to 0,4821), while sexually deceptive species are more genetically homogeneous (from 0 to 0,0319). Therefore, to test for the differences in the rates of evolution and in the strength of postmating reproductive isolation between the two groups, according to Coyne and Orr (1989), we reduced the dataset to all the interspecific crosses falling in the overlapping interval of genetic distance (from 0,0084 to 0,0319). Then, on this new dataset, we calculated evolutionary rates as the slope of the regression between reproductive isolation and genetic distance (Coyne and Orr 1989). Afterwards, in order to test for differences in the strength of reproductive isolation between food and sexually deceptive orchids, we checked for quantitative differences in the means of reproductive isolation values using a Mann-Whitney U test (Coyne and Orr 1989).

RESULTS

Premating isolation

In literature survey, pollinators have been reported for 18 food deceptive species included in the hand-pollination experiment (i.e. all species but *Neotinea lactea*) and for all sexually deceptive species. Comparisons of the available pollinator lists showed a widespread overlap in the set of pollinators among food deceptive species (dataset of pollinator list are available upon request from the first author). Following the Robertson's classification (1928) as suggested by Fenster et al. (2004), all reported pollinators fall into six functional classes: *Diptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *long tongued bees*, *short tongued bees* and *other Hymenoptera* (see table 1). The most part of the examined food deceptive species are pollinated by Hymenoptera (83,3%), the most of which (93,3%) are mainly adapted to *long tongued bee*'s pollination.

All food deceptive species are pollinated by more than one insect species. Only five food deceptive orchid species have been found to be pollinated exclusively by insects belonging to one functional class. Remaining food deceptive species are pollinated at least by insects belonging to two functional classes. The main part of food deceptive species combinations (76,4%, excluding *Neotinea lactea* for which we have no data on pollination) showed an overlap in the pollinator set. Premating isolation index values range from 0 to 1 with a mean of 0,70. How argued before, sexually deceptive species are all only pollinated by a single insect species and do not present any overlap in pollinators, therefore they are completely isolated.

Postmating isolation

We obtained postmating isolation data from manual crossing experiments. All crosses that produced fruits in the first experimental season (spring 2004) were repeated in the spring 2005 in order to confirm the data. A total of 5377 interspecific hand-pollination attempts were performed.

We obtained interspecific isolation data for 161 crossing combinations (125 in food deceptive species and 36 in sexually deceptive), involving all 29 species (10 sexually deceptive and 19 food deceptive) (see table 2). Interspecific crosses have been performed on a mean of 33,4 flowers (summing crosses performed in both possible directions). Intraspecific crosses have been performed on 18 food deceptive species and on 2 sexually deceptive species, on a mean of 12,4 flowers. How expected, intraspecific crosses did significantly better than interspecific for fruit production (intraspecific crosses 85,7%, interspecific crosses 44,2%. Mean difference = - 41,5; $t = -5,818$; $P = 0,000$) and for seeds viability (intraspecific crosses = 72,7%, interspecific crosses 26,5%; mean difference = - 46,2, $t = -7,459$; $P = 0,000$).

Both investigated stages of postmating isolation contribute to the reduction of gene flow in food deceptive species. Only 33,8% of manual crosses performed among food deceptive species triggered the development of fruits and the mean content of viable seeds in these fruits was 17,6%. Consequently, the mean of all postmating prezygotic indices in this group is 0,60, while the mean of postmating postzygotic is 0,77. The mean of all combined postmating isolation indices turn out to be of 0,90, with 66,4% of interspecific crosses showing almost totally isolation (i.e. combined postmating barriers $\geq 0,95$).

Conversely, in sexually deceptive orchids, in spite of a strong premating isolation, we found a weak or null role for postmating barriers. In fact, 80,4% of the hand-pollinations that we performed triggered the development of fruits and viable seeds content was on average 51,7%. Thus, in sexually deceptive orchids, the mean of all postmating prezygotic indices was 0,20, while the mean of all postmating postzygotic was 0,20. The mean of all combined postmating isolation indices was 0,35.

Asymmetries in reproductive isolation

Postmating prezygotic isolation based on fruit formation (Post_{prezygotic}), have been found to be strongly affected by the presence of asymmetries (see fig.1). In

the food deceptive group we gathered bidirectional results from 123 crossing combinations. Between these, the 75,6% displayed significant differences in the reciprocal crosses when a species was used as a pollen parent with respect to when was used as a seed parent (66,7% using only phylogenetically independent species pairs). At the same stage of reproductive isolation sexually deceptive species pairs have not shown the same pattern. Here we found 7 species pairs only to be asymmetric on a total of 27 bidirectional crossing combinations performed (25,9%; 0% using phylogenetically independent species pairs).

When pollinations lead to the fruit development, seeds viability in both food and sexually deceptive groups resulted scantily affected by the presence of asymmetries: 9 species pairs on 38 crossing combination = 23,7 % in food deceptive group (20% using phylogenetically independent species pairs); 3 species pairs on 27 crossing combination = 11,1 % in sexually deceptive group (0% using phylogenetically independent species pairs).

Finally, we found that asymmetries were not affected, within the food deceptive group by the amount of overlap in pre-mating isolation.

Relationships between reproductive isolation and genetic distance

The strength of association between reproductive isolation and genetic distance differed quantitatively and qualitatively between and within food deceptive and sexually deceptive orchids (see table 3 and fig. 2).

We found no correlation between pre-mating isolation and genetic distance in food deceptive group (full dataset: Kendall's $\tau = -0,002$, $P = 0,973$; PIC procedure: Kendall's $\tau = 0,214$; $P = 0,232$; Strictly independent: Kendall's $\tau = -0,038$, $P = 0,899$). In sexual deceptive orchids, pre-mating isolation values is a constant (1) and therefore was not possible to perform correlations.

In both groups the post-mating prezygotic isolation, namely the proportion of fruit formation in interspecific crosses referred to the intraspecific crosses, displayed no significant correlations with the genetic distance (food deceptive group: full dataset: Kendall's $\tau = 0,029$, $P = 0,642$; PIC procedure: Kendall's $\tau =$

0,033, $P = 0,850$; Strictly independent: Kendall's $\tau = 0,056$, $P = 0,835$. Sexually deceptive group: full dataset: Kendall's $\tau = 0,004$, $P = 0,977$; PIC procedure: Kendall's $\tau = 0,071$, $P = 0,805$; Strictly independent: Kendall's $\tau = -0,316$, $P = 0,448$). When hand-pollinations triggered the development of fruits, the proportion of viable seeds (i.e. postmating postzygotic isolation) in food deceptive group turn out to be positively correlated with genetic distance (full dataset: Kendall's $\tau = 0,595$, $P = 0,000$; PIC procedure: Kendall's $\tau = 0,574$; $P = 0,001$; Strictly independent: Kendall's $\tau = 0,571$; $P = 0,048$). On the other hand, in sexually deceptive group seeds viability did not result significantly associated with genetic distances between species (full dataset: Kendall's $\tau = -0,031$, $P = 0,801$; PIC procedure: Kendall's $\tau = -0,357$; $P = 0,216$; Strictly independent: Kendall's $\tau = -0,400$; $P = 0,327$).

Differences in the strength of postmating reproductive isolation among food deceptive and sexually deceptive groups

9 interspecific crosses between food deceptive species and 33 between sexually deceptive species fall in the overlapping interval of genetic distance (from 0,0084 to 0,0319).

Within this interval of genetic distance we found no correlation between reproductive isolation and the genetic distance at each stage of reproductive isolation (in food deceptive group, Post_{prezygotic}: $\tau = 0,028$, $P = 0,917$; Post_{postzygotic}: $\tau = 0,048$, $P = 0,881$; Post_{combined}: $\tau = 0,141$, $P = 0,600$. In sexually deceptive group, Post_{prezygotic}: $\tau = 0,017$, $P = 0,897$; Post_{postzygotic}: $\tau = 0,033$, $P = 0,797$; Post_{combined}: $\tau = 0,004$, $P = 0,975$) and therefore we were unable to evaluate rates of evolution and to calibrate a speciation clock (Presgraves 2002). However, we found that within this interval of genetic distance the contribution of postmating barriers to the maintenance of species boundaries was more relevant in the food deceptive than in the sexually deceptive group (Mann-Whitney U test: $Z = -2,349$, $P = 0,019$). Prezygotic isolation (i.e. fruit formation) was significantly stronger among food deceptive species (Mann-Whitney U test:

$Z = -2,722$, $P = 0,006$), contrarily to postzygotic isolation that have been found to be no significantly different between the two groups (Mann-Whitney U test: $Z = -1,141$, $P = 0,254$) (see Fig. 3). These results are not an artifact of different average genetic distance among the species pairs, in the food deceptive and sexually deceptive groups, being this average value nearly identical in the two groups within the overlapping interval (mean of genetic distance among food deceptive species: 0,017; mean of genetic distance among sexually deceptive species: 0,020; mean difference = 0,0035, $t = -1,347$, $P = 0,186$).

DISCUSSION

Pre and post mating isolation

While the premating barriers includes pollinator specificity, phenology and geographic isolation, postmating mechanisms may results from prezygotic and postzygotic mechanisms. The former includes pollen-stigma and spermatic nuclei-ovule interactions, the latter includes seed (embryo) quality, hybrid viability and sterility.

Natural selection mediated by pollinators have been traditionally considered a major cause of the adaptive radiation of flowers and, as a consequence, of speciation in entomophilous plants (Grant 1949, 1971; Pijl 1960; Grant and Grant 1965; Stebbins 1970; Macior 1971; Kiestler et al. 1984). This view has been particularly exaggerated in orchid evolution with the widespread idea that pollinators drive speciation.

In our study, for the first time using a phylogenetic framework, we quantified through an estimation of pollinator isolation the strength of barriers due to pollination specialization in two groups of deceptive orchids.

As also indicated by previously experimental evidences (Neiland and Wilcock 1999; Cozzolino et al. 2005) here, we report a wide overlap in the pollinator set in the food deceptive group and a total isolation among the specialized sexually deceptive species.

All species pairs in the present dataset may coexist sympatrically showing or no significant postmating isolation (sexually deceptive orchids) thus suggesting that other, premating, barriers are important or have a strong intrinsic postzygotic isolation (food deceptive orchids). In this latter case, it is clear that intrinsic postzygotic isolation significantly contributes to the maintenance of the integrity of sympatric food deceptive species. This finding sharply contrast with several claims that intrinsic postzygotic isolation is of little relevance to speciation in orchids (Gill 1989). Indeed, we report a significant presence of postmating isolation (both pre and postzygotic) in maintenance of species boundaries in the food deceptive species pairs.

Asymmetries in reproductive isolation

Presence of asymmetric barriers have been reported for prezygotic isolation in animals as *Drosophila* (Kaneshiro 1980), salamanders (Arnold et al. 1996), leaf beetles (Funk 1998) and in several plant species (e.g. Grant 1954; Lewis and Crowe 1958; Rick 1963; Kiang and Hamrick 1978; Prentice 1978; Tiffin et al. 2001). In orchids, we also found a significant presence of asymmetries in reproductive isolation. However, our comparative results indicate that this patterns could be strongly variable, depending on the pollination biology of the examined plant group. Indeed we found significant evidence of post mating asymmetry only in food deceptive species that have lower pollination specificity and premating isolation than sexually deceptive species. We did not find any correlation between the pollinator overlapping and occurrence of asymmetry. Even if more detailed studies are needed, this finding suggests that sympatric coexistence and pollinator overlap do not promote a selective response (a sort of reinforcement) in these orchids. Other prezygotic mechanisms may account for the observed asymmetries in the fruit set as differences in style length (Kiang and Hamrick 1978; Sorensson and Brewbaker 1994) and differential fruit abortion (Levin 1978; Howard *et al.* 1998). Although our data do not allow a rigorous evaluation of the relative importance of these mechanisms, the patterns

of the asymmetries in our orchids may be consistent with these alternative mechanisms.

Additionally, within food deceptive orchids, asymmetry was only found in the postmating prezygotic stage. The presence of asymmetries at this stage of isolation could be caused by mechanisms other than fixation of incompatible nuclear alleles or chromosomal rearrangements in which case we would expect a lack of asymmetries (Tiffin et al. 2001). On the contrary, we did not find significant asymmetry in a later stage of postmating isolation, as seed set, where, more likely, these genetic factors are more influent.

Correlation with genetic distance

Previous studies in animal systems concur in establishing a strong correlation between postzygotic reproductive isolation and genetic distance among species (Coyne and Orr 1989, 1997; Presgraves 2002; Sasa et al. 1998; Price and Bouvier 2002). In plants, similar analysis indicated a more varied set of relationships ranging from consistently large positive correlations to associations that are weak or absent (Moyle et al. 2004).

We found an high correlation between postzygotic isolation and genetic distance in the food deceptive orchid group. Degree of postzygotic isolation in food deceptive orchids increase with genetic distance and, we can assume, with time of divergence between taxa. The increase of intrinsic postzygotic isolation with time (i.e. with genetic distance) is consistent with most theories of speciation in which isolation is the by-product of gradual genetic divergence.

This stage of isolation, thereby, appear to be strictly dependent by the amount of genome differences between parental species (Moyle et al. 2004; Coyne and Orr 1989). Our findings of a strong correlation between postzygotic isolation and genetic distance in food deceptive orchids also suggest that, in this group, reproductive isolation could be achieved by the mean of many genes of small effect (Coyne and Orr 1998; Edmands 2002).

In spite of few example of a rough correlation with species divergence (Knowlton et al. 1993; Tilley et al. 1990), generally prezygotic isolation is generally believed to evolve more rapidly and erratically than does postzygotic isolation. In other cases (Gleason and Ritchie 1998; Panhius et al. 2001) and in our case, we found no correlation between prezygotic isolation and parental divergence.

In this context, the lack of correlation between prezygotic isolation (i.e. female gametophyte development leading to fruit set) and genetic distance, being this stage of isolation due to biochemical factors involved in pollen-stigma interaction (Zhang and O'Neill 1993) could be more influenced by ecological factor or by the action of natural selection in sympatry and may explain why some species pairs (as *O. mascula* and *O. provincialis*, for instance) in spite of a low genetic distance showed strong prezygotic isolation (i.e. no fruits production when manually crossed).

These selected examples support the conclusion that acquisition of the reproductive isolation (not taking in account only a single specific stage) is not sufficiently clock-like to make parental divergence always a reliable predictor of reproductive compatibility (Edmands 2002).

In sexually deceptive group, the lack of correlation between both stages of post mating reproductive isolation (pre and postzygotic) and genetic distance among species can be explained because sexually deceptive orchids are considerable younger than species in food deceptive orchids with insufficient time to accumulate postmating reproductive isolation between taxon pairs. This may be a common pattern among recently derived taxa (Edmands 2002). Alternatively the absence of correlation may be explained by a slower (or reduced) evolution of postmating isolation in a plant group where strong premating isolation exists. The latter hypothesis finds support in the comparison of reproductive isolation between sexually and food deceptive species within the same interval of genetic divergence (see below).

Differences in the rates of evolution and in the strength of reproductive isolation between food and sexually deceptive orchids

Elucidate the time-course of the evolution of reproductive isolation mechanisms is a key point in order to clarify speciation process (Coyne and Orr 2004).

All food deceptive species pairs and 61,1% of sexually deceptive species pairs in the present dataset showed some postzygotic isolation (isolation index > 0). However in order to gather comparative trends in the evolution of reproductive isolation we have only used species pairs of both deceptive group falling in a common interval of genetic divergence. Within this interval we found no association between reproductive isolation mechanisms (pre and postzygotic) with species divergence in both orchid groups. Consequently, at this level of divergence we were unable to observe any rough speciation clock for both indexes (as found, for instance in Presgraves 2002).

More likely, this observed lack of association between postzygotic isolation and distance could result, as argued before, from insufficient time to accumulate genetic barriers and the develop the observed association between genetic divergence and postzygotic isolation that was observed within all range of genetic distance.

However, within this common interval of species divergences we were able to compare the strength and the relative importance of the different stages of isolation between the two orchid groups. In particular, at the same stage of genetic divergence (i.e. within the overlapping interval of genetic distance) we found a difference (but no significant) in the amount of postzygotic isolation between the two groups and we found a significantly higher postmating prezygotic isolation in a food deceptive group than in the sexually deceptive group. This finding may indicate that, in absence of strong premating isolation, species have to develop postmating isolation. Within this context, by using genetic distance as a proxy of divergence time between species, is clear that

postmating isolation, both pre and postzygotic, evolved faster in food deceptive than in sexual deceptive group.

Among sympatric taxa, prezygotic isolation was found to evolve faster than postzygotic isolation, a difference typically attributed to reinforcement (Coyne and Orr 1997). In our study, due to lack of correlation between postmating prezygotic barriers and genetic distance we are unable to estimate if, as observed in other animal and plant groups, prezygotic barriers (fruit set) evolved faster than postzygotic ones (as seed set).

However, the comparison of strength differences in pre and postzygotic isolation between food and sexually deceptive species within a common genetic interval may suggest that, even in the early stage of species divergence, while selective factors strengthen the evolution of prezygotic isolation, postzygotic isolation, evolves in more constant clocklike manner. This is an indication that this stage of isolation simply generated as a by-product of genetic divergence among species (and independently of the amount of existing premating isolation) (Coyne and Orr 1989, 1997; Sasa et al. 1998; Presgraves 2002; Moyle et al. 2004).

Speciation inferences

Estimations of the amount of premating isolation mechanisms among multiple closely related species are essential to comprehensively assess relative rates of evolution at pre and postzygotic stage (Moyle et al. 2004; Ramsey et al. 2003) and to infer pattern of speciation. Here, we examined the extent to which intrinsic postmating isolation is present between related orchid deceptive species. If it is small, other causes of reproductive isolation, as premating ones, are invoked in the speciation process (Price and Bouvier, 2002). On the contrary, if post mating isolation are present, more likely they can also represent the basis of speciation process, as it has been enhanced by recent work on the genetic architecture of speciation, which points to > 100 interacting genes in some cases and chromosomal rearrangements in others (Wu 2001).

Our research, highlights that in closely related groups such as in food and sexually deceptive orchids, difference in pollination specificity (i.e. different amount of early pre-mating isolation) could be mirrored in different strength and evolutionary rates of subsequent stages of post-mating reproductive isolation and, more likely, the ways by which species arise.

In sexually deceptive orchids, estimation of reproductive isolation indicates that species boundary are mostly secured by pre-mating isolation as pollinator specificity. This may be the first (if not the only) mechanism to evolve and thus that, in this group, the shift to new unique specific pollinators must be a common way for speciation. In plant group relying on pre-mating barriers, reproductive isolation could be achieved by the mean of few genes of great effect (Ramsey 2003; Edmands 2002). In our sexually deceptive orchids, these genes could be, for instance, those encoding for reproductive traits like the floral fragrance involved in the complex architecture of the sexual deception. In these genes, a casual mutation could produce the shift to a new pollinator and therefore could immediately raise pre-mating isolation (Schiestl and Ayasse 2002) even without significant genetic differentiation among species as we have found (Cozzolino and Widmer 2005).

On the contrary, in the food deceptive orchids, we found that pre-mating barriers based on pollination specialization are weak, and sometime totally absent. Therefore, the shift to new pollinators doesn't appear to represent the main speciation mechanisms in this group. Indeed, only few sporadic evidence for pollinator shifts within food deceptive have been reported (Cozzolino et al. 2001; Aceto et al. 1999). For instance, *Anacamptis pyramidalis* is the only species that explores a food deceptive moth pollination strategy (Nazarov and Efetov 1993) among a guild of taxa mainly based on a food deceptive bee pollination strategy even if several different pollinators have been reported for this species. Similarly, *Orchis quadripunctata* is the only species adapted to an exclusive food deceptive fly pollination (Cozzolino et al. 2005) in an *Orchis* s.s. clade in

which species are typically adapted for bee pollination. In general, in food deceptive groups, most of the sister species still retain the same pollination syndrome and often their pollinators belong to the same functional class.

These different patterns could also indicate that while sexually deceptive species may follow a punctualistic model of speciation, (speciation via hybridization or mutation in few genes), food deceptive species may evolve according to a gradualistic model of accumulation of reproductive isolation. Accordingly, in food deceptive group, postmating (both pre and postzygotic) barriers appear to be the most important factors in maintaining species isolated. The clock-like insurgence of postzygotic isolation suggest that the accumulation of incompatibilities could evolve gradually, more likely in absence of gene flow among incipient species (i.e. in geographically isolated populations). This suggest that allopatric speciation in isolated population could be the main speciation process in orchids with a low pollination specificity. In this context, postmating prezygotic isolating mechanisms (i.e. the lack of fruit formation) could represent an isolation mechanism acting in late stages of speciation process because natural selection strengthens factors that prevent the production of unfit hybrids and the waste of gametes when secondary contact among species that share pollinators occur.

AKNOWLEDGMENTS

The authors thank P. Tiffin for the useful suggestions on statistical analyses; Dion Devey for providing unpublished ITS sequences for two *Ophrys* species and C. Salzmann for help with seeds coloration protocol. We also thank A. Croce, A. M. Nardella and M. Moccia for their help with field work; R. Coppola and C. Cerrone for helping with manual crosses; V. Avolio, S. Giorgio, and G. Napolitano, members of the staff of Naples Botanical Garden, for support in the plants collection. The authors also thank the “Cilento e Vallo di Diano” and the “Vesuvio” National Parks for issuing collecting licences and logistical support. Funding for this study was provided by the PRIN program 2005.

TABLES AND FIGURES

Functional classes of pollinators							
	Coleoptera	Diptera	Other Hymenoptera	Long tongued	Short tongued	Lepidoptera	Number of classes involved
<i>Orchis mascula</i>	-	+	-	+	+	+	4
<i>O. pauciflora</i>	-	+	-	+	-	+	3
<i>O. provincialis</i>	-	-	-	+	-	-	1
<i>O. quadripunctata</i>	-	+	-	-	-	-	1
<i>O. anthropophora</i>	+	+	+	-	-	-	3
<i>O. simia</i>	+	+	-	+	+	+	5
<i>O. italica</i>	-	-	-	-	+	-	1
<i>O. purpurea</i>	+	-	-	+	-	-	2
<i>Anacamptis palustris</i>	-	-	-	+	-	-	1
<i>A. pyramidalis</i>	+	+	+	+	-	+	5
<i>A. laxiflora</i>	-	-	-	+	-	-	1
<i>A. morio</i>	-	-	-	+	+	+	3
<i>A. papilionacea</i>	-	-	+	+	-	+	3
<i>Neotinea ustulata</i>	+	+	-	-	-	-	2
<i>N. tridentata</i>	+	+	-	+	+	+	5
<i>Dactylorhiza sambucina</i>	-	-	-	+	+	+	3
<i>D. saccifera</i>	+	+	-	+	-	+	4
<i>D. romana</i>	-	-	-	+	-	-	1

TABLE 1: Premating isolation in the food deceptive group. +/- = presence/absence of pollinator species for the functional class.

species 1	species 2	N° of replicas	Genetic distance	Deceptive pollination strategy	pre mating	postmating prezygotic	postmating postzygotic	combined postmating
<i>O. purpurea</i>	<i>O. simia</i>	47	0,009	food	0,60	0,35	0,09	0,40
<i>N. ustulata</i>	<i>N. lactea</i>	46	0,020	food	-	0,40	0,02	0,42
<i>O. mascula</i>	<i>O. provincialis</i>	100	0,015	food	0,75	1	-	1
<i>O. italica</i>	<i>O. anthropophora</i>	75	0,026	food	1	0,51	0,04	0,53
<i>N. ustulata</i>	<i>N. tridentata</i>	30	0,022	food	0,60	0,79	0,51	0,90
<i>O. mascula</i>	<i>O. pauciflora</i>	65	0,045	food	0,25	0,06	0,20	0,25
<i>N. tridentata</i>	<i>N. lactea</i>	50	0,029	food	-	0,27	0,30	0,49
<i>O. purpurea</i>	<i>O. anthropophora</i>	35	0,044	food	0,75	1,00	-	1
<i>O. pauciflora</i>	<i>O. provincialis</i>	34	0,055	food	0,67	0,55	0,75	0,89
<i>O. italica</i>	<i>O. purpurea</i>	46	0,050	food	1	0,53	0,37	0,70
<i>O. provincialis</i>	<i>O. quadripunctata</i>	75	0,066	food	1	0,75	0,00	0,75
<i>O. mascula</i>	<i>O. quadripunctata</i>	81	0,066	food	0,75	0,52	0,16	0,59
<i>O. simia</i>	<i>O. anthropophora</i>	31	0,051	food	0,67	0,57	0,52	0,79
<i>O. italica</i>	<i>O. simia</i>	30	0,062	food	0,80	1,00	-	1
<i>O. anthropophora</i>	<i>O. mascula</i>	67	0,066	food	0,83	0,49	0,43	0,71
<i>O. purpurea</i>	<i>O. mascula</i>	45	0,078	food	0,80	1,00	-	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>A. palustris</i>	43	0,090	food	0,00	0,14	0,35	0,44
<i>O. anthropophora</i>	<i>O. provincialis</i>	60	0,066	food	1	0,59	0,94	0,98
<i>O. italica</i>	<i>O. mascula</i>	57	0,072	food	0,75	0,13	0,75	0,78
<i>O. purpurea</i>	<i>O. provincialis</i>	41	0,079	food	0,50	0,73	0,44	0,85
<i>O. pauciflora</i>	<i>O. quadripunctata</i>	29	0,099	food	0,67	0,57	0,12	0,62
<i>O. italica</i>	<i>O. provincialis</i>	76	0,072	food	1	0,59	0,67	0,86
<i>O. simia</i>	<i>O. mascula</i>	33	0,085	food	0,20	0,62	0,59	0,85
<i>O. simia</i>	<i>O. provincialis</i>	37	0,086	food	0,80	0,62	0,49	0,81
<i>O. anthropophora</i>	<i>O. pauciflora</i>	55	0,094	food	0,75	0,16	0,73	0,78
<i>O. italica</i>	<i>O. pauciflora</i>	40	0,101	food	1	0,30	0,47	0,63

Table 2: Pairwise genetic distance and reproductive isolation indices for the 161 species pairs.

species 1	species 2	N° of replicas	Genetic distance	Deceptive pollination strategy	pre mating	postmating prezygotic	postmating postzygotic	combined postmating
<i>O. purpurea</i>	<i>O. pauciflora</i>	49	0,110	food	0,75	0,58	0,31	0,71
<i>O. italica</i>	<i>O. quadripunctata</i>	32	0,107	food	1	0,66	0,46	0,82
<i>O. simia</i>	<i>O. pauciflora</i>	22	0,122	food	0,40	0,55	0,48	0,76
<i>O. anthropophora</i>	<i>O. quadripunctata</i>	65	0,110	food	0,67	0,00	0,57	0,57
<i>O. purpurea</i>	<i>O. quadripunctata</i>	29	0,132	food	1	0,73	0,99	1
<i>O. simia</i>	<i>O. quadripunctata</i>	36	0,141	food	0,80	0,57	0,59	0,82
<i>A. papilionacea</i>	<i>A. morio</i>	42	0,175	food	0,25	0,02	0,60	0,61
<i>A. pyramidalis</i>	<i>A. papilionacea</i>	71	0,149	food	0,40	0,85	0,42	0,91
<i>A. pyramidalis</i>	<i>A. morio</i>	46	0,169	food	0,67	0,08	0,51	0,55
<i>O. anthropophora</i>	<i>N. ustulata</i>	30	0,178	food	0,33	1,00	-	1
<i>A. papilionacea</i>	<i>A. laxiflora</i>	30	0,271	food	0,67	0,47	1,00	1
<i>O. anthropophora</i>	<i>N. tridentata</i>	35	0,175	food	0,67	0,56	0,92	0,96
<i>O. anthropophora</i>	<i>N. lactea</i>	30	0,189	food	-	0,00	0,88	0,88
<i>A. pyramidalis</i>	<i>A. laxiflora</i>	45	0,241	food	0,80	0,54	0,00	0,54
<i>O. purpurea</i>	<i>N. tridentata</i>	16	0,187	food	0,60	0,58	1,00	1
<i>O. purpurea</i>	<i>N. ustulata</i>	48	0,200	food	0,67	1,00	-	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>A. morio</i>	42	0,323	food	0,67	0,17	0,79	0,82
<i>O. simia</i>	<i>N. tridentata</i>	18	0,199	food	0,00	1,00	-	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. purpurea</i>	45	0,286	food	0,50	0,88	1,00	1
<i>A. papilionacea</i>	<i>A. palustris</i>	32	0,279	food	0,67	0,44	0,52	0,73
<i>A. morio</i>	<i>O. purpurea</i>	62	0,370	food	0,75	0,40	1,00	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. purpurea</i>	41	0,287	food	1	0,72	0,86	0,96
<i>O. simia</i>	<i>N. ustulata</i>	23	0,212	food	0,60	0,86	0,97	1
<i>O. purpurea</i>	<i>N. lactea</i>	50	0,212	food	-	0,38	0,85	0,90
<i>A. pyramidalis</i>	<i>A. palustris</i>	31	0,264	food	0,80	0,72	0,67	0,91
<i>O. italica</i>	<i>N. tridentata</i>	37	0,192	food	0,80	1,00	-	1

TABLE 2: Pairwise genetic distance and reproductive isolation indices for the 161 species pairs.

species 1	species 2	N° of replicas	Genetic distance	Deceptive pollination strategy	prematuring	postmaturing prezygotic	postmaturing postzygotic	combined postmaturing
<i>O. simia</i>	<i>N. lactea</i>	30	0,225	food	-	0,47	0,99	1
<i>O. italica</i>	<i>N. ustulata</i>	52	0,205	food	1	0,70	0,96	0,99
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. simia</i>	24	0,316	food	0,80	0,96	1,00	1
<i>A. palustris</i>	<i>A. morio</i>	49	0,322	food	0,67	0,21	0,86	0,89
<i>A. morio</i>	<i>O. mascula</i>	90	0,366	food	0,25	0,51	1	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. simia</i>	29	0,316	food	0,80	0,72	1	1
<i>A. morio</i>	<i>O. anthropophora</i>	48	0,336	food	1	0,33	1	1
<i>A. morio</i>	<i>O. provincialis</i>	51	0,374	food	0,67	0,55	1	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. anthropophora</i>	46	0,325	food	1	0,45	1	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. mascula</i>	25	0,373	food	0,75	1,00	-	1
<i>O. provincialis</i>	<i>N. ustulata</i>	27	0,240	food	1	1,00	-	1
<i>O. provincialis</i>	<i>N. tridentata</i>	28	0,242	food	0,80	1,00	-	1
<i>O. italica</i>	<i>N. lactea</i>	50	0,217	food	-	0,63	0,90	0,96
<i>A. morio</i>	<i>O. italica</i>	47	0,328	food	0,67	0,48	1	1
<i>A. morio</i>	<i>O. simia</i>	29	0,400	food	0,40	0,68	1	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. mascula</i>	30	0,347	food	0,80	1,00	-	1
<i>O. mascula</i>	<i>N. ustulata</i>	27	0,244	food	0,80	1,00	-	1
<i>O. mascula</i>	<i>N. tridentata</i>	40	0,246	food	0,20	0,73	0,75	0,93
<i>O. quadripunctata</i>	<i>N. ustulata</i>	44	0,287	food	0,50	0,72	0,53	0,87
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. provincialis</i>	38	0,365	food	0,00	0,79	1	1
<i>A. morio</i>	<i>O. pauciflora</i>	43	0,397	food	0,50	0,12	1	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. quadripunctata</i>	40	0,399	food	1	0,69	1	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. italica</i>	35	0,306	food	1	0,75	1	1
<i>O. provincialis</i>	<i>N. lactea</i>	48	0,263	food	-	0,72	0,99	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. provincialis</i>	32	0,349	food	0,00	0,82	1	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. italica</i>	12	0,291	food	1	1,00	-	1

TABLE 2: Pairwise genetic distance and reproductive isolation indices for the 161 species pairs.

species 1	species 2	N° of replicas	Genetic distance	Deceptive pollination strategy	pre mating	postmating prezygotic	postmating postzygotic	combined postmating
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. purpurea</i>	52	0,343	food	0,75	0,39	0,99	0,99
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. purpurea</i>	28	0,332	food	0,60	0,59	1	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. quadripunctata</i>	21	0,396	food	1	0,56	0,98	0,99
<i>A. pyramidalis</i>	<i>N. ustulata</i>	27	0,283	food	0,60	1	-	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>N. ustulata</i>	39	0,316	food	1	0,90	1	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. pauciflora</i>	16	0,392	food	0,67	1	-	1
<i>A. palustris</i>	<i>O. anthropophora</i>	12	0,316	food	1	1	-	1
<i>O. mascula</i>	<i>N. lactea</i>	48	0,271	food	-	0,51	0,94	0,97
<i>O. pauciflora</i>	<i>N. tridentata</i>	22	0,259	food	0,40	1	-	1
<i>O. quadripunctata</i>	<i>N. tridentata</i>	78	0,281	food	0,80	0,24	0,75	0,81
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. pauciflora</i>	40	0,373	food	0,40	0,68	1,00	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>O. pauciflora</i>	26	0,416	food	0,67	1	-	1
<i>O. pauciflora</i>	<i>N. ustulata</i>	34	0,276	food	0,75	1	-	1
<i>A. pyramidalis</i>	<i>N. tridentata</i>	58	0,281	food	0,33	0,77	0,99	1
<i>O. quadripunctata</i>	<i>N. lactea</i>	33	0,305	food	-	0,10	0,97	0,97
<i>A. laxiflora</i>	<i>N. tridentata</i>	21	0,323	food	0,80	1	-	1
<i>A. palustris</i>	<i>N. ustulata</i>	24	0,304	food	1	1	-	1
<i>A. morio</i>	<i>O. quadripunctata</i>	63	0,441	food	1	0,36	1	1
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. mascula</i>	90	0,353	food	0,50	0,73	1	1
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. simia</i>	35	0,353	food	0,33	0,82	1	1
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. italica</i>	36	0,311	food	1	0,53	0,95	0,98
<i>A. pyramidalis</i>	<i>N. lactea</i>	42	0,291	food	-	0,26	0,97	0,98
<i>A. morio</i>	<i>N. ustulata</i>	57	0,391	food	1	0,87	0,99	1
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. provincialis</i>	54	0,365	food	0,80	0,66	1	1
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. anthropophora</i>	40	0,323	food	0,40	1,00	-	1
<i>O. pauciflora</i>	<i>N. lactea</i>	27	0,289	food	-	0,47	0,91	0,95

TABLE 2: Pairwise genetic distance and reproductive isolation indices for the 161 species pairs.

species 1	species 2	N° of replicas	Genetic distance	Deceptive pollination strategy	prematuring	postmaturing prezygotic	postmaturing postzygotic	combined postmaturing
<i>A. papilionacea</i>	<i>N. tridentata</i>	43	0,320	food	0,67	0,27	1	1
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. italica</i>	49	0,337	food	1	0,49	1	1
<i>A. morio</i>	<i>N. tridentata</i>	41	0,379	food	0,40	0,68	0,97	0,99
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. simia</i>	30	0,372	food	0,67	0,47	1,00	1
<i>A. laxiflora</i>	<i>N. lactea</i>	30	0,336	food	-	0,53	1,00	1
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. mascula</i>	70	0,430	food	0,60	0,66	1,00	1
<i>A. palustris</i>	<i>N. tridentata</i>	46	0,311	food	0,80	0,72	0,97	0,99
<i>A. papilionacea</i>	<i>N. ustulata</i>	35	0,341	food	1	0,36	0,98	0,99
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. anthropophora</i>	35	0,372	food	0,80	0,48	1	1
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. quadripunctata</i>	43	0,482	food	1	0,01	1	1
<i>A. morio</i>	<i>N. lactea</i>	34	0,391	food	-	0,06	1	1
<i>A. papilionacea</i>	<i>N. lactea</i>	22	0,334	food	-	0,00	1	1
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. provincialis</i>	42	0,441	food	0,67	0,42	1	1
<i>A. palustris</i>	<i>N. lactea</i>	20	0,323	food	-	0,89	0,48	0,94
<i>A. papilionacea</i>	<i>O. pauciflora</i>	32	0,459	food	0,50	0,60	1	1
<i>A. pyramidalis</i>	<i>O. quadripunctata</i>	38	0,416	food	0,80	0,76	1	1
<i>D. saccifera</i>	<i>D. romana</i>	10	0,008	food	0,75	0,00	0,30	0,30
<i>D. romana</i>	<i>D. sambucina</i>	12	0,008	food	0,67	1,00	-	1
<i>D. saccifera</i>	<i>D. sambucina</i>	70	0,017	food	0,60	0,20	0,29	0,43
<i>D. romana</i>	<i>A. pyramidalis</i>	13	0,280	food	0,80	0,24	1,00	1
<i>D. romana</i>	<i>O. mascula</i>	17	0,169	food	0,75	0,61	0,98	0,99
<i>O. lutea</i>	<i>O. apifera</i>	7	0,024	sexual	1	0,29	0,03	0,31
<i>O. lutea</i>	<i>O. bertolonii</i>	8	0,024	sexual	1	0,00	0,04	0,04
<i>O. lutea</i>	<i>O. bombyliflora</i>	26	0,015	sexual	1	0,50	0,05	0,52
<i>O. lutea</i>	<i>O. holoserica</i>	12	0,028	sexual	1	0,22	0,27	0,43
<i>O. lutea</i>	<i>O. incubacea</i>	3	0,022	sexual	1	0,00	0,08	0,08

TABLE 2: Pairwise genetic distance and reproductive isolation indices for the 161 species pairs.

species 1	species 2	N° of replicas	Genetic distance	Deceptive pollination strategy	pre mating	postmating prezygotic	postmating postzygotic	combined postmating
<i>O. lutea</i>	<i>O. lacaitae</i>	4	0,032	sexual	1	0,00	0,19	0,19
<i>O. lutea</i>	<i>O. sphegodes</i>	7	0,022	sexual	1	0,00	0,51	0,51
<i>O. lutea</i>	<i>O. tenthredinifera</i>	21	0,015	sexual	1	0,19	0,00	0,19
<i>O. holoserica</i>	<i>O. sphegodes</i>	11	0,008	sexual	1	0,00	0,00	0,00
<i>O. holoserica</i>	<i>O. tenthredinifera</i>	13	0,028	sexual	1	0,00	0,44	0,44
<i>O. holoserica</i>	<i>O. apifera</i>	17	0,021	sexual	1	0,31	0,00	0,31
<i>O. holoserica</i>	<i>O. bertolonii</i>	14	0,010	sexual	1	0,16	0,13	0,27
<i>O. holoserica</i>	<i>O. bombyliflora</i>	11	0,026	sexual	1	0,20	0,00	0,20
<i>O. holoserica</i>	<i>O. incubacea</i>	9	0,008	sexual	1	0,23	0,00	0,23
<i>O. holoserica</i>	<i>O. lacaitae</i>	6	0,003	sexual	1	0,17	0,15	0,29
<i>O. holoserica</i>	<i>O. crabronifera</i>	8	0,008	sexual	1	0,63	0,44	0,79
<i>O. tenthredinifera</i>	<i>O. apifera</i>	9	0,028	sexual	1	0,23	0,24	0,41
<i>O. tenthredinifera</i>	<i>O. bertolonii</i>	3	0,024	sexual	1	0,25	0,00	0,25
<i>O. tenthredinifera</i>	<i>O. bombyliflora</i>	9	0,013	sexual	1	0,00	0,00	0,00
<i>O. tenthredinifera</i>	<i>O. incubacea</i>	3	0,022	sexual	1	0,67	0,00	0,67
<i>O. tenthredinifera</i>	<i>O. lacaitae</i>	3	0,032	sexual	1	0,00	0,00	0,00
<i>O. tenthredinifera</i>	<i>O. sphegodes</i>	8	0,022	sexual	1	0,17	0,27	0,39
<i>O. bertolonii</i>	<i>O. apifera</i>	4	0,021	sexual	1	0,00	0,00	0,00
<i>O. bertolonii</i>	<i>O. sphegodes</i>	3	0,002	sexual	1	0,00	0,40	0,40
<i>O. bertolonii</i>	<i>O. bombyliflora</i>	4	0,022	sexual	1	0,25	0,35	0,51
<i>O. bombyliflora</i>	<i>O. apifera</i>	5	0,026	sexual	1	0,25	0,00	0,25
<i>O. bombyliflora</i>	<i>O. incubacea</i>	4	0,020	sexual	1	0,00	0,75	0,75
<i>O. bombyliflora</i>	<i>O. sphegodes</i>	4	0,020	sexual	1	0,25	0,10	0,32
<i>O. bombyliflora</i>	<i>O. lacaitae</i>	2	0,030	sexual	1	0,50	0,63	0,81
<i>O. lacaitae</i>	<i>O. apifera</i>	4	0,025	sexual	1	0,50	0,16	0,58

TABLE 2: Pairwise genetic distance and reproductive isolation indices for the 161 species pairs.

species 1	species 2	N° of replicas	Genetic distance	Deceptive pollination strategy	prematuring	postmaturing prezygotic	postmaturing postzygotic	combined postmaturing
<i>O. lacaitae</i>	<i>O. incubacea</i>	4	0,012	sexual	1	0,25	0,22	0,41
<i>O. apifera</i>	<i>O. incubacea</i>	5	0,019	sexual	1	0,00	0,00	0,00
<i>O. apifera</i>	<i>O. sphegodes</i>	4	0,019	sexual	1	0,25	0,54	0,66
<i>O. incubacea</i>	<i>O. sphegodes</i>	10	0,000	sexual	1	0,62	0,21	0,70
<i>O. lacaitae</i>	<i>O. sphegodes</i>	2	0,012	sexual	1	0,00	0,56	0,56
<i>O. crabronifera</i>	<i>O. tenthredinifera</i>	6	0,022	sexual	1	0,00	0,00	0,00

TABLE 2: Pairwise genetic distance and reproductive isolation indices for the 161 species pairs.

		Prematuring			Postmaturing prezygotic			Postmaturing postzygotic		
<i>Dataset/analysis</i>		<i>N</i>	<i>Correl</i>	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>Correl</i>	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>Correl</i>	<i>P</i>
Food deceptive	full dataset	110 (18)	-0,002	0,973	125 (19)	0,029	0,642	101 (19)	0,595	0,000
	corrected	17 (18)	0,214	0,232	18 (19)	0,033	0,850	17 (19)	0,574	0,001
	strictly independent	8 (16)	-0,038	0,899	9 (18)	0,056	0,835	8 (16)	0,571	0,048
Sexually deceptive	full dataset	-	-	-	36 (10)	0,004	0,977	36 (10)	-0,031	0,801
	corrected	-	-	-	8 (10)	0,071	0,805	8 (10)	0,357	0,216
	strictly independent	-	-	-	5 (10)	-0,316	0,448	5 (10)	-0,400	0,327

TABLE 3. Correlations between reproductive isolation and genetic distance for food and sexually deceptive orchids. Correlations were calculated separately on data from prematuring, postmaturing prezygotic and postmaturing postzygotic. *N*, total number of species pairs analyzed; in parenthesis, number of unique taxa used in crosses. *Correl*, Kendall's *t*; *P*, significance value.

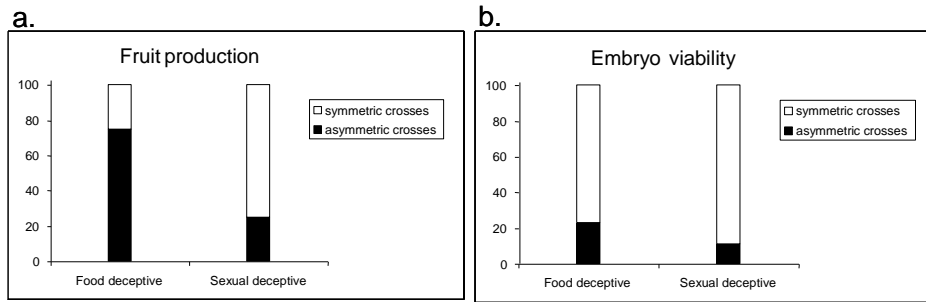


FIGURE 1: Percentage of species pairs affected by asymmetries in postmating reproductive isolation: a. fruit formation (i.e. prezygotic isolation); b. embryo viability (i. e. postzygotic isolation).

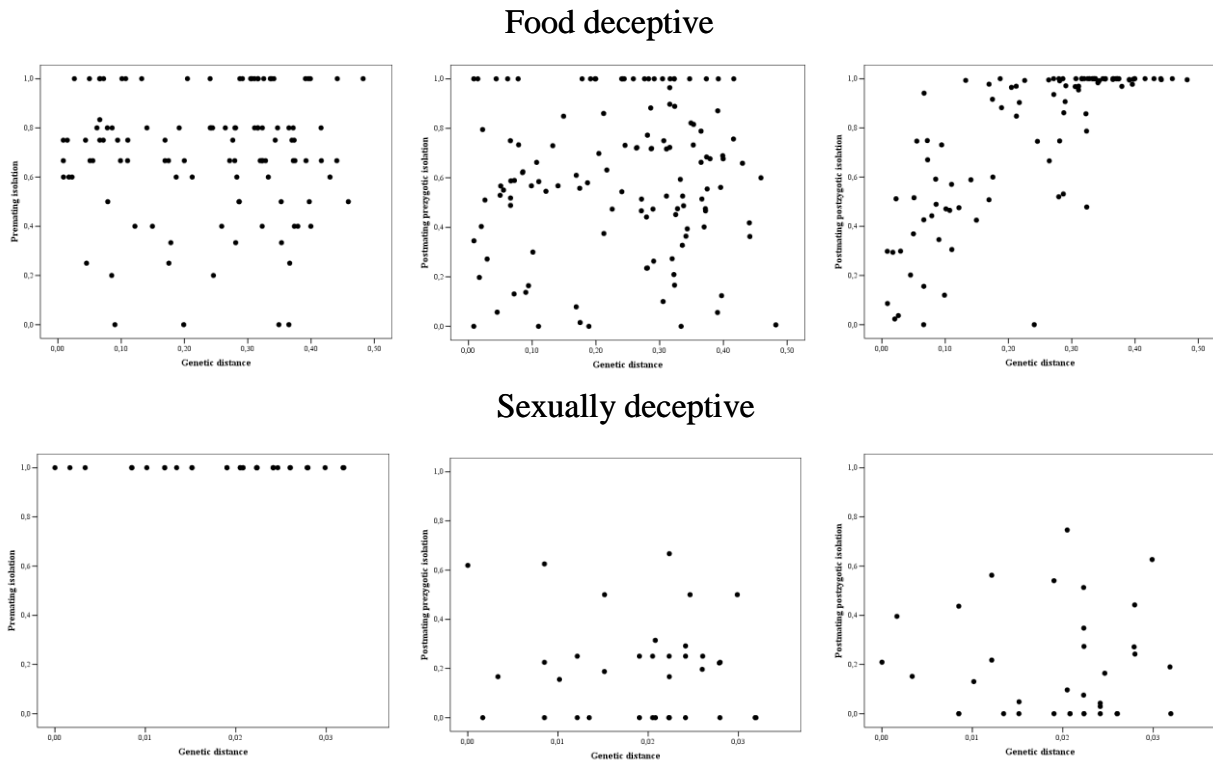


FIGURE 2: Strength of reproductive isolation versus genetic distance in the food and sexually deceptive orchids.

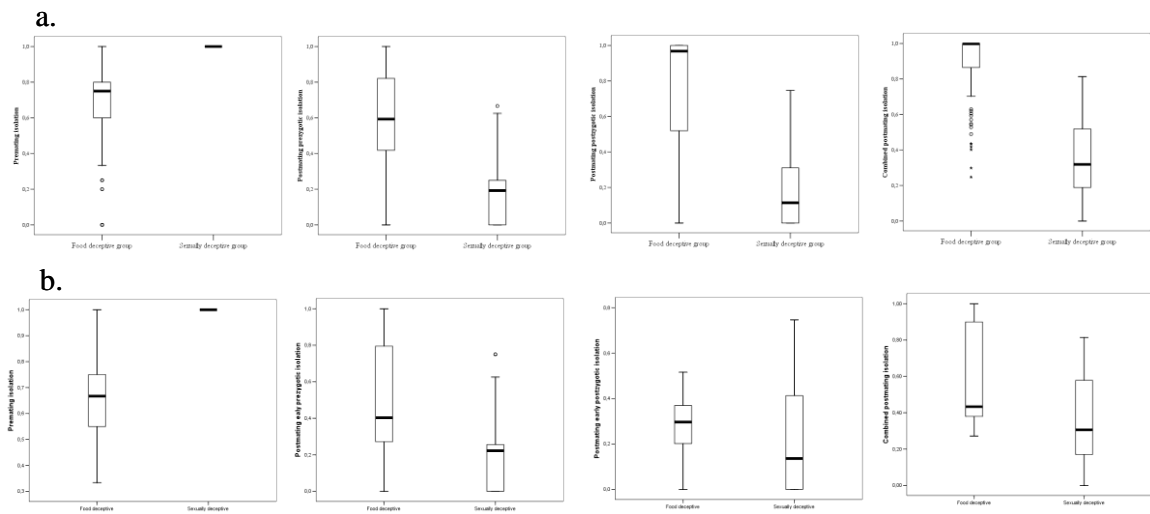


FIGURE 3: Comparison of the strength of reproductive isolation among food and sexually deceptive orchids. a., full dataset; b., only crossing combinations falling in the overlapping interval of genetic distance (from 0,0084 to 0,0319).

REFERENCES

- Aceto, S., P. Caputo, S. Cozzolino, L. Gaudio, and A. Moretti. 1999. Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Mol. Phylogenet. Evolution.* 13: 67-76.
- Arnold, M. L., J. L. Hamrick, and B. D. Bennett. 1993. Interspecific pollen competition and reproductive isolation in *Iris*. *The Journal of Heredity* 84(1): 13-16.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural hybridization and evolution.* Oxford Univ. Press, New York.
- Arnold, S. J., P. A. Verrell, and S. G. Tilley. 1996. The evolution of asymmetry in sexual isolation: a model and a test case. *Evolution* 50: 1024-1033.
- Baker M. C., and A. E. M. Baker. 1990. Reproductive behavior of female buntings: isolating mechanisms in a hybridizing pair of species. *Evolution* 44: 332-338.
- Bateman, R. M., P. M. Hollingsworth, J. Preston, L. Yi-Bo, A. M. Pridgeon, and M. W. Chase. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 142: 1-40.
- Cafasso D., A. Widmer, and S. Cozzolino. 2005. Chloroplast DNA inheritance in the orchid *Anacamptis palustris* using single-seed polymerase chain reaction. *Journal of Heredity* 96 (1): 66-70
- Coyne, J.A. 1994. Ernst Mayr and the origin of species. *Evolution* 48: 19-30.
- Coyne J. A., and H. A. Orr. 1989. Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* 43: 362-381.
- Coyne J. A., and H. A. Orr. 1997. Patterns of speciation in *Drosophila* revisited. *Evolution* 51: 295-303.

- Coyne J. A., and H. A. Orr. 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 287-305
- Coyne, J.A., and H. A. Orr. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Cozzolino, S., F. P. Schiestl, A. Müller, O. De Castro, A. M. Nardella, and A. Widmer. 2005. Evidence for pollinator sharing in Mediterranean nectar-mimic orchids: absence of pre-mating barriers?. *Proceedings of the Royal Society London B Bio* 272 (1569): 1271-1278.
- Cozzolino, S., S. Aceto, P. Caputo, A. Widmer, and A. Dafni. 2001. Speciation processes in Eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: Molecular evidence and the role of pollination biology. *Israel J. Plant Sci.* 49: 91-103 2001.
- Cozzolino, S., and A. Widmer. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?. *Trends Ecol. Evol.* 20: 487-494.
- Cozzolino S., S. D'Emérico, and A. Widmer. 2004. Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proc. Roy. Soc. Lond. Bio.* 271: 259-262.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current ornithology* 1: 159-187.
- Cronquist, A. 1978. Once again, what is a species? Pp. 3-20 *in* L. Knutson, ed. *BioSystematics in Agriculture*. Alleheld Osmun, Montclair, NJ.
- Dafni, A. 1984 Mimicry and deception in pollination. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: 259-278.
- Dafni, A. 1987. Pollination in *Orchis* and related genera: evolution from reward to deception. *In* *Orchid Biology, Reviews and Perspectives* (Arditti, J., ed.), pp. 79–104, Cornell University Press.
- Dobzhansky T. 1937. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Edmands S. 2002. Does parental divergence predict reproductive compatibility? *Trends Ecol. Evol.* 17: 520-527.

- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* 125: 1-15.
- Fenster, C. B., W. S. Armbruster, P. Wilson, M. R. Dudash, and J. D. Thomson 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 35: 375-403.
- Fisher, R.A. 1922. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85(1): 87-94.
- Fitzpatrick, B. M. 2002. Molecular correlates of reproductive isolation. *Evolution* 56: 191-198.
- Funk, D. J. 1998. Isolating a role for natural selection in speciation: host adaptation and sexual isolation in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution* 52: 1744-1759.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gill, D. E. 1989 Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids. In: D. Otte and J. A. Endler (eds.), *Speciation and Its Consequences*, Academy of Natural Sciences Publications, Philadelphia, PA. Pp. 458-481.
- Gleason, J. M., and M. G. Ritchie. 1998. Evolution of courtship song and reproductive isolation in the *Drosophila willistoni* species complex: Do sexual signals diverge the most quickly? *Evolution* 52: 1493-1500.
- Grant V. 1949. Pollination systems as isolating mechanisms in Angiosperms. *Evolution* 3: 82-97.
- Grant, V. 1954. Genetic and taxonomic studies in *Gilia* IV. *Gilia achilleaefolia*. *Aliso* 3: 1-18.
- Grant V. 1971. *Plant speciation*. Columbia University Press, New York.
- Grant, V., and K. A. Grant. 1965. *Flower pollination in the Phlox family*. Columbia University Press, New York.
- Grant, V. 1981. *Plant speciation*. 2nd. ed. Columbia Univ. Press, New York.
- Hall, E. 1997. BioEdit: A Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

- Harrison, R. G. 1998. Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation. In: *Endless Forms: Species and Speciation* (D. J. Howard and S. H. Berlocher, eds), pp. 19-31. Oxford University Press, Oxford.
- Hey, J. 2001. The mind of the species problem. *Trends Ecol. Evol.* 326-329.
- Howard, D. J., and S. H. Berlocher, eds. 1998. *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, Oxford.
- Howard, D. J., M., Reece, P. G., Gregory, J., Chu & M. L., Cain. 1998. The evolution of barriers to fertilization between closely related organisms. In *Endless forms: species and speciation* (ed. D. J. Howard & S. H. Berlocher), pp. 279-290. New York: Oxford University Press.
- Howard, D.J., and P.G. Gregory. 1993. Post-insemination signalling systems and reinforcement. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Bio.* 340: 231-236.
- Kaneshiro, K.Y. 1980. Sexual isolation, speciation and the direction of evolution. *Evolution* 34: 437-444.
- Kiang, Y. T., and J. L. Hamrick. 1978. Reproductive isolation in the *Mimulus guttatus*-*M. nasutus* complex. *Am. Midl. Nat.* 100: 269-276.
- Kiester, A. R., R. Lande, and D. W. Schemske. 1984. Models of coevolution and speciation in plants and their pollinators. *Am. Nat.* 124: 220-243.
- Knowlton, N., L. A. Weigt, L. A. Solorzano, D. K. Mills, and E. Bermingham. 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260: 1629-1631.
- Kullenberg, B. 1961. *Studies in Ophrys pollination*. Zool Bidr Uppsala 34
- Lang, D. 2004. *Britain's orchids, a guide to the identification and ecology of the wild orchids of Britain and Ireland*, Wildguides, Old Basing.
- Lakon, G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of the seed. *Plant Physiology* 24: 389-394.
- Levin, D. A. 1978. The origin of isolating mechanism in flowering plants. *Evol. Biol.* 11: 185-315.

- Levin, D. A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford Univ. Press, New York.
- Lewis, D., and L. K. Crowe. 1958. Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* 12: 233-256.
- Macior, L. W. 1971. Co-evolution of plants and animals: systematic insights from plant-insect interactions. *Taxon* 20: 17-28.
- Mant, J.G., F. P. Schiestl, R. Peakall, and P. H. Weston. 2002. A phylogenetic study of pollinator conservatism among sexually deceptive orchids. *Evolution* 56: 888-898.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement of the species problem. In: *The Units of Biodiversity -Species in Practice*. (eds M.F. Claridge, H. A. Dawah and M.R.Wilson). Special Vol.54. Systematics Association, Chapman and Hall Ltd, London. Pp. 381-424.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- McDade, L. A., and J. G. Lundberg. 1982. A new tabular and diagrammatic method for displaying artificial hybridization data, with an example from *Aphelandra* (Acanthaceae). *Syst. Bot.* 7: 13-25.
- Mendelson, T. C. 2003. Sexual isolation evolves faster than hybrid inviability in a diverse and sexually dimorphic genus of fish (Percidae: *Etheostoma*). *Evolution* 57: 317-327.
- Moyle L. C., M. S. Olson, and P. Tiffin. 2004. Patterns of reproductive isolation in three angiosperm genera. *Evolution* 58: 1195-1208.
- Nazarov V. V., K. A. Efetov. 1993. On the role of *Zygaenidae* (Lepidoptera) in pollination of *Anacamptis pyramidalis* (Orchidaceae). *Zoologicheskyy Zhurnal* 72 (10): 54-67.
- Neiland, M. R. M., and C. C. Wilcock. 1999. The presence of heterospecific pollen on stigmas of nectariferous and nectarless orchids and its consequences for their reproductive success. *Protoplasma* 208: 65-75.

- Nilsson, L. A. 1980. The pollination ecology of *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae). Bot. Notiser 133: 367-385.
- Nixon, K. C., and Q. D. Wheeler. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. Cladistics 6: 211-223.
- Noor, M. A. F. 2002. Is the Biological Species Concept showing its age? Trends Ecol. Evol. 17: 153-154.
- Orr, H. A., and M. Turelli. 2001. The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities. Evolution 55: 1085-1094.
- Otte, D., and J. A. Endler, eds. 1989. Speciation and Its Consequences. Sinauer Assoc. Sunderland, MA.
- Paulus, H.F. and Gack, C. 1990. Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (Orchidaceae). Israel J. Bot. 39: 43-79.
- Pigliucci, M. 2003. Species as family resemblance concepts: the (dis-)solution of the species problem? BioEssays 25: 596-602.
- Posada, D., and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14 (9): 817-818.
- Prentice, H. C. 1978. Experimental taxonomy of *Silene* section *Elisanthe* (Caryophyllaceae): crossing experiments. Bot. J. Linn. Soc. 77: 203-216.
- Presgraves, D. C. 2002. Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. Evolution 56: 1168-1183.
- Price, T. D., and M. M. Bouvier. 2002. The evolution of F-1 postzygotic incompatibilities in birds. Evolution 56: 2083-2089.
- Ramsey, J., H. D. Bradshaw, and D. W. Schemske. 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *M. Lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). Evolution 57: 1520-1534.
- Rick, C. M. 1963. Barriers to interbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. Evolution 17: 216-232.
- Robertson, C. 1928. Flowers and Insects. Lists of Visitors of Four Hundred and Fifty-Three Flowers. Carlinville, IL.

- Sasa, M. M., P. T. Chippindale, and N. A. Johnson. 1998. Patterns of postzygotic isolation in frogs. *Evolution* 52: 1811-1820.
- Schatz, B. 2006. Fine scale distribution of pollinator explains the occurrence of the natural hybrid *XOrchis Bergonii*. *Ecoscience* 13: 111-118.
- Schemske, D. W. 2000. Understanding the origin of species. *Evolution* 54: 1069-1073.
- Schiestl, F. P. 2005. On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Naturwissenschaften* 92: 255-264.
- Schiestl, F. P., M. Ayasse, H. F. Paulus, C. Lofstedt, B. S. Hansson, F. Ibarra and F. Wittko. 1999. Orchid pollination by sexual swindle. *Nature* 399: 421-422.
- Schiestl, F. P., and M. Ayasse. 2002. Do changes in floral odor cause speciation in sexually deceptive orchids? *Plant Syst. Evol.* 234: 111-119.
- Snow, A. A. 1994. Postpollination selection and male fitness in plants. *Am. Nat.* 144: 69-83.
- Soliva, M. A., A. Kocyan, and A. Widmer. 2001. Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 78-88.
- Soliva, M., and A., Widmer. 2003. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* 57: 2252-2261.
- Sorensson, C.T., and J. L. Brewbaker. 1994. Interspecific compatibility among 15 *Leucaena* species (Leguminosae: Mimosoideae) via artificial hybridization. *Am. J. Bot.* 8:240-247.
- Stebbins, G. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1: 307-326.
- Stebbins, G. L. 1999. A brief summary of my ideas on evolution. *Am. J. Bot.* 86: 1207-1208.
- Swofford, D. L. 1999. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Tiffin P., M. S. Olson, and L. C. Moyle. 2001. Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. *Proc. Roy. Soc. Lond. Bio.* 268: 861-867.
- Tilley S. G., P. A. Verrell, and S. J. Arnold. 1990. Correspondence between sexual isolation and allozyme differentiation: a test in the salamander *Desmognathus ochriphaeus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2715–2719.
- Turelli M., N. H. Barton, and J. A. Coyne. 2001. Theory and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16: 330-343.
- Widmer A., S. Cozzolino, G. Pellegrino, M. Soliva, and A. Dafni. 2000. Molecular analysis of orchid pollinaria and pollinaria remains found on insects. *Molec. Ecol.* 9: 1911-1914.
- van der Cingel, N. A. 1995. *An Atlas of Orchids Pollination – European Orchids*. Balkema, Rotterdam.
- van der Pijl, L. 1960. Ecological aspects of flower evolution. *Phyletic evolution. Evolution* 14: 403-416.
- Van Valen, L. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* 25: 233-239.
- Via, S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends Ecol. Evol.* 16: 381-390.
- Via, S. 2002. The Ecological Genetics of Speciation. *Am. Nat.* 159: 1-7.
- Vujanovic V., M. St-Arnaud, D. Barabè, and G. Thibeault. 2000. Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination. *Annals of Botany* 86: 79-86.
- Wu, C. I. 2001. The genic view of the process of speciation. *J. Evol. Biol.* 14: 851-865.
- Zhang X. S., and D. O'Neill. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by Auxin and Ethylene following pollination. *The Plant Cell* 5: 403-418.

Chapter 2: HYBRIDIZATION AND POSTZYGOTIC ISOLATION IN FOOD

DECEPTIVE ORCHIDS

ABSTRACT

Traditionally, postmating barriers (both, pre and postzygotic) have been underestimated among orchids. By using literature and experimental data, we systematically investigated three different stages of postzygotic isolation (i. e. embryo mortality, hybrid inviability and hybrid sterility) in a group of food deceptive Mediterranean orchids in which, the weak role of premating barriers among closely related sympatric species, suggests the presence of other mechanism of reproductive isolation.

We found that all the three stages of postzygotic isolation play a significant role in the maintenance of species integrity among sympatric coflowering species but with different strength and different evolutionary rates.

We detected the presence of early postzygotic stages of isolation as embryo mortality in a number of species pairs, by observing the lack of viable seeds produced in interspecific crosses.

For several sympatric and coflowering species pairs that produced viable seeds when manually crossed hybrids have been never reported in literature suggesting hybrid inviability.

Experimental crosses showed a strong reduction of fertility in all the investigated hybrids and a significant difference in the male and female components of the hybrid sterility.

Using the genetic distance as a proxy of divergence time among species we found that embryo mortality and hybrid sterility evolved in a clock-like manner.

We also found that hybrid inviability increased among distantly related species suggesting a positive correlation between this stage of isolation and the time since species diverged.

Comparing the evolutionary rates of reproductive isolation within the same intervals of genetic distance, our results suggest that, like in several animal groups, the first isolating mechanism that arise among incipient species food deceptive orchids is the hybrid sterility, while early stage of postzygotic isolation, such as embryo mortality, appear only in a later phase of speciation process.

Key words: orchids; embryo mortality; hybrid inviability; hybrid sterility; reproductive isolation.

Speciation occurs when inherent barriers to gene flow evolve between formerly interbreeding demes. Therefore the investigation on how and why these gene flow barriers arise represent a crucial step in the understanding of the speciation process. In general, the formation of the heterospecific zygote formally represents a milestone in the event series leading to demes genetic admixture and, accordingly, factors that prevent this scenario (i.e. barriers to gene flow between species) are often categorized according to whether they reduce the likelihood that gametes will combine to form a viable zygote (prezygotic barriers) or reduce the viability or reproductive potential of interspecies hybrids (postzygotic barriers) (Tiffin et al. 2001). While the former category is more influenced by ecological factors and reproductive factors, the latter is highly dependent from the genetic architecture of species and is more influenced by intrinsic compatibility factors in parental species (Moyle et al. 2004; Coyne and Orr 1989). In animal, hybrid sterility and inviability appear to evolve as described by the “Dobzhansky-Muller” model of incompatible alleles and patterns characterizing the evolution of intrinsic postzygotic isolation (hybrid sterility and hybrid inviability) have been described in several animal systems such as in flies (Coyne and Orr 1989; 1997), frogs (Sasa et al. 1998), birds (Price and Bouvier 2002) and Lepidoptera (Presgraves 2002). In all these taxa, intrinsic postzygotic barriers such as hybrid sterility and inviability have been found to evolve gradually, giving rise to a rough speciation clock (Coyne and Orr 1989; 1997; Orr and Turelli 2001; Sasa et al. 1998; Price and Bouvier 2002; Presgraves 2002). Furthermore, hybrid sterility have been found to evolve more quickly than hybrid inviability in anurans (Sasa et al. 1998) and *Drosophila* (Coyne and Orr 1989). In plants, these trends have not been firmly confirmed so far. Postzygotic isolation for three angiosperm genera displayed a varied set of relationships with genetic distance ranging from largely positive to weak or absent (Moyle et al. 2004). Besides, these comparisons were based on literature data and consequently the contribution of late postzygotic barriers as hybrid viability and hybrid sterility could not be estimated. Finally, the finding that, in animals, hybrid male sterility evolves more readily than female sterility or hybrid lethality, a trend attributed to the accelerated

evolution of male traits via sexual selection/conflict, have not been tested in species groups, as plants, that usually do not have separate sexes.

Here, we investigate the rule and strength of these late postzygotic barriers by analyzing a guild of Mediterranean orchids in which the low specificity in pollination mechanisms (Cozzolino et al. 2005; Neiland and Wilcock 1999; Cozzolino and Widmer 2005a), suggests a prominent role for postpollination barriers, both prezygotic (i.e. pollen stigma interaction) and postzygotic (embryo mortality, hybrid inviability and hybrid sterility) in the prevention of gene flow among sympatric coflowering species.

In this orchid group, many species pairs occur in sympatry and, in several cases, they do hybridize at a low to moderate frequency (reviewed in Cozzolino and Widmer 2005b). Thus, sharing of pollinators among sympatric coflowering species significantly decreases the rule of premating isolation in being the major mechanism maintaining reproductive isolation and additional causes of postmating isolation are likely to contribute to species isolation.

Recent experimental study have quantified the strenght of postmating reproductive barriers among Mediterranean orchids, evaluating early stages of postzygotic isolation (Scopece et al., first chapter). However, there is still a substantial scarcity of information, in plant in general and in orchids in particular, on late postzygotic stages of reproductive isolation such as hybrid sterility and hybrid inviability. Furthermore, in this orchid group, it has been recently suggested that the presence of karyotype divergences among close related species, leading problems in chromosome pairing in hybrid individuals, could represent a strong late postzygotic barrier (Cozzolino et al. 2004) in hybridizing taxa. Concordantly, indirect evidence for the existence of postzygotic isolation have been inferred by the genetic analysis of hybrid zones. These studies demonstrated that these hybrid zones, in spite of their relative abundance, were mainly constituted by hybrid individuals of first or early generations (reviewed in Cozzolino and Widmer 2005b). Factors shaping the genetic architecture of these hybrid zones can be ascribed to a lower attractiveness of hybrid plant for pollinators of parental species (for instance as described in *Ipomopsis*, Campbell et al. 1997) or to

intrinsic genetic factors limiting the hybrid reproductive fitness (for instance as described in *Helianthus*, Quillet et al. 1995).

To address these questions, we combined both literature survey and experimental crosses with natural hybrid individuals. The existing vast literature and floristic records, thanks to the interest that this group of Mediterranean orchids promotes in both scientist and layer public since Darwin time, represent a rich source of data on hybridization. Using literature data, we could assess a further stage of postzygotic isolation (i.e. hybrid viability) that would be difficult to estimate with an experimental approach. The long generation times of several non model organisms, as orchids are, make it easier to score inviability (requiring one generation) than sterility (requiring two) (Presgraves 2002). Indeed, assaying hybrid viability requires the production of F₁ hybrids and assaying hybrid fertility require at least to perform crosses when these F₁ hybrid get their flowering time. Because orchids have long generation time (approx. 3-5 years in our orchid group) many hybridization experiments were taken only to the production of F₁ seed and hybrid viability was scored on literature data. In several cases, however, when hybrid plants were found in the wild, they were used for direct estimation of hybrid fertility. We therefore provide two measures of postzygotic isolation: an hybrid inviability estimate based on literature data and, for those cases in which hybrid sterility was experimentally measured, a total postzygotic isolation estimate. Specifically, in the present work, the following questions are addressed:

- (i) Which is the real contribution of the different stages of postzygotic isolation in maintaing species integrity in this group of food deceptive orchids?
- (ii) Are the different stages of postzygotic isolation correlated with genetic distance?
- (iii) Which is the cronology of the insorgence of reproductive isolation and, therefore, which of these stages have been involved in the early separation of incipient species (i.e. which kind of isolation evolved before)?
- (iv) Do male sterility and female sterility evolve in a similar manner?

Understanding the strength and the time-course of the evolution of these different kinds of reproductive isolation is essential in order to understand speciation process (Coyne

and Orr 2004). The correlation of these stages of isolation with genetic distance among species might allow us to calibrate a “rough speciation clock” (Presgraves 2002) and understand the way through which new species arise can lead us to unravel the mystery of orchid’s diversity and species richness in the Mediterranean basin.

MATERIALS AND METHODS

Postzygotic isolation

Within this category, we could detect three different isolation stages: embryo mortality, hybrid inviability and hybrid sterility.

Embryo mortality (i.e. postmating postzygotic isolation in Scopece et al., first chapter) was defined as the proportion of viable embryos (i. e. viable seeds) produced in pollination attempts between parental species, relative to the proportion of viable embryos produced in intraspecific crosses: *embryo mortality index* = $1 - (\% \text{ viable seeds in interspecific crosses} / \% \text{ viable seeds in intraspecific crosses})$. Data on embryo mortality among all species pairs examined here have been collected in a large survey by Scopece et al. (first chapter) who compared rates of pre and postmating isolation between sexually and food deceptive orchids. Here, we specifically recalculated the isolation index for embryo mortality, using the same method as described in Scopece et al. (first chapter), but including only species pairs belonging to the food deceptive related *Anacamptis*, *Orchis* and *Neotinea* (formerly included in *Orchis s.l.* clade) that are the focus of present study. Therefore, from the total food deceptive dataset of Scopece et al. (first chapter), we excluded species pairs involving *Dactylorhiza* species and we included unpublished data relative to *Anacamptis coriophora*, a rewarding orchid belonging to the same clade. This species has been introduced in our estimation of reproductive isolation in food deceptive orchids because it is the only rewarding species nested within the food deceptive clade (and thus secondarily rewarding, see Cozzolino et al. 2001) and that easily hybridizes with other food deceptive species of its clade.

To test for hybrid inviability, we recorded all literature reports of interspecific hybridization in nature (a complete list of all references is available at the first author upon request). Orchid hybrids are always only recognized when the suspected specimens is flowering. Consequently, we assume that the simple report of an hybrid in literature automatically implies its viability (healthy condition up to a flowering stage). In collecting this information, however, we only recorded the finding of hybrid and we did not try to estimate the frequency of hybridization between individuals of particular species pairs (i.e. the number of formed hybrids) because most of literature studies were not conducted with this scope. Additional caution should be applied in using these data because there are several sources of bias and error. For instance, because literature reports are based on visual recognition only, there may be false positive reports-cases in which suspected hybrids were simply aberrant parental forms. This would lead to overestimation of the number of species pairs that hybridize in nature. However, at the same time, other factors would lead to underestimation of the number of species pairs that hybridize in nature. For instance, true hybrids can go undetected between species that have received little study in the wild, particularly those from remote locations, or between species pairs with few or no morphological differences, that obviously make morphological detection of hybrids difficult (Presgraves 2002).

Afterwards, to assess the hybrid inviability we selected from our total species dataset (including all species on which we performed crosses for testing embryo mortality) only those species pairs that produced viable embryos when manually pollinated and whose gametes have some likelihood of get in contact with under natural conditions (i. e. coflowering, sympatric species pairs with an overlap in pollinator set), i. e. that likely may potentially produce hybrids. Within this subset we tested the presence of the hybrids in literature and we estimated the relative frequency of hybridization.

Then we assumed that, in this circumstances, the absence of any hybrid report would demonstrate the presence of some mechanism of hybrid inviability. This estimate assumes consequently a binary value (0 = no hybrid inviability; 1 = presence of hybrid inviability) only.

Finally, the isolation index for hybrid sterility have been gathered from manual crossing experiments. Manual crosses were performed through pollinations on hybrid and parental individuals opportunely bugged in order to prevent uncontrolled pollinations. During a five years survey we were able to collect in the field individuals of seven hybrids (*Orchis mascula* x *O. pauciflora*, *O. pauciflora* x *O. quadripunctata*, *O. anthropophora* x *O. simia*, *Anacamptis morio* x *A. laxiflora*, *A. morio* x *A. papilionacea*, *A. coriophora* x *A. laxiflora* and *Neotinea tridentata* x *N. ustulata*).

All plants used for the experiment were collected in two preserved areas of Southern Italy, namely the “Cilento e Vallo di Diano” National Park and the “Roccamonfina e foce del Garigliano” Regional Park.

To standardize our results we only choose hybrids whose parental species and F₁ status have been identified through molecular analyses in previous studies (listed in Cozzolino and Widmer 2005b).

Pollination experiments were then performed removing pollinaria as soon as the flowers opened by tipping the anther cap with a plastic toothpick and placing them on the flower stigma of other individuals. On each hybrid taxa, we performed bidirectional backcrosses, i.e. with individuals of each hybrid receiving parental pollen and providing pollen to their respective parental species.

We therefore evaluated the two components of hybrid sterility (i. e. male and female) in order to test whether the backcrosses were affected by which specimens were the pollen or the seed parent. We defined as male component the capacity of hybrid pollen in trigger the fruit formation and in promoting the development of viable seeds in receiving parental plants, and as female component the capacity of hybrid ovule to be triggered to the fruit formation and to produce viable seeds when receive parental pollen. Therefore, male and female components resulted to be both constituted by two stages (i.e. fruit formation and viable seeds formation). From each stage, we calculated two values of hybrid sterility for each of the two components. The first stage of the male component, defined as the ratio of fruits produced in pollination attempts performed using hybrid pollen on both receiving parental plants, was evaluated as: $Male^I index = 1 - (\text{fruit produced} / \text{flowers pollinated})$. The seeds viability obtained in

the same crosses, was used to assess the second stage of the male component ($Male^2$ index = 1-(% viable seeds). The two stages of the female component ($Female^1$ index and $Female^2$ index) were calculated similarly using results from crosses in which the parental species were the pollen donors and the hybrids were the receiving plants.

Finally, we calculated also the linear combinations of the two stages of each components in order to obtain a unique value of hybrid sterility for both components: $Male\ combined\ index = Male^1\ index + (1 - Male^1\ index) \times Male^2\ index$; and $Female\ combined\ index = Female^1\ index + (1 - Female^1\ index) \times Female^2\ index$.

The mean value of the two combined values represents our index of total hybrid sterility ($Hybrid\ sterility\ index = 1 - (Male\ combined\ index + Female\ combined\ index / 2)$).

Afterwards, we also tested the capacity of hybrid individuals in producing viable F_2 seeds. We therefore, performed, with the same method explained before, crosses between different hybrid individuals from the same parental combination. With these data, we then evaluate the two different stages: $F_1\ interfertility^1\ index = 1 - (\text{fruit produced} / \text{flowers pollinated})$; $F_1\ interfertility^2\ index = 1 - (\text{viable seeds} / \text{unviable seeds})$; the linear combination of this two indices was: $combined\ F_1\ interfertility\ index = F_1\ interfertility^1\ index + (1 - F_1\ interfertility^1\ index) \times F_1\ interfertility^2\ index$.

Correlations between reproductive isolation and genetic distance

Genetic distances between species pairs were calculated as described in Scopece et al. (first chapter). Briefly, internal transcribed spacers (ITS) sequences available in GeneBank were hand-aligned in Bioedit (Hall 1997) and the best fit model of molecular evolution was estimated with Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 1998). Genetic distances were then calculated in PAUP* 4.0 (Swofford 1999).

Hybrid inviability data are binary and, therefore, to test the association with genetic distance, following Coyne and Orr (1989) we defined three classes of genetic distance (0,00-0,16; 0,16-0,32; 0,32-0,48) and within these we evaluated the relative frequency of the occurrence of species pairs displaying hybrid inviability. We thus assumed that,

if the frequency of the occurrence of hybrid inviability increases within intervals of higher genetic distances there is a positive correlation with genetic distance.

For the other two stages of postzygotic isolation (i.e. embryo mortality and hybrid sterility) we gathered continuous data and therefore, we could perform standard correlations with genetic distance between parental species.

Being some of the parental species involved in more than one hybrid combination (for hybrid sterility) and being some species involved in multiple crosses (for embryo mortality), a number of datapoints within our datasets were not statistically independent. To make sure that the observations were phylogenetically and statistically independent, we selected strictly independent species pairs in order to maximize the number of pairs that could be obtained from the available nonindependent (Felsenstein 1985). With this aim we used published molecular phylogenies (Bateman et al. 2003; Aceto et al. 1999; Cozzolino et al. 2001). Being the genetic distance and isolation data not normally distributed to test association between them, we used the nonparametric Kendall's τ rank correlation for corrected and strictly independent datasets using SPSS 13.0 (SPSS Inc.). Finally, we also performed standard correlations among these two stages of isolation and genetic distance limiting our dataset to the seven species pairs for which we have complete data for both stages.

Relative evolutionary rates of postzygotic isolation

Although we have no direct calibration of evolutionary rates in our group of orchids, we used genetic distance as a proxy for time since divergence to examine relative rates of evolution of each stage of reproductive isolation (Coyne and Orr 1989, 1997; Sasa et al 1998; Presgraves 2002). Due to the nature of our data, to compare relative rates of evolution of the three stages of postzygotic isolation, we used the three intervals of genetic distance to test the association between hybrid inviability and genetic distance and we look within these parental to test the relative frequency of each stage of postzygotic isolation. To do this, therefore, we simply evaluated the presence/absence of a given stage of postzygotic isolation and we assumed that an higher frequency of a given stage at lower genetic distance is equivalent to a its faster evolution (Coyne and

Orr 1989). This analysis were performed on the full datasets of embryo mortality (including 113 species pairs) and hybrid inviability (including 44 species pairs) described before and containing the data for all the possible species pairs combination. Obviously, for hybrid sterility, we analysed within each interval of genetic distance, the occurrence of hybrid sterility only for those cases in which we obtained data from the backcrossing experiments (7 cases). Although our hybrid sterility dataset was only a subsample of all reported hybrids dataset, however it represents the 28% of the total cases (i.e. 7 tested hybrid on 25 reported combinations) and at least the 20% within each interval of genetic distance.

For hybrid sterility and embryo mortality, we were also able to assess the relative strength of isolation within each interval of genetic distance. For these two stages, in fact, in addition to the presence/absence, we also gathered qualitative data (i.e. isolation indices). With this aim we tested the mean differences (through an independent *t*- test) between isolation indices of the two stages within each interval of genetic distance.

RESULTS

Postzygotic isolation

Previous analysis of postmating isolation at stage of embryo mortality showed a significant reduction of seeds viability in interspecific crosses with respect to intraspecific ones (Scopece et al., first chapter). Our similar analysis, performed on 17 species excluding *Dactylorhiza* and including the rewarding *A. coriophora*, for a total of 113 species pairs that, when crossed, produced fruits (101 species pairs in Scopece et al., first chapter), confirms the same trend. The 33,6% of species pairs were totally isolated (isolation index = 1) through mechanisms of embryo mortality (corresponding to the value of 29,6 % reported in Scopece et al., first chapter).

All orchid species included in our analysis are sympatric and coflowering. However, 25 cases, that are known to be pollinated by different insect groups (Van der cingel 1995; Scopece et al., first chapter) were excluded from our subsequent compute of hybrid inviability because the absence of the hybrid report in these cases could be simply due to the absence of overlap in the pollinator set of the two species (total pre mating

isolation). We also excluded, due to the lack of pollinator information for this species, the 16 crosses in which *Neotinea lactea* was involved. On the remaining species pairs (72), 28 cases were also excluded due to the lack of viable seeds formation in interspecific crosses (performed in our analysis and in Scopece et al., first chapter). Thus, after these exclusions, the employed dataset was finally constituted by 44 species pairs. Within this, we found a number of cases (19) of species pairs for which the corresponding hybrids have never been found in nature, thus, following our assumption, 43,2% of species pairs revealed to be affected by some sort of hybrid inviability.

We obtained data on reproductive isolation by hybrid sterility performing manual crossing experiments with hybrid plants and parental species collected in nature. A total of 387 backcrosses attempts were performed on 7 hybrid taxa involving 11 species of Mediterranean orchids. Backcrosses with parental species were performed on a mean of 27,6 flowers (summing backcrosses performed in both possible directions for each of the parental species).

We found a strong reduction of fertility in all the investigated hybrids (mean value of the *Hybrid sterility index* = 0,85). Only 2 (*O. mascula* x *O. pauciflora* and *N. tridentata* x *N. ustulata*) out of the 7 experimentally examined hybrids showed a small production of viable seeds (more than 1%).

Furthermore, in the backcrosses experiments, we also found a significant difference in the two components of the hybrid sterility. Indeed, hybrid pollen was able to trigger the development of fruits in parental species in only two cases (*O. mascula* x *O. pauciflora* and *N. tridentata* x *N. ustulata*). Consequently, *Male*¹ *isolation index* was on average 0,77. In the two cases in which hybrid pollen was able to trigger fruits formation in parental species, however, seeds viability was strongly reduced when compared to values of the intraspecific crosses of the parental species (as reported by Scopece et al. first chapter): 47,2% compared to the 89,2% for *O. mascula* x *O. pauciflora* hybrid and 42,1% compared to the 59,8% for *N. tridentata* x *N. ustulata* hybrid) and the *Male*² *isolation index* was 0,56 on average.

On the contrary, in backcrosses in which hybrid individuals of *O. mascula* x *O. pauciflora* and *N. tridentata* x *N. ustulata* were the seed parents, the proportion of fruit formation was high (74%; *Female*¹ *index* on average = 0,26) but, again, seeds viability was strongly reduced (21%; *Female*² *index* on average = 0,79).

Therefore, both components (Male and Female) of hybrid inviability strongly contribute to this isolation stage (mean value of male combined = 0,9; mean value of female combined = 0,8) but differently: with a low rate of fruit production for the male component and with a low viability of seeds for the female component (see fig. 1).

Furthermore, for these two hybrids, crosses performed to produce F₂ embryos, also resulted in a low production of fruits (28%; *F*₁ *interfertility*¹ *index* on average = 0,72) and in a low viability of the seeds (17%; *F*₁ *interfertility*² *index* on average = 0,83). The combined value of these two stages for each hybrid represents the *combined F*₁ *interfertility*. The average of all *combined F*₁ *interfertility* is 0,93.

Correlations between reproductive isolation and genetic distance

From the dataset of 44 species pairs potentially hybridizing, we found that the relative frequency of species pairs displaying hybrid inviability in the three intervals of genetic distance, was lower in the first interval (38,1% between 0,00 and 0,16 of genetic distance), and increased in the following two intervals (42,8% between 0,16 and 0,32; 55,5% between 0,32 and 0,48) (see table 1). This finding suggests a positive correlation between this stage of isolation and the time since species diverged (i.e. genetic distance). However, this method doesn't allow us to evaluate strength of this correlation.

Using the dataset of embryo mortality (including 113 species pairs), we found a positive and strongly significant association between this stage of postzygotic isolation and the genetic distances (Kendall's $\tau = 0,594$; $P = 0,00$). This correlation was significant also using the strictly independent species pairs (Kendall's $\tau = 0,571$; $P = 0,048$) (see table 2).

Hybrid sterility also was found to be positively correlated with genetic distance both using the full dataset (7 hybrid combinations, Kendall's $\tau = 0,732$; $P = 0,029$), and the

strictly independent species pairs (5 hybrid combinations Kendall's $\tau = 0,837$; $P = 0,052$) (see table 2).

Furthermore, also within only the seven species pairs for which we possessed data for both stages of postzygotic isolation, we found positive and significant correlation (hybrid sterility: Kendall's $\tau = 0,732$; $P = 0,029$; embryo mortality: Kendall's $\tau = 0,619$, $P = 0,051$) (see fig. 2).

Relative evolutionary rates of postzygotic isolation

How expected, we found that the relative frequency of the three stages of postzygotic isolation increase in the three intervals of genetic distance (see fig. 3).

We also found hybrid inviability to be more frequent than embryo mortality in the first two intervals (38,1% vs 0% in the first; 42,8% vs 18,7% in the second). In the third interval, embryo mortality (65,3%) became more frequent than hybrid inviability (55,5%). Furthermore, hybrid sterility affect 50% of the hybrids falling in the first interval of genetic distance and all the hybrids falling in the second and in the third intervals. Therefore, in the first interval, we found hybrid sterility to be the most widespread postzygotic mechanism (see tab. 1 and fig. 3).

Finally, with regard to the strength of the two stages for which we could evaluate the isolation index (i.e. embryo mortality and hybrid sterility), we found that hybrid sterility isolation values was significantly higher in the first interval (mean difference 0,280; $t = 2,08$ $P = 0,045$). In the two following intervals, due to the increase of the embryo mortality isolation index, mean difference became gradually smaller and less significant (in the second interval: mean difference 0,156; $t = 0,978$ $P = 0,335$. In the third interval: mean difference 0,02; $t = 0,240$; $P = 0,811$).

DISCUSSION

The role of hybridization in orchids has been traditionally emphasized (Ehrendorfer 1980; Van der Pijl and Dodson 1966). Our literature survey, shows an high hybridization level among the studied guild of Mediterranean orchids: all 17 species present in our datasets hybridize to some degree in nature. But, surprisingly, all

naturally hybridizing species from which we had the opportunity to test corresponding hybrid sterility (11 species, 64,7% of the total) showed some intrinsic hybrid fitness problems (i.e., an isolation index > 0). In all seven examined cases but two with the hybrid being totally sterile.

In spite of this strong intrinsic postzygotic isolation, hybrid sterility does not, however, appear to be the only prerequisite for stable coexistence in sympatry because 69,9% (79 on 113) of sympatric species show some other earlier forms of complete reproductive isolation as embryo mortality. Indeed, our recalculation of this early stages of postzygotic isolation, among these food deceptive orchids confirms quantitatively and qualitatively the results of Scopece et al. (first chapter) and thus attribute to the embryo mortality an important role in maintaining isolation among sympatric species. This mechanism prevents any possibility of hybridization (i.e. no production of any viable seed) in the 33,6% of species pairs included in our dataset. These findings suggest that natural hybridization is common but that intrinsic postzygotic isolation contributes to reproductive isolation between sympatric food deceptive orchids.

Lethality of F_1 hybrids after germination has been reported in many genera of plants with hybrid weakness and dwarfs as common feature (Levin 1978). In our group of orchids, 43,2% of the species pairs that produced viable embryos when manually crosses seems to be affected by this isolation mechanism. Because literature survey was based on hybrid identification (thus when in bloom) we cannot distinguish between hybrid lethality occurring in the earlier (as seed germination or seedling establishment) or in later developmental stages (with hybrid plant unable to achieve reproductive phase). However, all hybrid plants reported in literature records and examined in our study were as healthy and vigorous as the parental ones. This indicates that, more likely, no substantial extrinsic (environment dependent) factors seem to limit the survival and growth of F_1 hybrids. Arguably the most critical stages in the life cycle of orchids are the seedling stages, because an intimate association with an appropriate mycorrhizal partner must be established for survival. At present, the genetic basis of

this association and the mechanisms of cellular signaling among orchid seedlings and fungal partners remain still to be investigated (Gardes 2002) and thus it's unknown the specificity of interactions with an hybrid seeds for the successful establishment of the fungal association.

Despite survival or even vigorous growth of F₁ hybrids, sterility or reduced reproductive output may result in a major barrier to gene flow between these food deceptive orchids. Otherwise, in general hybrid sterility seems to be an important factor in plant reproductive isolation (Levin 1978). In our study we found that only two hybrids were able to partially produce viable seeds in the backcrosses, being all the other hybrids totally incompatible both when crossed with parental species and with other hybrids.

Contrarily to prezygotic isolation that seems to arise in a more chaotic way (Gleason and Ritchie 1998; Panhuis et al. 2001), postzygotic isolation have been found to evolve gradually with genetic distance in all animal taxa in which this correlation was performed (Coyne and Orr 1989, 1997; Sasa et al. 1998; Presgraves 2002; Moyle et al. 2004).

We found that postzygotic isolation evolves gradually with genetic divergence at each of the stage that we investigated and that late postzygotic isolation (i.e. hybrid sterility and hybrid inviability) evolves faster than early postzygotic isolation (i.e. embryo mortality).

Moreover we found that, even if less evident, hybrid sterility evolved faster than inviability. Similar pattern has been reported in many animal taxa (Wu 1992; Sasa et al. 1998; Presgraves 2002; Price and Bouvier 2002). These studies also showed compliance with Haldane's rule, indicating faster evolution of sterility in the heterogametic hybrid sex. Thus, among animal taxa, the general chronology of insurgence of postzygotic isolating mechanisms seems to be: first male hybrid sterility, then female hybrid sterility, then hybrid inviability (Christianson et al. 2005).

In our study, in the two hybrids that were partially fertile we did not find a significant difference in the amount of genetic isolation in the male and female component (see fig. 1b) but we found a marked difference in their modality (see fig 1a). This difference could be explained by the fact that in orchids female gametophyte development is promoted by biochemical signals produced by the arrival of pollen on the stigma (Zhang and O'Neill 1993). Therefore, a scarce viability of F₁ hybrid pollen when backcrossed with parental species could reflect in its incapacity in producing the biochemical signalling necessary to trigger the develop of female gametophyte (thus the fruit formation) in parental plants. On the contrary, when parental species are the pollen donor their full viable pollen may easier promote fruit formation in hybrid plants. In both circumstance, however, we have found a reduced seed production in backcrosses when compared with interspecific crosses between parental species and, as expected, crosses between F₁ hybrid plants (where both component of male and female sterility were present) produced even more less fruit and seeds than backcrosses.

Sterility of F₁ hybrids is caused by genetic incompatibilities and/or chromosomal mutations.

Empirical work in *Drosophila* has revealed that hybrid fertility problems often are highly polygenic and complex (reviewed in Coyne and Orr 2004), that a large number of diverging loci interact negatively in the hybrid genetic background and that these interactions act cumulatively to cause inviability and sterility because fixation of incompatible nuclear alleles (the Dobzhansky-Muller incompatibilities model) (Wu and Palopoli 1994; Rieseberg and Carney 1998). However, in *Mimulus*, it has been demonstrated that nearly complete hybrid male sterility may result from a simple genetic incompatibility between a single pair of heterospecific loci (Sweigart et al. 2006) thus indicating that one or two genes appears to have a major effect on hybrid sterility and inviability.

As parental genetic incompatibility, it is clear that chromosome rearrangements also play a critical rule in hybrid sterility and the evolutionary dynamics associated with

chromosomal changes are quite different from those associated with Dobzhansky-Muller incompatibilities.

In crosses between chromosomally divergent species, sterility can be attributed to the effects of chromosomal rearrangements on meiotic pairing. In *Helianthus*, most species in the genus appear to differ by one or more chromosomal translocations and these chromosome rearrangements are largely responsible for reducing pollen viability of F₁ hybrids (Rieseberg and Carney 1998; Quillet et al. 1995).

Species of food deceptive orchids are characterized by frequent differences in chromosomal patterns (D'Emérico et al. 2002) and hybrid sterility could also arise as a consequence of the presence of karyological differences among parental taxa. These difference leading problems in hybrid chromosome pairing with hybrids typically exhibit high pollen sterility due to many meiotic irregularities such as the formation of multivalents. Hybrids between *A. morio* and *A. papilionacea*, investigated in our study, normally have 2n=34 highly heteromorphic chromosomes and show irregular meiotic behaviour, suggesting reduced homology between the parental genomes (D'Emérico et al. 1996). Chromosomal evolution may be accelerated because such mutations are more likely to become fixed within small populations where increased inbreeding could facilitate rapid fixation of chromosomal changes.

Karyological asymmetries have been found to be common among mediterranean orchids and have been proposed that the arising of these asymmetries, fixed in small isolated populations, could be the necessary condition for these pollinator generalist orchids to overtake the challenge of the sympatry in secondary contact zones (Cozzolino et al. 2004).

Chromosomal rearrangements are commonly responsible for reproductive isolation between angiosperm species but this isolation stage affects F₁ seed and pollen viabilities, which are only affected by postzygotic mechanisms (Stebbins 1971) and does not affect early stages of postzygotic isolation, such as embryo mortality that is more influenced by the gradual accumulation of incompatibilities among parental taxa (Orr and Turelli 2001) and therefore (especially if multigenic) may need longer time to

arise. Embryo mortality and hybrid sterility, for the species pairs for which we were able to calculate all stages of reproductive isolation were both correlated with genetic distance and at low genetic distance we found stronger isolation for hybrid sterility than for embryo mortality (see fig. 2). Concordantly, in the first interval of genetic distance, embryo mortality was virtually absent among isolation mechanisms while hybrid inviability and sterility were already common (see fig.3 and table 1).

Therefore, our findings of a faster evolution of hybrid sterility with respect to embryo mortality, could be coherent with the proposed rule for chromosome rearrangements and could explain the presence of hybrid fertility (even if strongly reduced if compared with parental species) only in the two most closely related species pairs investigated (0,022 between *Neotinea ustulata* x *N. tridentata* and 0,045 between *Orchis mascula* x *O. Pauciflora*).

This trend suggests that, more likely, in the early stage of species isolation the most common evolutionary pathway to complete postzygotic isolation begin with early evolution of hybrid sterility, followed by hybrid inviability and then by embryo mortality. Indeed, at larger genetic distance, hybrid sterility does not appear to be a prerequisite for stable coexistence in sympatry. In the third interval of genetic distance 65,3% of sympatric species show earlier forms of reproductive isolation as embryo mortality. Of course, the secondary occurrence of sympatry for species originally isolated by chromosomal divergence and hybrid sterility, may fuel the evolution of earlier stage of isolation as pre mating ones but not of other postzygotic isolation barriers (embryo mortality or hybrid viability) because for the parental species when the interspecific fruit is produced there is no additional cost that the waste of gametes.

In last years the role of hybridization in species formation have been emphasized (Rieseberg 1997; Arnold 1997) and, consequently, recent studies analyzed the genetic structure of hybrid zones formed between food deceptive orchids. Results suggest on the one hand a weak role for hybridization in speciation and, on the other hand, an important role for postzygotic barriers in avoiding (or at least in limiting) gene flow

among sympatric populations. In particular, Moccia et al. (in press) by analyzing the genetic architecture of hybrid zones between *A. morio* and *A. papilionacea* (a species pair investigated in our study) reported the occurrence of strong postzygotic isolating mechanisms (i.e. hybrid sterility). Authors found that the hybrids were all F₁ and sterile and their results are perfectly concordant with those experimentally produced in our controlled crosses. This concordance suggests that intrinsic postzygotic isolation as hybrid sterility effectively contributes to reproductive isolation between sympatric food deceptive orchids in nature.

Our results are coherent with this view and show that different stages of postzygotic isolation contribute (and significantly) in different degree to the maintenance of species boundaries in sympatric populations of these less specialized orchids. This would seem contrary to several claims that postzygotic isolation is of little relevance to speciation in orchids (Gill 1989) and highlights the rule of chromosome evolution in promoting orchid diversity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Loren Rieseberg, Christian Lexer and Amots Dafni for discussion on orchid and speciation, and Enzo Avolio, Stefano Giorgio and Giuseppe Napolitano, members of the staff of Naples Botanical Garden, for support in fieldwork. They also thank Mary Longrigg for language revision. Funding for this study was provided by the PRIN program 2005. The authors also thank the Cilento e Vallo di Diano National Park for issuing collecting licenses and logistical support.

TABLES AND FIGURES

	from 0,00 to 0,16			from 0,16 to 0,32			from 0,32 to 0,48			Sample size
	examined species	% of species pairs with total isolation	strength	examined species	% of species pairs with total isolation	strength	examined species	% of species pairs with total isolation	strength	
Embryo mortality	32	0%	0,45	32	18,7%	0,84	49	65,3%	0,98	113
Hybrid inviability	21	38,1%	-	14	42,8%	-	9	55,5%	-	44
Hybrid sterility	4	50%	0,66	2	100%	0,99	1	100%	0,99	7

TABLE 1: Relative evolutionary rates of postzygotic isolation. For each interval of genetic distance we reported the examined species (number of species pairs for which the presence/absence of the a given stage of isolation have been verified) the % of species pairs with total isolation: (relative frequency of the three postzygotic stages) the strength (mean value of the isolation index). The sample size reports the number of species pairs for each datasets.

Dataset/analysis	Embryo mortality			Hybrid sterility		
	<i>N</i>	<i>Correl</i>	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>Correl</i>	<i>P</i>
full dataset	113 (17)	0,594	0,000	7 (11)	0,732	0,029
strictly independent species pairs	8 (16)	0,571	0,048	5 (10)	0,837	0,052

TABLE 2: Correlation between postzygotic isolation and genetic distance. *N* (number of species pairs, in parenthesis, number of single taxa included in the dataset); *Correl* (Kendall's test); *P* (significance value).

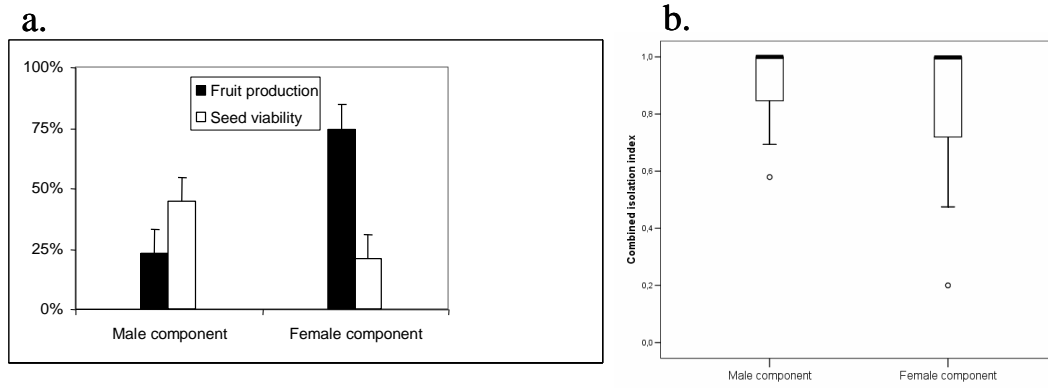


FIG.1: Difference between male and female components of hybrid sterility: a, fruit production and seed viability in crosses in which hybrid individuals were the pollen donor (male component) or the seed donor (female component); b, combined male and combined female indices.

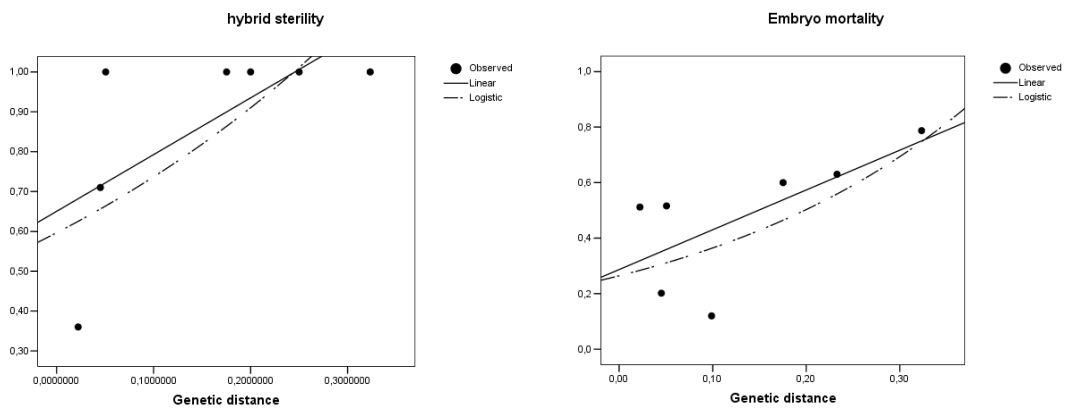


FIG 2: Hybrid sterility and embryo mortality versus genetic distance for the seven species pairs for which we gathered data for both stages of postzygotic isolation.

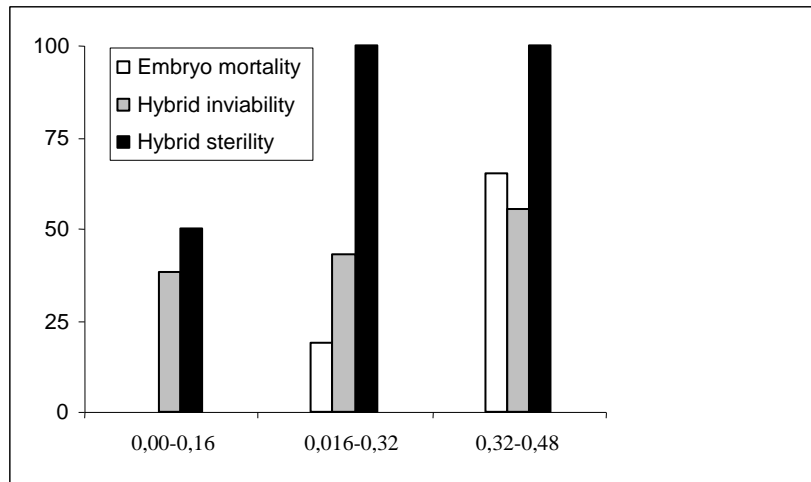


FIG. 3: Relative percentage of species pairs displaying total isolation for the three different components of postzygotic isolation within the three intervals of genetic distance. The three species pairs datasets are reported in the text.

REFERENCES

- Aceto, S., P. Caputo, S. Cozzolino, L. Gaudio, and A. Moretti. 1999. Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13: 67–76.
- Arnold M. L., 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Bateman, R. M., P. M. Hollingsworth, J. Preston, L. Yi-Bo, A. M. Pridgeon, and M. W. Chase. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 142: 1-40.
- Campbell, D. R., N. M. Waser, and E. J. Meléndez-Ackerman. 1997. Analyzing pollinator-mediated selection in a plant hybrid zone: hummingbird visitation patterns on three spatial scales. *Am. Nat.* 142: 295-315.
- Christianson S. J., J. G. Swallow, and G. S. Wilkinson. 2005. Rapid evolution of postzygotic reproductive isolation in stalk-eyed flies. *Evolution* 59: 849–857.
- Coyne J. A., and H. A. Orr. 1989. Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* 43: 362-381.
- Coyne J. A., and H. A. Orr. 1997. Patterns of speciation in *Drosophila* revisited. *Evolution* 51: 295-303.
- Coyne, J.A., and H. A. Orr. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Cozzolino, S., F. P. Schiestl, A. Müller, O. De Castro, A. M. Nardella, and A. Widmer. 2005. Evidence for pollinator sharing in Mediterranean nectar-mimic orchids: absence of pre-mating barriers? *Proc. Roy. Soc. Lond. Bio.* 272: 1271-1278.
- Cozzolino S., S. D'Emerico, and A. Widmer. 2004. Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proc. Roy. Soc. Lond. Bio.* 271: 259-262.
- Cozzolino, S., and A. Widmer. 2005a. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends Ecol. Evol.* 20: 487-494.
- Cozzolino S, and A. Widmer. 2005b. The evolutionary basis of reproductive isolation in Mediterranean orchids. *Taxon* 54: 977-985.

- Cozzolino, S., S. Aceto, P. Caputo, A. Widmer, and A. Dafni. 2001. Speciation processes in Eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: Molecular evidence and the role of pollination biology. *Israel J. Plant Sci.* 49: 91-103.
- D'Emérico, S., P. Bianco, and D. Pignone. 1996. Cytomorphological characterization of diploid and triploid individuals of *Orchis xgennarii* Reichenb fil (Orchidaceae). *Caryologia* 49: 153-161.
- D'Emérico S., S. Cozzolino, G. Pellegrino, D. Pignone, and A. Scrugli. 2002. Heterochromatin distribution in selected taxa of the 42-chromosomes *Orchis* s. l. (Orchidaceae). *Caryologia* 55: 55-62.
- Ehrendorfer, F. 1980. Hybridisierung, Polyploidie und Evolution bei europäischmediterranen Orchideen. *Jahresber. Naturwiss. Ver. Wuppertal* 33: 15-34.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* 125:1-15.
- Gardes, M. 2002. An orchid-fungus marriage - physical promiscuity, conflict and cheating. *New Phytol.* 154: 4-7.
- Gill, D. E. 1989. Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids. In: D. Otte and J. A. Endler (eds.), *Speciation and Its Consequences*, pp. 458-481. Academy of Natural Sciences Publications, Philadelphia.
- Gleason, J. M., and M. G. Ritchie. 1998. Evolution of courtship song and reproductive isolation in the *Drosophila willistoni* species complex: Do sexual signals diverge the most quickly? *Evolution* 52:1493-1500.
- Hall, E. 1997. BioEdit: A Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Levin, D. A. 1978. The origin of isolating mechanism in flowering plants. *Evol. Biol.* 11: 185-315.
- Levin, D. A. 2002. *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford Univ. Press, New York.
- Moccia, M., A. Widmer, and S. Cozzolino. In press. The strength of reproductive isolation in hybridizing food deceptive orchids. *Molec. Ecol.*

- Neiland, M. R. M., and C. C. Wilcock. 1999. The presence of heterospecific pollen on stigmas of nectariferous and nectarless orchids and its consequences for their reproductive success. *Protoplasma* 208: 65-75.
- Orr, H. A., and M. Turelli. 2001. The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities. *Evolution* 55: 1085-1094.
- Panhuis, T. M., R. Butlin, M. Zuk, and T. Tregenza. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16: 364-371.
- Posada, D., and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Presgraves, D. C. 2002. Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution* 56: 1168-1183.
- Price, T. D., and M. M. Bouvier. 2002. The evolution of F-1 postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* 56: 2083-2089.
- Quillet, M. C., N. Madjidian, T. Griveau, H. Serieys, M. Tersac, M. Lorieux, and A. Berville. 1995. Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* section *Helianthus*. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1195-1202.
- Rieseberg L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 359-389.
- Rieseberg L. H., and S. E. Carney. 1998. Tansley review number 102. Plant hybridization. *New Phytologist* 140: 599-624.
- Sasa, M. M., P. T. Chippindale, and N. A. Johnson. 1998. Patterns of postzygotic isolation in frogs. *Evolution* 52: 1811-1820.
- Stebbins G. L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Edward Arnold.
- Sweigart A. L., L. Fishman, and J. H. Willis. 2006. A simple genetic incompatibility causes hybrid male sterility in *Mimulus*. *Genetics* 172: 2465-2479.
- Swofford, D. L. 1999. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Tiffin P., M. S. Olson, and L. C. Moyle. 2001. Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. *Proc. Roy. Soc. Lond. Bio.* 268: 861-867.
- van der Cingel, N. A. 1995. *An Atlas of Orchids Pollination – European Orchids.* Balkema, Rotterdam.
- van der Pijl, L., and C. H. Dodson. 1966. *Orchid flower: their pollination and evolution.* University Miami Press, Coral Glabes.
- Wu, C. I. 1992. A note on Haldane's rule: hybrid inviability versus hybrid sterility. *Evolution* 46:1584-1587.
- Wu, C. I., and M. F. Palopoli. 1994. Genetics of postmating reproductive isolation in animals. *Annu. Rev. Genet.* 28: 283-308.
- Zhang X. S., and D. O'Neill. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by Auxin and Ethylene following pollination. *The Plant Cell* 5: 403-418.

INDICE

INTRODUZIONE

1 Definizioni di specie	pag. 3
2 Meccanismi di isolamento riproduttivo	pag. 8
2-1 Meccanismi pre-riproduttivi	pag. 9
2-2 Meccanismi post-riproduttivi	pag. 15
3 Cronologia dell'isolamento riproduttivo	pag. 20
4 Ibridazione	pag. 28
5 Modelli di speciazione	pag. 32
6 La famiglia delle Orchidaceae	pag. 36
6-1 Impollinazione ed isolamento nelle orchidee	pag. 38
6-2 Ibridazione e speciazione nelle orchidee	pag. 44
<i>Oggetto e scopo della ricerca</i>	pag. 50
Bibliografia	pag. 52
CAPITOLO 1: <i>PATTERNS OF REPRODUCTIVE ISOLATION IN MEDITERRANEAN ORCHIDS</i>	pag. 61
CAPITOLO 2: <i>HYBRIDIZATION AND POSTZYGOTIC ISOLATION IN FOOD DECEPTIVE ORCHIDS</i>	pag. 102