

## Résultats de croisements entre *Globodera pallida* Stone et *G. "mexicana"* Campos-Vela : hérabilité du développement sur pomme de terre et notion d'espèce

Murielle THIÉRY\*, Didier MUGNIÉRY\*, Michel BOSSIS\* et Carlos SOSA-MOSS\*\*

\* Laboratoire de la Chaire de Zoologie de l'ENSA de Rennes, INRA, B.P. 29, 35653 Le Rheu Cedex, France, et \*\* Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de Mexico, Chapingo 56230, Mexique.

Accepted for publication 10 January 1997.

**Résumé** - Chez la pomme de terre, les juvéniles de *Globodera "mexicana"* n'induisent pas de syncytium. Des hybridations de cinq populations de *G. "mexicana"* et de deux populations de *G. pallida* sont réalisées *in vitro* et les hybrides directs et les résultats de divers croisements en retour sont étudiés sur pomme de terre et sur tomate. Tous les hybrides F1 héritent de la capacité à induire des syncytia chez la pomme de terre. Selon le parent femelle *G. pallida* utilisé, ces syncytia permettent le développement de mâles et de femelles ou seulement de mâles. Dans ce dernier cas, la capacité à produire des femelles apparaît progressivement après croisements en retour successifs sur femelle *G. pallida*. L'incompatibilité cytoplasmique dépend également des couples utilisés. Avec *G. pallida* Pa1 Duddingston, cette incompatibilité est très atténuée. En fonction de ces résultats, la notion d'espèce et de coenospécies est discutée.

**Summary - Crossing between *Globodera pallida* Stone and *G. "mexicana"* Campos-Vela: species concept and heritability of the development on potato** - The juveniles of *Globodera "mexicana"* invade the roots of potato and tomato, but only in the latter they initiate syncytia and develop into adult males and females. *In vitro* hybridisations were conducted between five populations of *G. "mexicana"* and two of *G. pallida*. Back-crosses were also made using females of *G. pallida*. The behaviour of the hybrids was studied on potato and tomato cultivated in Petri dishes. The F1s were able to induce syncytia in both plants. Depending of the *G. pallida* population used, these syncytia allowed the nematodes to develop into both male and female or only into male. In the latter case, the ability to develop into female increased with the number of back-crosses. The degree of cytoplasmic incompatibility depends of the parents used. With the Duddingston population of *G. pallida* Pa1, the incompatibility was weak. These results are used to discuss the concept of species and speciation.

**Mots clés** : *Globodera pallida*, *G. "mexicana"*, hybridation, développement, pomme de terre.

Toutes les espèces de *Globodera* spécifiques des Solanacées sont originaires d'Amérique. Les deux espèces provenant d'Amérique du Sud, *G. rostochiensis* Wollenweber and *G. pallida* Stone, se développent sur Solanacées tubéreuses et, en particulier, sur *Solanum tuberosum*. L'espèce originaire des Etats-Unis, *G. tabacum* Lownsberry & Lownsberry, et ses sous-espèces, *G. t. solanacearum* Miller & Gray et *G. t. virginiae* Miller & Gray, ne se développent pas sur *S. tuberosum* mais sur Solanacées sauvages non tubéreuses et sur *Nicotiana tabacum*. Le tabac n'est infesté ni par *G. pallida* ni par *G. rostochiensis*. Au Mexique, on trouve ça et là des populations de *Globodera* qui se développent en dehors des zones cultivées sur des Solanacées sauvages, tubéreuses ou non, mais pas sur *S. tuberosum*. L'une de ces populations est reportée par Campos-Vela dans une thèse non publiée comme *G. "mexicana"*.

Le statut de ces entités a été l'objet de controverses dues au fait qu'hormis pour *G. rostochiensis* aucun critère morphologique n'est discriminant (Stone, 1983 ;

Mota & Eisenback, 1993a, b, c). Les hybridations *in vitro* et l'étude de la viabilité et de la fécondité des hybrides entre ces espèces et sous-espèces (Mugniéry *et al.*, 1992) ont permis d'identifier les cloisonnements génétiques existants. L'électrophorèse bidimensionnelle de protéines (Bossis & Mugniéry, 1993) et l'analyse du polymorphisme de restriction des ITS (Thiéry & Mugniéry, 1996) ont confirmé les résultats suivants : i) *G. rostochiensis* est une espèce parfaitement séparée de toutes les autres, ii) *G. tabacum*, *G. t. solanacearum* et *G. t. virginiae* sont conspécifiques et leurs profils protéiniques sont extrêmement proches, iii) *G. "mexicana"* occupe une position particulière. Biochimiquement, cette espèce est proche de *G. pallida*. Utilisée comme mâle avec les femelles de *G. t. solanacearum* et *G. pallida*, elle donne des descendants viables, féconds et compétitifs. Etant donné la forte différence de spécificité parasitaire existant entre *G. pallida* et *G. mexicana*, nous avons étudié le comportement de *G. mexicana* sur *S. tuberosum* et les possibilités d'acquisition du développement sur

*S. tuberosum* par croisements en retour entre ces deux dernières entités.

### Matériel et méthodes

Les populations de *G. pallida* utilisées sont : Guiclan (France), pathotype Pa2/3 et Duddingston (Grande-Bretagne), pathotype Pa1. Les populations provenant du Mexique et dites *G. "mexicana"* sont les suivantes : populations codées X75-122-1 et X75-140-1 dites GM5 et GM6, récoltées par L. Miller à Huamantla et à Santa Ana, et populations Popocatepetl, Santa Ana et Tlaxcala récoltées par C. Sosa Moss et D. Mugniéry.

Les hôtes utilisés sont la pomme de terre cv. Désirée et la tomate cv. Saint-Pierre.

Les tests de comportements sur ces différents hôtes, que ce soit avec les populations utilisées ou leurs hybrides, sont conduits *in vitro* selon la méthode de Mugniéry et Person (1976). L'inoculum dispensé est de cinq juvéniles par racine. Soit directement, soit après dissection des racines, le développement des nématodes est exprimé par i) le pourcentage de pénétration, rapport existant entre le nombre de nématodes retrouvés dans les racines 15 jours après inoculation et le nombre total de juvéniles utilisés, ii) le non-développement, ou blocage, exprimé par le rapport entre le nombre de juvéniles du deuxième et troisième stades non développés ou morts et le nombre total de nématodes trouvés dans les racines, et iii) l'indice andrique exprimé par le rapport entre le nombre de mâles et le nombre de femelles développés. Pour indication, le pourcentage de femelles développées par rapport au nombre de J2 utilisés est indiqué. Les données sont analysées par le test  $\chi^2$  de Kullbach rapporté par Arbonnier (1966).

L'étude du comportement de la population GM5 sur pomme de terre et tomate est complétée par l'examen histologique des racines de pomme de terre et de tomate contaminées. Dix jours après inoculation, les zones de racines où ont pénétré les nématodes sont prélevées, fixées au glutaraldéhyde, colorées au bleu de toluidine et coupées en sections fines pour examen au microscope photonique.

Les hybridations sont réalisées *in vitro*. Les femelles vierges sont obtenues après dépôt d'un unique juvénile sur pomme de terre ou tomate cultivée en boîte de Petri. Les mâles sont prélevés dans les boîtes de Petri ayant servi au test de comportement des populations parentales ou des hybrides formés. Les croisements directs suivants sont étudiés : ♀ Guiclan  $\times$  ♂ GM5, ♀ Duddingston  $\times$  ♂ GM5 et ♂ GM5  $\times$  ♂ Duddingston. Le premier croisement en retour utilisant les hybrides Guiclan  $\times$  Santa Ana, divers croisements en retour utilisant les hybrides Guiclan  $\times$  GM5 sont testés sur pomme de terre et tomate.

### Résultats

#### COMPORTEMENT DE GM5 SUR POMME DE TERRE ET TOMATE

Chez ces deux hôtes, les juvéniles pénètrent dans les racines et se dirigent vers le cylindre central. Sur tomate, le syncytium est initié (Fig. 1B) et permet le développement des mâles et des femelles. Sur pomme de terre, aucun développement en mâle et femelle n'est observé. Les coupes histologiques (Fig. 1A) ne révèlent aucune induction de cellules géantes. Il n'est observé aucune modification cytoplasmique et pariétale dans les cellules contiguës à la capsule céphalique des nématodes, ni aucun épaississement des parois latérales de ces cellules. Les seuls dégâts visibles correspondent aux destructions des parois cellulaires consécutives à la migration des juvéniles depuis l'épiderme jusqu'au cylindre central. Par dissection de racines 15 jours après inoculation, on extrait les juvéniles non déformés par le parasitisme. Aucune modifi-

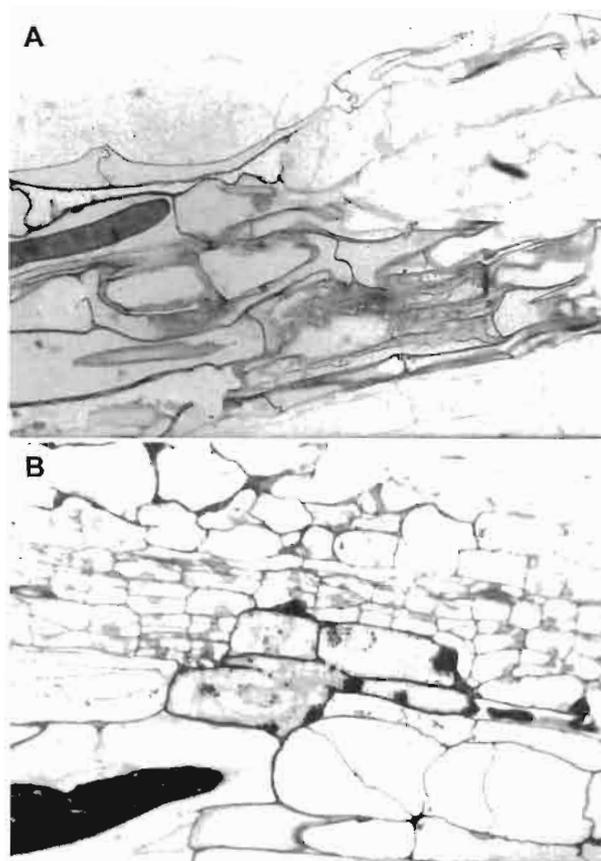


Fig. 1. Coupe de racine de pomme de terre et de tomate infestée par *Globodera "mexicana"*. A : Pomme de terre ; B : Tomate (Echelle=50  $\mu$ m).

cation du primordium génital n'est visible et la mobilité de ces juvéniles est la même qu'à l'inoculation. Le déficit de pénétration observé entre tomate et pomme de terre est dû à la difficulté de repérer des J2 dans les racines et probablement à une sortie des racines de certains juvéniles après pénétration.

Les juvéniles GM5 n'induisent donc aucune modification parasitaire chez *S. tuberosum*, soit qu'ils n'injectent pas de sécrétions salivaires dans la cellule cible destinée à devenir le syncytium, soit, plus probablement, que leurs sécrétions ne soient pas reconnues par les cellules de *S. tuberosum*.

Quinze jours après inoculation, les dissections effectuées sur *S. tuberosum* infesté par les autres populations mexicaines (GM6, Santa Ana, Tlaxcala et Popocatepetl) montrent également la présence de juvéniles non déformés par le parasitisme. Aucun mâle et aucune femelle n'est formé.

#### CROISEMENTS *G. PALLIDA* × *G. "MEXICANA"*

Les kystes provenant d'hybridations réalisées *in vitro* sont mis en éclosion individuellement. Pour chaque kyste, les 50 premiers juvéniles éclos sont déposés sur tomate, les 50 suivants sur pomme de terre. Les variations dans les résultats de développement entre kystes étant faibles, tous les résultats individuels ont été regroupés (Tableau 1).

Les F1 issus des croisements entre femelles *G. pallida* Guiclan et mâles des diverses populations de *G. "mexicana"* pénètrent et se développent dans les racines de tomate. La pénétration, le blocage et

l'indice andrique observés sont semblables à ceux observés chez les parents. Le pourcentage de femelles formées par rapport au nombre de J2 inoculés est également semblable à celui des parents, quelle que soit l'origine des mâles utilisés.

Les croisements réciproques donnent naissance à des F1 incapables de se développer dans les racines de tomate comme cela avait été observé antérieurement (Mugniéry *et al.*, 1992). A l'inverse, les F1 issus des croisements réciproques entre *G. pallida* Duddingston et *G. "mexicana"* GM5 se comportent de manière totalement différente. Leur pénétration est faible pour le croisement ♀ GM5 × ♂ Duddingston et il s'ensuit une proportion de femelles formées plus faible. De plus, le développement jusqu'au stade adulte correspondant à la libération des mâles est deux fois plus lent que la normale : à 20°C, cette durée de développement est de 30 jours contre 17 jours dans le cas des autres hybrides et des parents. On retrouve en moins accentuée l'incompatibilité cytoplasmique déjà citée entre *G. pallida* et *G. "mexicana"* (Mugniéry *et al.*, 1992).

Le développement des hybrides sur *S. tuberosum* s'effectue très mal. La pénétration est plus faible que sur tomate, bien que les difficultés déjà signalées de retrouver des J2 et J3 bloqués dans les racines 15 jours après inoculation biaisent ces résultats. Pour tous les croisements avec les femelles Guiclan, le blocage est peu important, excepté dans le cas du croisement avec les mâles Popocatepetl. Extrêmement peu de nématodes

**Tableau 1.** Comportement sur tomate et pomme de terre des hybrides directs entre *Globodera pallida* Guiclan et Duddingston et diverses populations de *G. "mexicana"*.

Mère	Père	<i>L. esculentum</i>					<i>S. tuberosum</i>				
		J2 inoculés	Pénétration (%)	Blocage (%)	Indice andrique	Femelles (%)	J2 inoculés	Pénétration (%)	Blocage (%)	Indice andrique	Femelles (%)
Guiclan	Gm5	1123	73	7	0,34	50	409	56	3	16	3
Pa2/3											
Guiclan	Gm6	930	76	13	0,33	50	344	58	9	∞	0
Pa2/3											
Guiclan	Santa Ana	1046	73	9	0,24	53	430	58	13	108	0,5
Pa2/3											
Guiclan	Tlaxcala	495	77	6	0,16	62	270	47	14	9	4
Pa2/3											
Guiclan	Popocatepetl	1098	77	11	0,12	62	438	56	79	51	0,2
Pa2/3											
Duddingston	Gm5	235	69	6	0,25	52	60	70	0	0,17	60
Pa1											
Gm5	Duddingston	398	54	13	0,50	32	94	51	6	44	1
Pa1											

**Tableau 2.** Comportement des hybrides du premier croisement de retour entre *Globodera pallida* Guiclan et *G. "mexicana"* Santa Ana.

Mère	Père	<i>L. esculentum</i>				<i>S. tuberosum</i>			
		Pénétration (%)	Blocage (%)	Indice andrique	Femelles (%)	Pénétration (%)	Blocage (%)	Indice andrique	Femelles (%)
Guiclan	Santa Ana × Guiclan	70 a	0 a	0,35 a	52	56 a	2 a	0,57 a	35
Santa Ana	× Guiclan	71 a	0 a	0,30 a	57	66 a	0 a	0,65 a	40

Dans chaque colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents à  $P \leq 5\%$ .

des atteignent le stade femelle, ce qui ne peut pas être attribué à une mortalité différentielle selon le sexe, sauf chez les croisements avec les mâles Popocatepetl où cette éventualité ne peut être écartée.

Par conséquent, il apparaît clairement que la population Popocatepetl se différencie de toutes les autres par le comportement de ses hybrides avec *G. pallida* Guiclan. D'autre part, la capacité d'induire des syncytia est transmise par *G. pallida* puisque des mâles adultes sont capables de se développer. Par contre, très peu d'hybrides héritent de la capacité à former des syncytia suffisants pour que le phénotype femelle apparaisse.

Le comportement des hybrides avec *G. pallida* Duddingston est très différent. Ils se développent sur pomme de terre de la même manière que le parent *G. pallida* dans le cas où l'incompatibilité cytoplasmique n'existe pas. Ces hybrides héritent non seulement de la capacité à induire des syncytia, mais encore à produire des syncytia suffisamment propices au développement des juvéniles en femelle.

#### ÉTUDE DES CROISEMENTS EN RETOUR

Deux croisements en retour ont été étudiés, les premiers incluant la population de Santa Ana en utilisant les mâles hybrides F1 des deux sens sur femelles de *G. pallida* Guiclan, les seconds utilisant les individus provenant des hybridations entre *G. pallida* Guiclan et GM5.

Avec la population de Santa Ana, quel que soit le sens du croisement en retour sur femelle *G. pallida* Guiclan, les hybrides se développent de façon identique sur tomate. Sur pomme de terre, les hybrides récupèrent presque intégralement la capacité de *G. pallida* à se développer en mâle et femelle (Tableau 2).

Les résultats sont très différents avec la population GM5 (Tableau 3). La capacité des hybrides du type

**Tableau 3.** Pourcentage de femelles obtenues à partir de l'inoculation de cinq juvéniles par racine de *Globodera pallida* Guiclan (GP), de *G. "mexicana"* GM5 (GM), de leurs hybrides et des différents croisements de retour réalisés.

	<i>L. esculentum</i>	<i>S. tuberosum</i>
GP	80	70
GP.GM	71	3
GP (GP.GM)	70	5
GP (GP (GP.GM))	45	27
GP [GP (GP (GP.GM))]	70	70
GM	90	0
GM.GP	0	0
GM (GP.GM)	32	0
GM (GM.GP)	38	0
(GP (GP.GM)) GP	-	52
GP [GM (GP (GP.GM))]	53	15
GM [GP (GP (GP.GM))]	1	0

NB : Pour chaque croisement (ex GP.GM), le mâle (GM) est à droite, la femelle (GP) est à gauche.

♀ *G. pallida* Guiclan × ♂ GM5 à induire chez la pomme de terre des syncytia susceptibles de permettre le développement jusqu'au stade femelle est prati-

quement nulle chez les F1. Le premier croisement en retour n'est pas suffisant pour accroître cette capacité. Il faut attendre le 3<sup>ème</sup> croisement en retour pour restaurer en totalité le caractère transmis par *G. pallida* Guiclan induisant de tels syncytia.

Le croisement inverse ♀ GM5 × ♂ *G. pallida* Guiclan manifeste clairement l'incompatibilité cytoplasmique. Que ce soit sur pomme de terre ou sur tomate, aucun juvénile n'est apte à se développer en femelle. Les seuls mâles obtenus le sont sur tomate exclusivement. Chaque fois qu'une femelle de GM5 est utilisée en croisement, elle donne des hybrides dépourvus de capacité à se développer en femelle sur tomate et sur pomme de terre.

### Conclusion

Les populations de *G. "mexicana"* présentent toutes la capacité à se développer sur tomate et l'incapacité à se développer sur pomme de terre. Cette incapacité tient plus probablement à une non-reconnaissance des cellules du végétal aux sécrétions des juvéniles. Toutes ces populations se croisent avec la population Guiclan de *G. pallida* Pa2/3 malgré une certaine incompatibilité cytoplasmique. Cette incompatibilité est très forte avec GM5. Quand les croisements sont réalisés dans le sens ♀ *G. pallida* Guiclan × ♂ *G. "mexicana"*, ils donnent naissance à des hybrides qui se développent très mal sur pomme de terre (cas de la population Popocatepetl) et dont le phénotype est presque exclusivement mâle. Les croisements en retour successifs sur femelles *G. pallida* Guiclan restaurent rapidement (cas de la population de Santa Ana) ou lentement (cas de la population de GM5) le caractère hérité de *G. pallida* à se développer en femelle sur pomme de terre. Le caractère d'induction de syncytia chez la pomme de terre, présent chez *G. pallida*, pourrait être considéré comme dominant et d'hérédité simple. La capacité à induire des syncytia suffisants pour permettre le développement en femelle est d'une héritabilité complexe, peut-être polygénique, en tout cas sans gènes majeurs évidents.

L'utilisation en croisement de la population Duddingston de *G. pallida* donne des résultats différents. Entre GM5 et *G. pallida* Duddingston, l'incompatibilité cytoplasmique est faible. De plus, les hybrides F1 formés acquièrent de *G. pallida* le caractère à se développer sur pomme de terre. Dans ces conditions, il sera intéressant d'effectuer des croisements en retour successifs sur femelles GM5 pour étudier la dilution de ce caractère au fur et à mesure des croisements. Ces deux modèles de croisement *G. pallida* Guiclan × GM5 et *G. pallida* Duddingston × GM5 sont extrêmement intéressants : comme dans le schéma de sélection décrit par Janssen (1990) sur *G. rostochiensis*, il est possible d'obtenir des individus frères/soeurs ayant ou non la capacité à se développer en femelle sur pomme

de terre. Une analyse différentielle de leurs protéines pourrait permettre de corréliser ce caractère à une ou plusieurs protéines comme cela a été fait par Dalmaso *et al.* (1990) sur les populations virulentes et avirulentes de *Meloidogyne incognita*. De même, il devrait être possible de caractériser des marqueurs moléculaires de ce caractère.

Enfin, le statut spécifique de *G. "mexicana"* n'est pas clair. Les hybridations effectuées entre *G. "mexicana"* et les autres espèces de *Globodera* montraient l'existence d'une barrière génétique faible avec *G. pallida* (Mugniéry *et al.*, 1992). L'utilisation de la population Duddingston de *G. pallida* montre qu'entre cette population et GM5, il n'existe pratiquement aucune barrière génétique. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Bossis et Mugniéry (1993) qui montrent que la distance génétique calculée sur les protéines révélées en double dimension entre *G. pallida* et *G. "mexicana"* est faible et se situe au niveau infraspécifique. Par contre, les résultats obtenus par Thiéry et Mugniéry (1996), qui infirment ce point de vue, placent résolument *G. "mexicana"* dans une unité taxinomique distincte de *G. pallida*. Il est possible de supposer que ces deux entités, globalement proches génétiquement, le sont suffisamment pour que chaque outil utilisé donne des résultats contradictoires. Cependant la proximité génétique globale est telle que l'on peut trouver des populations proches qui se croisent (GM5 et la population de Duddingston) ou moins proches qui ont déjà élevé des barrières partielles (GM5 et la population de Guiclan). La comparaison avec l'"overlapping ring" décrit par Ticehurst (1938) sur l'oiseau *Phylloscopus trochiloides* pourrait être fondée si l'on avait trouvé une chaîne ininterrompue de sous-espèces appartenant à la même espèce. Les comparaisons faites avec les études d'espèces réalisées le plus souvent chez les vertébrés conduisent plus à la notion de coenospécies de Turesson (1922), l'interstérilité dans les conditions naturelles n'étant due qu'à l'isolement géographique, toujours prépondérant chez les espèces édaphiques à déplacements nuls. Il sera intéressant de surveiller les hybridations naturelles au Mexique entre populations locales de *G. "mexicana"* et populations importées de *Globodera* sp.

### Remerciements

Cette étude a été en partie financée par le contrat de recherche AIR 94 0856, portant sur l'origine des infestations de nématodes à kyste des Solanacées en Europe. Les auteurs en remercient la Communauté Européenne.

### Références

- ARBONNIER, P. (1966). L'analyse de l'information. Aperçu théorique et application à la loi multinomiale. *Annls Sci. forest.*, 23: 950-1017.
- BOSSIS, M. & MUGNIÉRY, D. (1993). Specific status of *Globodera* parasites of solanaceous plants studied by means of two-dimensional gel electrophoresis with a comparison of

- gel patterns by a computed system. *Fundam. appl. Nematol.*, 16: 47-56.
- CAMPOS-VELA, A. (1967). *Taxonomy, life cycle and host range of Heterodera mexicana n. sp. (Nematoda: Heteroderidae)*. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, USA, 70 p.
- DALMASSO, A., CASTAGNONE-SERENO, P., BONGIOVANNI, M. & DE JONG, A. (1990). Acquired virulence in the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. 2. Two-dimensional analysis of isogenic isolates. *Revue Nématol.*, 14: 305-308.
- JANSSEN, R. (1990). *Genetics of virulence in potato cyst nematodes*. Ph. D. Thesis, University Wageningen, The Netherlands, 71 p.
- MOTA, M. M. & EISENBACK, J. D. (1993a). Morphology of second-stage juveniles and males of *Globodera tabacum tabacum*, *G. t. virginiae*; and *G. t. solanacearum* (Nemata: Heteroderinae). *J. Nematol.*, 25: 27-33.
- MOTA, M. M. & EISENBACK, J. D. (1993b). Morphometrics of *Globodera tabacum tabacum*, *G. t. virginiae*, and *G. t. solanacearum* (Nemata: Heteroderinae). *J. Nematol.*, 25: 148-160.
- MOTA, M. M. & EISENBACK, J. D. (1993c). Morphology of females and cyst of *Globodera tabacum tabacum*, *G. t. virginiae*, and *G. t. solanacearum* (Nemata: Heteroderinae). *J. Nematol.*, 25: 136-147.
- MUGNIÉRY, D., BOSSIS, M. & PIERRE, J.-S. (1992). Hybridations entre *Globodera rostochiensis* (Wollenweber), *G. pallida* (Stone), *G. virginiae* (Miller & Gray), *G. solanacearum* (Miller & Gray) et *G. "mexicana"* (Campos-Vela). Description et devenir des hybrides. *Fundam. appl. Nematol.*, 15: 375-382.
- MUGNIÉRY, D. & PERSON, F. (1976). Méthode d'élevage de quelques nématodes à kyste du genre *Heterodera*. *Sci. agron., Rennes*, 217-220.
- STONE, A. R. (1983). Three approaches to the status of a species complex, with a revision of some species of *Globodera*. In: Stone, A.R., Platt, H.M. & Khalil, L.F. (Eds). *Concepts in nematode systematics*. London, UK, Academic Press: 221-223.
- THIÉRY, M. & MUGNIÉRY, D. (1996). Interspecific spacers rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of Solanaceous plants. *Fundam. appl. Nematol.*, 19: 471-479.
- TICEHURST, C.B. (1938). *A systematic review of the genus Phylloscopus*. London, UK, British Museum, 193 p.
- TURESSON, G. (1922). The species and the variability as ecological units. *Hereditas*, 3: 100-113.