

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Evoluzionistica



**TESI DI LAUREA**

Analisi morfometrica di alcune specie di coleotteri cavernicoli  
del genere *Neobathyscia* delle Prealpi Vicentine

Morphometrics analyses of some species of cave beetles  
of genus *Neobathyscia* in the Vicentine pre-Alps

**Relatore:** Prof. Giuseppe Fusco  
Dipartimento di Biologia

**Correlatore:** Dott. Leonardo Latella  
Museo Civico di Storia Naturale di Verona

**Laureando:** Alessandro Altamura

**Anno Accademico: 2021/2022**

# INDICE

1	Premessa.....	2
2	Introduzione.....	3
2.1	L'ambiente sotterraneo.....	3
2.2	Fattori abiotici che influenzano la vita nell'ecosistema cavernicolo.....	3
2.3	Troglomorfa, adattamenti alla vita sotterranea.....	4
2.4	Ecologia degli organismi cavernicoli.....	5
2.5	I Coleotteri Colevini.....	6
3	Materiali e metodi.....	8
3.1	Area di studio.....	8
3.2	Raccolta degli esemplari.....	10
3.3	Smistamento e determinazione.....	11
3.4	Preparazione dei campioni.....	11
3.5	Morfometria geometrica.....	13
3.6	Elenco faunistico.....	16
3.7	Analisi dei dati.....	18
3.7.1	Analisi della varianza.....	18
3.7.2	Analisi delle componenti principali (PCA).....	18
3.7.3	Analisi delle componenti canoniche (CVA).....	19
3.7.4	Analisi dell'integrazione morfologica tra addome e pronoto.....	19
3.7.5	Analisi del dimorfismo sessuale.....	19
4	Risultati.....	20
4.1	Analisi della varianza.....	20
4.2	Analisi delle componenti principali (PCA).....	21
4.3	Analisi delle componenti canoniche (CVA).....	25
4.4	Analisi dell'integrazione morfologica tra addome e pronoto.....	29
4.5	Analisi del dimorfismo sessuale.....	31
5	Discussione e Conclusioni.....	34
6	Bibliografia.....	38

# 1. PREMESSA

Nonostante l'interesse dell'uomo per le forme abitative del sottosuolo abbia radici profonde nel tempo, l'effettiva nascita della disciplina che si occupa dello studio degli organismi del sottosuolo risale al 1831, con la descrizione di *Leptodirus hochenwarti* ad opera di Ferdinand Schmidt, e divenne campo di studi indipendente soltanto nel 1904 quando Armand Viré coniò il termine "biospeleologia". La nascita della moderna disciplina scientifica biospeleologica fu sancita nel 1907 con la pubblicazione degli "Essai sur les problèmes biospéologique" di Emile Racovitz, il quale, per primo, analizzò schematicamente le caratteristiche fisiche e biologiche degli ambienti sotterranei e le relazioni ecologiche tra gli organismi e tali ambienti. Quest'ultimo, tra i molti meriti scientifici, ebbe anche quello di avere tra i primi applicato alla distribuzione degli animali cavernicoli i principi di quella che ai tempi era un'altra giovane disciplina, la biogeografia.

A discapito dell'etimologia del termine riferito a questa disciplina, la biospeleologia non volge il suo interesse soltanto alle grotte intese come cavità "esplorabili dall'uomo", ma si occupa dello studio di tutto quell'insieme di fessurazioni che costituiscono il reticolo di spazi di dimensioni variabili che si vengono a formare all'interno dei corpi rocciosi del sottosuolo e che ne permettono la colonizzazione da parte di organismi.

Anche in Italia, nei primi decenni del '900, cominciarono i primi studi sulla fauna cavernicola, ma fu negli anni Trenta e soprattutto nel periodo successivo al termine del secondo conflitto mondiale che la biospeleologia italiana cominciò a fornire il suo fondamentale apporto allo sviluppo di questi studi nel mondo. In questo contesto, il Museo di Storia Naturale di Verona ebbe un ruolo centrale nell'approfondire notevolmente la conoscenza degli ambienti ipogei e della fauna associata ad essi (fu proprio presso il Museo che nel 1950 fu istituita la Società Speleologica Italiana). In quel periodo e negli anni successivi fu centro nevralgico degli studi degli ecosistemi cavernicoli e molte delle esplorazioni furono condotte nelle cavità presenti nel Veneto che, grazie alla diffusa presenza di ambienti carsici, fornì (e fornisce) un preziosissimo bacino di informazioni per la biospeleologia. In queste grotte sono state scoperte molte specie strettamente dipendenti all'ambiente ipogeo, alcune delle quali sono endemiti di singole cavità.

Tra di esse si annoverano i Leiodidi del genere *Neobathyscia*, coleotteri adattati alla vita cavernicola presenti sulle Prealpi Vicentine (secondo la definizione fornita dalla SOIUSA, la Suddivisione Orografica Internazionale Unificata del Sistema Alpino), dei quali sono note unicamente analisi biometriche effettuate su pochi individui.

Attraverso l'uso della morfometria geometrica, l'obiettivo di questo lavoro è quello di analizzare la forma di sette specie e una sottospecie di insetti appartenenti a questo genere, verificare se ci siano differenze di rilievo tra di esse e proporre un'ipotesi sui possibili eventi che hanno contribuito a produrre eventuali differenze morfologiche.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 L'ambiente sotterraneo

Gli ambienti sotterranei terrestri possono essere divisi in tre gruppi distinti:

- **cavità artificiali**, scavate dall'uomo, come, ad esempio, cantine, gallerie, catacombe, miniere, pozzi (Latella & Stoch, 2001);

- **ambiente sotterraneo superficiale (MSS)**, formato dall'insieme di detriti pietrosi e microfessure nella roccia al di sotto dell'orizzonte più profondo del terreno, ad un livello che può variare da poche decine di centimetri fino a qualche metro. La sua genesi è dovuta all'azione disagregativa svolta da agenti atmosferici e dagli organismi viventi, i quali attuano un'azione di disagregazione meccanica e chimica (Latella & Stoch, 2001). Nell'MSS le condizioni climatiche risultano meno variabili rispetto all'ambiente epigeo anche se da esso vi è un certo grado di dipendenza, cosa che non avviene in contesti di grotta in senso stretto. La variazione di temperatura nell'MSS risulta dimezzato rispetto al range di variazione esterno e il tasso di umidità relativa tipicamente si attesta attorno a valori di saturazione (Latella & Sbordonì, 2002);

- **cavità naturali**, che comprendono principalmente le grotte carsiche e laviche. Le prime si originano in ambienti ricchi di depositi carbonatici, composti da rocce calcaree di origine sedimentaria formatesi soprattutto dalla deposizione di carbonato di calcio sul fondale marino, derivante dai resti di esseri viventi che popolavano antichi mari. Le cavità si formano grazie all'azione erosiva dell'acqua associata alla presenza di anidride carbonica che la acidifica e la rende aggressiva, dissolvendo il carbonato di calcio, combinata a processi gravitativi come crolli e scollamenti di strati ed è condizionata dal clima del luogo e dalla copertura vegetale (Latella & Stoch, 2001). Le grotte laviche, invece, si originano dal transito di colate di lava di natura basaltica ove il consolidamento della parte superficiale della stessa e il concomitante scorrimento della parte interna più fluida genera condotti.

### 2.2 Fattori abiotici che regolano la vita nell'ecosistema cavernicolo

L'ambiente cavernicolo è caratterizzato da diversi fattori abiotici che influenzano la morfologia, la fisiologia e la vita delle specie animali che lo popolano. La luce scompare dopo pochi metri dall'entrata delle cavità e rappresenta il principale elemento di distinzione tra gli ecosistemi ipogei ed epigei. La mancanza di illuminazione determina negli ambienti sotterranei un impoverimento della quantità di risorse alimentari in quanto la fotosintesi clorofilliana, principale meccanismo di produzione primaria di sostanza organica, può avvenire solo a ridosso dell'imboccatura delle grotte. Questo fatto impedisce la colonizzazione degli ambienti ipogei alla maggior parte degli organismi che, nel corso dell'evoluzione, si sono adattati ad un regime alimentare fitofago e ciò esclude da questo ecosistema tutti gli erbivori, dagli invertebrati ai mammiferi.

La base della piramide alimentare, pertanto, è costituita prevalentemente da microrganismi come batteri eterotrofi o funghi che si sviluppano utilizzando il detrito di natura animale e vegetale di origine esterna. La temperatura è generalmente costante e corrisponde alla media annua della temperatura esterna. Si tratta, quindi, di un parametro strettamente legato alla latitudine ed all'altitudine in cui si sviluppa la cavità e rappresenta anch'essa un fattore che condiziona la vita animale negli ambienti sotterranei.

L'umidità nelle grotte è spesso prossima ai valori di saturazione ed è uno dei fattori limitanti più importanti per gli organismi cavernicoli veri e propri, molti dei quali trovano il loro intervallo di tolleranza in valori elevati di umidità relativa (95-100%) (Latella & Stoch, 2001).

### 2.3 Troglomorfia, adattamenti alla vita sotterranea

Come già evidenziato, l'assenza di produttori primari ha conseguenze dirette sulla struttura della rete trofica che risulta impoverita rispetto agli ambienti epigei. Pertanto, la maggior parte delle risorse energetiche provengono dall'esterno tramite fenomeni di percolazione o di trasporto da parte di animali e la loro distribuzione risulta irregolare sia spazialmente che temporalmente all'interno delle cavità. In risposta a tale carenza energetica la fauna ipogea mostra tipicamente un metabolismo rallentato associato ad una elevata longevità (Sbordoni et al., 1982).

Parametri ambientali come temperatura, umidità e mancanza di illuminazione, generalmente rimangono costanti nel tempo e determinano la perdita dei ritmi circadiani e della stagionalità. La riproduzione diventa aperiodica e le specie di



Fig. 1 - Celletta di ninfosi di coleottero Leptodirino cavernicolo (Foto L. Latella)

insetti cavernicoli depongono uova più grandi e in numero minore per generazione rispetto alle specie epigee affini. Esse, inoltre, mostrano una progressiva tendenza nella diminuzione del numero di stadi larvali e un allungamento del ciclo stesso in associazione con il grado di specializzazione alla vita ipogea. Il tempo di vita libero della larva risulta ridotto; la larva, poco tempo dopo la schiusa dell'uovo, costruisce una celletta di argilla in cui si rinchiede per diversi mesi fino al

raggiungimento della forma immaginale (Fig. 1). Queste caratteristiche adattative si sono probabilmente evolute in risposta alla povertà trofica dell'ambiente sotterraneo e permettono di regolare la popolazione rispetto alla ridotta capacità portante dell'ambiente. (Sbordoni et al., 1982).

La risorsa alimentare di maggior rilevanza nelle grotte abitate da pipistrelli è il guano, il quale consente l'instaurarsi di una catena alimentare alla cui base vi sono organismi detritivori, saprofiti e decompositori, mentre i livelli trofici successivi sono costituiti da predatori.

L'assenza di luce ha delle conseguenze anche sulla morfologia e sulla fisiologia degli animali del sottosuolo, i quali sono spesso depigmentati in relazione alla perdita di funzione del cromatismo in ambienti oscuri.

Anche il senso della vista perde la sua funzionalità al buio, infatti gli animali cavernicoli presentano una generalizzata riduzione delle strutture associate alla

vista (microftalmia) o la loro scomparsa (anoftalmia). Alla regressione di tali strutture è generalmente associata la perdita delle ali e lo sviluppo di arti, appendici e organi di senso che permettono un incremento della percezione dello spazio circostante attraverso altri canali sensoriali (Latella, 2011).

## 2.4 Ecologia degli organismi cavernicoli

Gli organismi cavernicoli discendono da antenati che vivevano all'esterno, molti dei quali, a causa dei cambiamenti climatici e geografici avvenuti in passato, si sono inoltrati all'interno delle caverne. Qui, le condizioni climatiche rimasero più favorevoli alla vita per alcune specie e il prolungato isolamento dalle popolazioni esterne portò alla genesi di nuove specie (Holsinger, 2000). Per gli organismi che vivono nelle grotte si utilizza una classificazione proposta da Schiner nel 1854 (Schmidl, 1854), adottata da Racovitza (Racovitza, 1907), successivamente modificata da Pavan (Pavan, 1944) e poi riveduta da Ruffo nel 1955 (Ruffo, 1955). Quest'ultima classificazione è tuttora quella che meglio rende conto dei complessi rapporti tra gli organismi viventi e le grotte (Sket, 2004).

In base all'affinità per la vita in ambienti sotterranei, gli organismi possono essere classificati in tre categorie ecologiche principali:

- **troglosseni**, sono gli animali che si trovano in grotta accidentalmente, come quelli fluitati dalle acque o caduti all'interno di pozzi nelle grotte verticali. In questa categoria rientrano, ad esempio, alcuni mammiferi come volpi e istrici, anfibi, molluschi e artropodi, i quali possono inoltrarsi in cavità alla ricerca di cibo o usarle come momentaneo rifugio per la presenza di condizioni avverse all'esterno;

- **troglofili**, presenti con maggiore regolarità nelle grotte, categoria che si può dividere in due diversi termini. Gli organismi subtroglofili sono quelli che si trovano in ambienti ipogei solo in alcuni periodi della loro vita e non presentano rilevanti adattamenti a questi ambienti. A questa categoria appartengono, ad esempio, i pipistrelli, che permangono nelle cavità solo in alcuni periodi dell'anno o della giornata. Gli eutroglofili, invece, sono coloro che, pur avendo una predilezione per gli ambienti cavernicoli e mostrando particolari adattamenti morfologici, come le cavallette cavernicole (Ortotteri Rafidoforidi), possono vivere e anche riprodursi all'esterno;

- **troglobi**, animali che mostrano gli adattamenti più spinti per la vita cavernicola. Essi compiono interamente il loro ciclo vitale all'interno delle grotte o in ambienti contigui, come nel cosiddetto ambiente sotterraneo superficiale.

Questa è una categorizzazione che non sempre è possibile applicare ai diversi organismi che frequentano gli ambienti sotterranei, ma spesso si dimostra utile per un inquadramento ecologico dei popolamenti.

## 2.5 I Coleotteri Colevini

I Colevini (sottofam. Cholevinae) sono un gruppo di coleotteri stafilinoidei appartenenti alla famiglia Leiodidae, di piccola o media taglia (generalmente tra 1 e 10 mm) diffusi in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide.

A questa sottofamiglia appartengono 7 tribù, di cui 4 (Ptomaphagini, Anemadini Cholevini e Leptoridini) sono diffuse su tutto il territorio italiano e presentano il più alto numero di specie concentrato nella porzione centro-orientale delle Alpi.

Attualmente sono stati descritti globalmente

335 generi e 2050 specie di Cholevinae (Antunes-Carvalho et al. 2019), di cui 285 tra specie e sottospecie, appartenenti a 63 generi, sono note in Italia (Latella 2022, in press).

La tribù Leptoridini, composta da 46 generi e 202 specie, costituisce il gruppo più ricco di specie endemiche di ambienti ipogei ed epigei in Italia e rappresenta uno dei più straordinari esempi di radiazione adattativa in ecosistemi cavernicoli (Latella 2022, in press).

L'adulto possiede una colorazione che varia tra il giallo e il bruno a seconda dello spessore della chitina che compone l'esoscheletro. Il capo è generalmente ipognato (alcune specie presentano un capo prognato) e retrattile e le antenne sono formate da 11 antenomeri. Questi animali sono tendenzialmente detritivori e spesso tendono a concentrarsi presso accumuli di guano laddove vi sia la presenza di chiroterri entro le grotte.

Questo gruppo altamente specializzato popola grotte, MSS e cavità artificiali e presenta evidenti adattamenti alla vita in questi ambienti. Questi consistono, principalmente, in un maggior sviluppo e nell'accentuata

funzionalità delle strutture sensoriali sostitutive alla vista, la quale è fortemente ridotta (microftalmia) o del tutto scomparsa (anoftalmia), con un contemporaneo accrescimento di antenne, palpi e arti, che permette un incremento della percezione dell'ambiente circostante. L'allungamento delle antenne è seguito anche dallo sviluppo degli organi di senso in esse localizzati (chemiocettori, igrocettori, tattocettori). Tra questi, particolarmente importanti sono gli igrocettori che rilevano il tasso di umidità. Un esempio è fornito dall'organo di Hamann (Fig. 3), una particolare struttura che consente agli animali di valutare il grado di umidità in modo tale da evitare di avventurarsi in zone troppo secche in cui difficilmente sopravvivrebbero (Accordi & Sbordon, 1978).



Fig. 2 - *N. fabianii*. Barra di scala 1mm.



Fig. 3 - Antenna di coleottero cavernicolo con organo di Hamann, situato all'interno del VII antenomero, indicato dalla freccia (foto L. Latella).

Oltre alle appendici, anche la forma del corpo di questi animali differisce notevolmente dalle specie epigee loro affini. Molte specie di grotta presentano una notevole differenza nella forma di protorace e addome, i quali, nelle specie che non presentano spiccati adattamenti alla vita sotterranea, spesso risultano poco distinguibili l'uno dall'altro, conferendo un aspetto ovoidale all'animale. Questa forma viene definita "bathiscioide" (Fig. 2). Una morfologia intermedia è rappresentata dalla forma "pholeunoide", che si ritrova nelle specie con maggior affinità alla vita di grotta, le quali presentano un più marcato allungamento del corpo e delle estremità. La forma più estrema è rappresentata da quella "leptodiroide", in cui il protorace acquisisce una forma allungata e cilindrica. A questa diversa morfologia del protorace è associato un notevole sviluppo della superficie addominale ed elitrale, la quale assume un aspetto globoso. Tale modificazione, detta "falsa fisogastria", consente di immagazzinare aria umida sotto le elitre ed utilizzarla durante gli spostamenti in zone più secche (Fig. 4). In questi animali si nota una diminuzione degli apparati respiratori classici (stigma e trachee) e lo scambio gassoso avviene direttamente sulla superficie tergale, ridotta ad una sottile membrana situata nella camera respiratoria sotto le elitre rigonfie (Latella, 2011).



Fig. 4 - Diverso grado di adattamento all'ambiente ipogeo in Coleotteri Leptodirini (foto L. Latella). Da sinistra: *Parabathyscia wollastoni* (troglosseno), *Boldoria baldiensis* (eutroglofilo), *Patriziella nuragica* (troglobio), *Leptodirus hochenwarti* (troglobio).



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Area di studio

L'area geografica che contiene l'areale delle specie di *Neobathyscia* analizzate in questo lavoro è compresa nelle Prealpi Vicentine, una sottosezione delle Prealpi Venete secondo la definizione della SOIUSA, la Suddivisione Orografica Internazionale Unificata del Sistema Alpino (Fig. 5) (Marazzi, 2005).

La porzione centrale di quest'area è definita dall'altopiano dei Monti Lessini, i quali si sviluppano principalmente a nord della città di Verona e costituiscono una serie di dorsali intervallate da valli che si diramano verso Sud. Sono delimitate a Nord dalla Valle di Ronchi e dal gruppo del Monte Carega, a Est dalla Val Leogra, a Ovest dalla Val Lagarina e a Sud dal corso dell'Adige. La geomorfologia dei Monti Lessini costituisce un comparto a sé stante delle Prealpi Venete in quanto vi è la quasi totale assenza di circolazione superficiale delle acque dovuta alla presenza di numerose faglie che drenano le acque meteoriche. In questo contesto geologico l'acqua si infila nelle varie fessurazioni rocciose e porta alla formazione di una fitta rete di cavità di origine sia ipogenetica che epigenetica (Latella & Sauro, 2011). In un'area che presenta tali caratteristiche gli spostamenti della fauna troglobia sono facilitati e ciò riflette la presenza di popolazioni cavernicole appartenenti alla stessa specie che non sono confinate in singole cavità ma, invece, risultano presenti in più grotte anche a diversi chilometri di distanza le une dalle altre.

Il segmento più a Nord dell'areale si estende nella porzione settentrionale delle Prealpi Vicentine, delimitate a Nord dal Gruppo degli Altipiani, situato a Sud-Est della provincia di Trento, ed è formato dall'Altopiano di Folgaria, dall'Altopiano di Lavarone e da quello di Asiago. In questa zona sono presenti due specie di *Neobathyscia*.

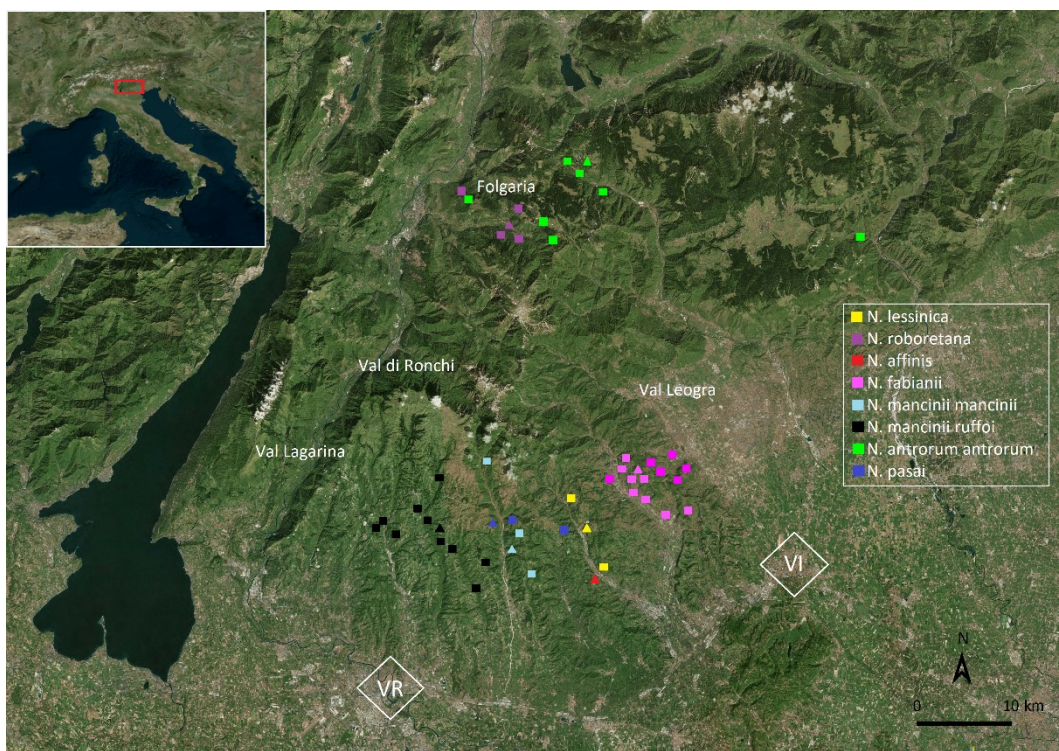


Fig. 5 - Distribuzione delle specie analizzate (i triangoli sono riferiti ai siti da cui derivano gli esemplari esaminati).

### 3.2 Raccolta degli esemplari

Gli esemplari sottoposti all'analisi di morfometria geometrica provengono da 8 diversi siti delle Prealpi Vicentine. Data la notevole difficoltà nel reperire alcune di queste specie, gli esemplari di *N. fabianii* e *N. mancinii ruffoi* provengono dalla collezione privata del Museo di Storia Naturale di Verona, frutto di campionamenti precedenti, mentre gli individui di *N. antrorum antrorum* sono stati gentilmente forniti da Andrea Carlin, appassionato entomologo che ha partecipato ad alcune delle ricerche effettuate durante questo studio (Tab. 1).

Il totale degli esemplari analizzati ammonta a 117.

La campagna di campionamento per i diversi siti ha previsto sia l'utilizzo di strumenti per la raccolta diretta, sia l'uso di trappole.

La raccolta diretta è avvenuta mediante l'uso di pinzette entomologiche (particolarmente morbide e funzionali a non rovinare gli insetti) e aspiratore (Fig. 6). Quest'ultimo è composto da un barattolo su cui sono inseriti due tubi di gomma di differente lunghezza. Una volta posto il tubicino più corto vicino all'insetto da catturare, l'aspirazione meccanica dell'aria dall'estremità del tubo più lungo permette l'ingresso dell'animale nella provetta. Inoltre, l'imboccatura della cannula lunga, nella porzione interna del contenitore, è dotata di un filtro che funge da barriera ed evita che, durante la fase di aspirazione, l'esemplare possa finire all'interno della bocca.



Fig. 6 - Aspiratori (Foto di L. Latella).

Una volta raggiunto un quantitativo di individui sufficiente per condurre l'analisi, gli insetti sono stati trasferiti in provette contenenti alcool al 90%.

Questa tecnica, tuttavia, non è stata utilizzata per tutti i siti di campionamenti in quanto non è stato possibile osservare la presenza degli insetti di interesse durante tutte le attività di ricerca. Per ovviare alla scarsa reperibilità di campioni sono state posizionate delle *pitfall traps* in diverse zone delle grotte visitate, in modo da incrementare la probabilità di cattura.

Le trappole a caduta sono dei contenitori di circa 10 cm di diametro e 15 cm di profondità, riempiti per circa metà del volume con una soluzione satura di acqua e sale (NaCl) al cui interno viene posta una provetta contenente un piccolo piombo e l'esca. Il sale ha la funzione di favorire la conservazione dei campioni, la provetta permette la separazione dell'esca dalla soluzione salina ed il piombino (o un sasso delle apposite dimensioni) impedisce che la provetta possa rovesciarsi. L'esca utilizzata è costituita da formaggio Gorgonzola, il quale risulta molto efficace nell'attrarre artropodi saprofagi. Infine, i contenitori sono stati interrati fino all'orlo e coperti da sassi, in modo tale che fosse permesso l'accesso agli artropodi di piccole dimensioni e, allo stesso tempo, esso fosse impedito ai mammiferi di passaggio attirati dall'esca.

Inoltre, sono state piazzate anche delle trappole a secco, prive di soluzione salina, in modo tale che al successivo campionamento gli esemplari catturati fossero ancora vivi e utilizzabili per analisi molecolari.

Le trappole, dopo essere state posizionate, sono state lasciate sul posto mediamente 15 giorni.

Ad ogni raccolta, le trappole sono state ripulite dall'eventuale accumulo di acqua e detriti e il contenuto è stato trasferito in provette contenenti alcool al 90%.

SPECIE	SITO DI CAMPIONAMENTO	N° CATASTO	DATA DI RACCOLTA	N° INDIVIDUI
<i>N. affinis</i>	Grotta del Vento	0007	26/02/2021	13
<i>N. fabianii</i>	Buso della Rana*	0040	32/01/1985	15
<i>N. lessinica</i>	Buso della Stria	0021	13/06/2021	15
<i>N. mancinii mancinii</i>	Grotta Damati	0009	04/02/2021	16
<i>N. mancinii ruffoi</i>	Grotta di Monte Capriolo*	1071	05/08/2014	12
<i>N. pasai</i>	Covolo della Croce	0085	08/11/2020	15
<i>N. antrorum antrorum</i>	Spiazzo della Volpe	N.C.	26/04/2006	15
<i>N. roboretana</i>	Lont del lachè	419	10/12/2021	16

Tabella 1 - Tabella riassuntiva dei campionamenti (N.C. = grotta non catastata).

\*indica il sito da cui provengono i campioni conservati presso il Museo di Storia Naturale di Verona utilizzati in questo studio.

### 3.3 Smistamento e determinazione

In laboratorio, il materiale raccolto sul campo è stato trasferito in una capsula Petri ove si è proceduto, mediante anche all'uso di pinzette entomologiche e stereomicroscopio binoculare LEICA M 165 C, a separare i coleotteri appartenenti al gruppo di interesse dal resto degli artropodi.

La determinazione a livello di specie è stata controllata dal Dottor Latella del Museo Civico di Storia Naturale di Verona.

### 3.4 Preparazione dei campioni

Il focus di questa analisi era verificare se vi fossero differenze morfologiche statisticamente rilevanti nelle diverse specie di *Neobathyscia* campionate e analizzarne le relative forme. A questo scopo, attraverso l'uso di stereomicroscopio e microaghi, sono state separate le parti del corpo relative a pronoto e addome di ogni singolo individuo. Inoltre, è stato asportato il contenuto addominale per verificare il sesso degli individui. Questo processo è risultato particolarmente delicato in quanto si tratta di animali molto piccoli (2 mm circa) e l'eventuale danneggiamento dell'esoscheletro avrebbe compromesso la successiva analisi morfometrica.

Una volta separate, le due porzioni del corpo sono state fissate su cartellini entomologici con l'ausilio di pennellini, microaghi e colla entomologica (Fig. 7).

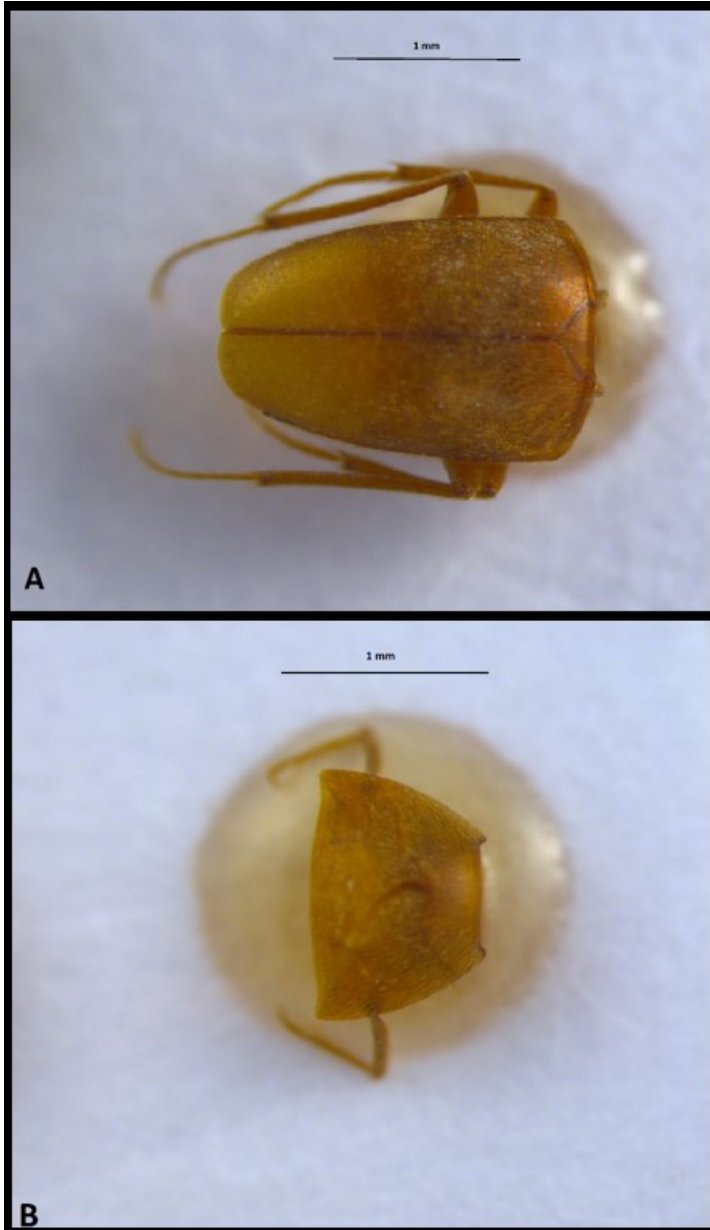


Fig. 7 - Immagine dorsale di addome (A) e pronoto (B) di un individuo di *N. antrorum*.



### 3.5 Morfometria geometrica

Le immagini in visione dorsale di pronoto e addome sono state acquisite tramite l'utilizzo di una fotocamera digitale LEICA DFC 450 montata su uno stereomicroscopio LEICA M 165 C con uno zoom standard (2.5x) per tutti i preparati. I landmark sono stati localizzati su strutture anatomiche omologhe e ben identificabili (Adams et al., 2013). Tuttavia, dato che questi animali presentano una morfologia corporea piuttosto arrotondata e con pochi vertici individuabili, è stato necessario posizionare anche dei semi-landmark su strutture non omologhe lungo i margini del corpo (Bookstein, 1997). Per minimizzare l'errore di misura dovuto alla proiezione della struttura tridimensionale del corpo sul piano dell'immagine, sono stati scelti loci complanari (Cardini, 2014). Sono state acquisite due immagini in due differenti giorni per ogni pronoto e addome appartenenti ad ogni singolo individuo. Sul pronoto sono stati posizionati un totale di 8 landmark e 24 semi-landmark, mentre relativamente all'addome ne sono stati digitalizzati rispettivamente 6 e 46 (Tab 2-3).

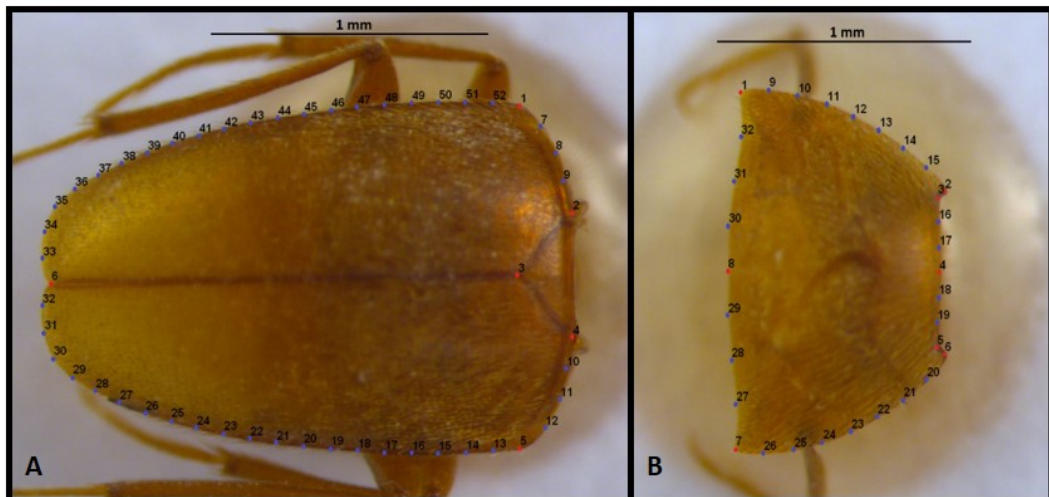


Fig. 8 - Disposizione di landmark (in rosso) e semi-landmark (in blu) relative all'addome (A) e pronoto (B) di un individuo di *Neobathyscia antrorum antrorum*.

Il posizionamento di landmark e semilandmark sulle immagini è stato effettuato tramite i programmi TPS-Util (ver. 1.78; Rohlf, 2015) e TPS-Dig2 (ver. 2.31; Rohlf 2015). Per prima cosa sono stati digitalizzati i landmark, posizionandoli su strutture anatomicamente omologhe tra le specie (Fig. 8). Successivamente sono state tracciate le curve esterne delle porzioni di esoscheletro oggetto di studio, generando così una serie di semi-landmark equidistanti l'uno dall'altro (Gunz & Mitteroecker, 2013). Per ogni immagine la digitalizzazione di landmark e semi-landmark è stata effettuata due volte in due sessioni di lavoro differenti, generando un totale di 468 differenti configurazioni sia per il pronoto che per l'addome. Successivamente, con l'apposito strumento "Append tps curves to landmarks" presente in TPS-Util, i semi-landmark sono stati aggiunti ai landmark e lo strumento "make sliders file" ha permesso di creare il relativo file di sliding-landmark. Infine, con il programma TpsRelW (ver. 1.53; Rohlf, 2015) è stato creato un file Nts in cui sono stati caricati

il file tps dei landmark e il file di sliding-landmark, utilizzando il metodo “min-bending-energy”. Dopo lo sliding, i semilandmark sono trattati alla stregua dei landmark.

La successiva analisi dei dati ottenuti è stata condotta con il programma MorphoJ (ver. 1.07a; Klingenberg, 2011).

CODICE	NOME	DEFINIZIONE	TIPOLOGIA
1	Vertice posteriore sinistro	Vertice posteriore del margine sinistro del pronoto	Landmark
2	Vertice anteriore sinistro	Vertice anteriore del margine sinistro del pronoto	Landmark
3	Angolo anteriore sinistro	Angolo sinistro del margine anteriore del pronoto	Landmark
4	Punto medio anteriore	Punto medio del margine anteriore del pronoto	Landmark
5	Angolo anteriore destro	Angolo destro del margine anteriore del pronoto	Landmark
6	Vertice anteriore destro	Vertice anteriore del margine destro del pronoto	Landmark
7	Vertice posteriore destro	Vertice posteriore del margine destro del pronoto	Landmark
8	Punto medio posteriore	Punto medio del margine posteriore del pronoto	Landmark
9-15	Punti equidistanti tra i landmark 1 e 2	Punti equidistanti lungo il margine sinistro del pronoto, compresi tra i landmark 1 e 2	Semi-landmark
16-17	Punti equidistanti tra i landmark 3 e 4	Punti equidistanti lungo la porzione sinistra del margine anteriore del pronoto, compresi tra i landmark 3 e 4	Semi-landmark
18-19	Punti equidistanti tra i landmark 4 e 5	Punti equidistanti lungo la porzione destra del margine anteriore del pronoto, compresi tra i landmark 4 e 5	Semi-landmark
20-26	Punti equidistanti tra i landmark 6 e 7	Punti equidistanti lungo il margine destro del pronoto, compresi tra i landmark 6 e 7	Semi-landmark
27-29	Punti equidistanti tra i landmark 7 e 8	Punti equidistanti lungo la porzione destra del margine posteriore del pronoto, compresi tra i landmark 7 e 8	Semi-landmark
30-32	Punti equidistanti tra i landmark 8 e 1	Punti equidistanti lungo la porzione destra del margine posteriore del pronoto, compresi tra i landmark 8 e 1	Semi-landmark

Tabella 2 - Tabella riassuntiva di codici, nomi, definizioni e tipologia dei landmark digitalizzati sul pronoto.

CODICE	NOME	DEFINIZIONE	TIPOLOGIA
1	Vertice anteriore sinistro	Vertice anteriore dell'elitra sinistra	Landmark
2	Punto anteriore sinistro	Vertice anteriore sinistro dello scutello	Landmark
3	Punto mediale posteriore	Vertice posteriore dello scutello	Landmark
4	Punto anteriore destro	Vertice anteriore destro dello scutello	Landmark
5	Vertice anteriore destro	Vertice anteriore dell'elitra destra	Landmark
6	Limite posteriore	Punto di congiunzione posteriore delle elitre	Landmark
7-9	Margine anteriore sinistro	Punti equidistanti del margine anteriore sinistro dell'addome, compresi tra i landmark 1 e 2	Semi-landmark
10-12	Margine anteriore destro	Punti equidistanti del margine anteriore destro dell'addome, compresi tra i landmark 1 e 2	Semi-landmark
13-32	Margine elitra destra	Punti equidistanti del margine dell'elitra destra, compresi tra i landmark 5 e 6	Semi-landmark
33-52	Margine elitra sinistra	Punti equidistanti del margine dell'elitra sinistra, compresi tra i landmark 6 e 1	Semi-landmark

Tabella 3 - Tabella riassuntiva di codici, nomi, definizioni e tipologia dei landmark digitalizzati sull'addome.



### 3.6 Elenco faunistico

Il genere *Neobathyscia* (Muller, 1917), endemico delle Prealpi orientali, è distribuito tra il fiume Adige e il Piave (Giachino & Vailati, 2005). Al suo interno si annoverano 9 specie e 2 sottospecie di coleotteri troglobi: *N. affinis* (Piva, 1984); *N. antrorum antrorum* (Doderò, 1900); *N. antrorum fenzi* (Rallo, 1971); *N. fabianii* (Doderò, 1904); *N. isabelae* (Piva, 1984); *N. leccei* (Piva, 1984); *N. lessinica* (Muller, 1935); *N. mancinii mancinii* (Jeannel, 1924); *N. mancinii ruffoi* (Piva, 2008); *N. pasai* (Ruffo, 1950); *N. roboretana* (Muller, 1931). Alcune di esse, come *N. affinis* e *N. lessinica*, sono note in un numero molto ristretto di grotte o in singole cavità, altre, come *N. fabianii*, presentano una distribuzione più ampia. Durante il periodo di campionamento sono stati raccolti 117 esemplari appartenenti a 7 specie e una sottospecie.

#### -*Neobathyscia affinis* (Fig. 9)

Località note:

Chiampo (VI) - Grotta del Vento n° 7



Fig. 9 - *N. affinis*.  
Barra di scala 1 mm.

#### -*Neobathyscia antrorum antrorum* (Fig. 10)

Località note:

Folgaria (TN) - Bus de la Nef de le Coe n°160

- Bus del Bilbom n°211

- Abisso di Malga Melegna n°626

Lavarone (TN) - Covelo di Rio Malo n°12

- Zahnloch n° 32

- Chelda Platt n°129

- Grotta presso Spiazzo Volpe n.c.

Valstagna (VI) - Grotta di Oliero n°600



Fig. 10 - *N. antrorum antrorum*. Barra di scala 1

#### -*Neobathyscia fabianii* (Fig. 11)

Località note:

Cornedo Vicentino (VI) - Grotta del Cameròn n°38

- Spurga dei Cracchi n°501

- Grotta La Spluga n.c.

- Grotta ai Cocchi n°2000

- Buso degli Scarbonassi n.c.

- Buso della Volpe del

Cancelletto Verde n.c.

- Grotta del Covoletto n°39

Isola Vicentina (VI) - Grotta Covolo di Torreselle n.c.

- Grotta Buso del Covolo n.c.

Monte di Malo (VI) - Buso della Rana n°40



Fig. 11 - *N. fabianii*.  
Barra di scala 1 mm.

- Grotta della Poscola n°136

Valdagno (VI) - Buso del Quaiello n°589  
- Buso della Meggiara n°515  
- Buso del Vaiolo n°516

-*Neobathyscia lessinica* (Fig. 12)

Località note:

Altissimo (VI) - Buso della Stria n°21  
Chiampo (VI) - Grotta dei Fontana n°4  
Valdagno (VI) - Buso delle Anguane n°518



Fig. 12 - *N. lessinica*.  
Barra di scala 1 mm.

-*Neobathyscia mancinii mancinii* (Fig. 13)

Località note:

Badia Calavena (VR) - Grotta Damati n°9  
- Grotta Contrada Volpi n°394  
Tregnago (VR) - Spigola di Poiana n°13  
Selva di Progno (VR) - Grotta del Berlicie n°3



Fig. 13 - *N. mancinii mancinii*.  
Barra di scala 1 mm.

-*Neobathyscia mancinii ruffoi* (Fig. 14)

Località note:

Sant'Anna d'Alfaedo (VR) - Grotta L. Bertola n°1120  
- Grotta Ponte di Veja n°117  
Roverè Veronese (VR) - Grotta Monte Capriolo n°1071  
- Buso del Gatto n°1421  
San Mauro di Saline (VR) - Spluga Carpenè n°396  
Bosco Chiesanuova (VR) - Grotta di Squaranto n°1079  
- Bus dei Masi n°393  
- Bus de Meo di Grobe n°160  
Grezzana (VR) - Bus della Donnola n°162  
Cerro Veronese (VR) - Grotta del Covile n°84  
- Spigola dei Busatti n°474



Fig. 14 - *N. mancinii ruffoi*.  
Barra di scala 1 mm.

-*Neobathyscia pasai* (Fig. 15)

Località note:

Velo Veronese (VR) - Covoli di Velo n°44  
- Covolo della Croce n°85  
Vestenanova (VR) - Grotta di Ca' Ceghi n°386



Fig. 15 - *N. pasai*.  
Barra di scala 1 mm.

-*Neobathyscia roboretana* (Fig. 16)

Località note:

Folgaria (TN) - Bus del Gobo Onzera n°207

- Lont del Lachè n°419

Rovereto (TN) - Grotta di Val Scodella n.c.

- Grotta ai Fortini n°2

- Grotta presso Cengio Rosso n.c.



Fig. 16 - *N. roboretana*.  
Barra di scala 1 mm.

### 3.7 Analisi dei dati

Una volta caricati i dataset in Morphoj, prima di avviare le analisi, si è provveduto a creare dei “Classifier” identificativi di ogni individuo. Successivamente si è proceduto a una “Procrustes superimposition”, la quale elimina le differenze di orientazione, posizionamento e dimensione delle 468 disposizioni di landmark e semi-landmark e permette di estrarre solamente le informazioni riguardanti la forma. Per prima cosa le dimensioni vengono scalate relativamente alla centroid size, intesa come la radice quadrata della somma dei quadrati delle distanze tra ogni landmark e il centroide della configurazione. Successivamente, le configurazioni vengono spostate e ruotate in modo tale da generare una sovrapposizione dei centroidi e minimizzare la somma dei quadrati delle distanze tra i landmark, eliminando così le informazioni relative a posizionamenti e orientazioni. Tramite questa operazione, le configurazioni dei punti precedentemente definiti in tutti i campioni vengono sovrapposte in un sistema di coordinate comuni (Adams et al., 2013).

Tutte le analisi effettuate su addome e pronoto sono state condotte separatamente tramite la creazione di due specifici dataset e tenendo conto della simmetria bilaterale che li caratterizza.

#### 3.7.1 Analisi della varianza

La prima analisi statistica effettuata sui due dataset è stata la Procrustes ANOVA, la quale permette di stimare la varianza a livello individuale e di specie, l'eventuale asimmetria del corpo e la variazione generata dalle quattro diverse disposizioni dei punti effettuate durante la precedente fase di studio (Klingenberg and McIntyre, 1998).

Questa è l'unica analisi condotta su dataset spuri, ovvero sui dataset che contenevano tutte le 468 diverse disposizioni di landmark. Le successive analisi sono state condotte su “averaged datasets”, generati dal consensus delle 4 diverse disposizioni per ogni porzione di corpo di ogni individuo; risultano, pertanto, composti da 117 disposizioni (una per individuo) per ciascuna parte.

#### 3.7.2 Analisi delle componenti principali (PCA)

Dopo aver generato la matrice di covarianza per i dataset è stata effettuata l'analisi delle componenti principali. La PCA è una tecnica utilizzata nell'ambito della statistica multivariata che permette di ridurre la dimensione dei dati in analisi e

permette di esaminare le variazioni tra campioni senza decidere la suddivisione in gruppi a priori. Questo procedimento genera un nuovo set di variabili indipendenti suddivise gerarchicamente in base a quanto esse riescano a mostrare le differenze tra gli individui studiati. Pertanto, la PC1 spiega la maggior parte della varianza tra i campioni e le successive hanno una capacità di descrizione delle differenze che cala progressivamente. Questa analisi permette di esplorare le forme relative delle diverse specie e come esse si dispongano all'interno del morfospazio generato dalle componenti principali considerate.

### **3.7.3 Analisi delle componenti canoniche (CVA)**

Successivamente alla PCA è stata condotta anche la CVA, la quale differisce dalla prima per l'algoritmo di generazione del nuovo set di variabili. Essa, infatti, si basa sulla conoscenza a priori dei gruppi presenti all'interno del dataset e tiene in considerazione la varianza presente entro di essi. Questa analisi consente di rappresentare i dataset con una diversa prospettiva rispetto a quella fornita dalla PCA, evidenziando le differenze tra gruppi noti.

### **3.7.4 Analisi dell'integrazione morfologica tra addome e pronoto**

Per esaminare il pattern di integrazione tra addome e pronoto è stata utilizzata la partial least square analysis (2B-PLS) (Rohlf & Corti, 2000), in cui le coordinate dei landmark delle due parti del corpo sono utilizzate come contrasti indipendenti e la loro integrazione è definita dalla covarianza dei due relativi set di variabili. I due dataset, contenenti le variabili, sono trattati simmetricamente per poter trovare relazioni tra essi senza assumere che la variazione di uno causi la variazione dell'altro (Rohlf & Corti, 2000). Questo metodo, tramite la combinazione lineare delle variabili all'interno dei dataset di pronoto e addome, crea nuove coppie di variabili utilizzabili per descrivere i pattern di covarianza esistenti tra i due dataset originali (Rohlf & Corti, 2000).

Per eseguire questa analisi è stato prima necessario creare un collegamento tra i due dataset tramite la funzione "link datasets" presente in Morphoj.

### **3.7.5 Analisi del dimorfismo sessuale**

Uno degli obiettivi di questo lavoro era quello di verificare se vi fossero differenze morfologiche rilevabili tra i sessi delle diverse specie campionate. A questo scopo è stata condotta la discriminant function analysis (DFA), la quale esamina la separazione tra i gruppi osservati noti a priori. Questo tipo di analisi si distingue dalla CVA per il fatto che i gruppi considerati nell'analisi stessa sono solamente due. Questo esame fornisce un output grafico che mostra i cambiamenti di forma relativi ai gruppi predefiniti, un grafico di "discriminant scores" e una cross validation che assegna l'affidabilità del test di discriminazione tra gruppi.

Per effettuare questa analisi è stato necessario suddividere i dataset di addome e pronoto, contenenti tutti i 117 individui, in base alla specie. Ciò è stato possibile utilizzando la funzione "subdivide dataset by" presente in Morphoj e impostando le diverse specie come classifier. Tramite questa procedura sono stati creati 16 dataset, due per ogni specie, e si è proceduto ad una procrustes superimposition per ognuno di essi. Infine, per ognuno dei dataset creati è stata effettuata una DFA.

## 4. Risultati

### 4.1 Analisi della varianza

Dai dati forniti dalla Procrustes Anova per le dimensioni corporee, osservando le somme dei quadrati (SS), si evince che le dimensioni dell'addome sono relativamente simili nelle diverse specie di *Neobathyscia* (Tab. 4), mentre risulta esserci un più marcato cambiamento della taglia del pronoto associato alle diverse specie (Tab. 5). Nel primo caso la varianza nella dimensione dell'addome tra le specie risulta essere circa il 53% della varianza totale, mentre il restante 47 % è variazione entro specie. Nel secondo caso, invece, la variazione interspecifica è pari a circa il 66% e solo il restante 34% è variazione intraspecifica. In entrambe le parti, la percentuale di variazione dovuta all'errore (posizionamento e digitalizzazione) è pari a circa lo 0.3% del totale.

Per quanto riguarda la forma, si nota che la maggior parte della varianza è dovuta a differenze interspecifiche; sia per il pronoto che per l'addome, l'ammontare delle differenze tra le specie risulta essere poco più di quattro volte quella entro specie (Tab. 6-7).

Inoltre, le analisi su entrambe le porzioni di corpo identificano una leggera asimmetria direzionale (side) e una più consistente asimmetria fluttuante (Ind\*Side).

Gli errori di misurazione sono stati classificati come residui (residual) e sono dovuti alle differenti immagini per ogni individuo e alle replicazioni delle digitalizzazioni in giorni distinti. L'analisi della Procrustes Anova per la forma dell'addome mostra un residuo pari a circa il 2% della variazione totale presente nel dataset, mentre per il pronoto esso si assesta al 6%.

<b>Centroid size:</b>					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Species	39,063876	5,580554	7	17,18	<.0001
Individual	35,405035	0,324817	109	509,23	<.0001
Residual	0,223888	0,000638	351		

Tabella 4 - Risultati della Procrustes Anova per le dimensioni dell'addome delle 468 configurazioni. Procrustes sums (SS), procrustes mean squares (MS), degree of freedom (df), Goodall's F statistic (F), p-value parametrico associato (P param).

<b>Centroid size:</b>					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Species	16,614346	2,373478	7	29,77	<.0001
Individual	8,609746	0,079720	108	319,89	<.0001
Residual	0,086725	0,000249	348		

Tabella 5 - Risultati della Procrustes Anova per le dimensioni del pronoto delle 468 configurazioni. Procrustes sums (SS), procrustes mean squares (MS), degree of freedom (df), Goodall's F statistic (F), p-value parametrico associato (P param).

<b>Shape, Procrustes Anova:</b>					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Species	0,41157835	0,0011759382	350	65,67	<.0001
Individual	0,09758689	0,0000179059	5450	2,03	<.0001
Side	0,00145192	0,0000290384	50	3,29	<.0001
Ind*Side	0,05118968	0,0000088258	5800	27,29	<.0001
Residual	0,01135312	0,0000003235	35100		

Tabella 6 - Risultati della Procrustes Anova per la forma dell'addome delle 468 disposizioni. Procrustes sums (SS), procrustes mean squares (MS), degree of freedom (df), Goodall's F statistic (F), p-value parametrico associato (P param).

<b>Shape, Procrustes Anova:</b>					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Species	0,32672325	0,0015558250	210	73,11	<.0001
Individual	0,07526682	0,0000212794	3240	5,07	<.0001
Side	0,00239857	0,0000754539	30	17,96	<.0001
Ind*Side	0,01611931	0,0000042004	3450	3,42	<.0001
Residual	0,02951053	0,0000012292	20880		

Tabella 7 - Risultati della Procrustes Anova per la forma del pronoto delle 468 disposizioni. Procrustes sums (SS), procrustes mean squares (MS), degree of freedom (df), Goodall's F statistic (F), p-value parametrico associato (P param).

#### 4.2 Analisi delle componenti principali (PCA)

Dopo aver prodotto la matrice di covarianza è stata effettuata un'analisi delle componenti principali, la quale ha fornito gli autovalori e i valori delle varianze delle componenti. Per entrambe le parti del corpo, le prime due componenti riescono a rappresentare adeguatamente le diverse morfologie delle specie nel morfospazio.

Relativamente alla forma dell'addome, la PC1 comprende poco più del 75% della varianza totale, mentre la PC2 ne include il 13%. Complessivamente, le prime due componenti rappresentano circa l'89% della variazione totale (Tab. 8).

Il grafico di dispersione riguardante l'addome, prodotto dalle prime due componenti principali, fornisce una spiegazione grafica delle relazioni che intercorrono tra di esse e il cambiamento della forma lungo i relativi assi (Fig. 17). La PC1 descrive soprattutto la differenza della lunghezza delle elitre, della larghezza della porzione anteriore delle medesime e l'espansione dello scutello. La PC2, invece, mostra i cambiamenti relativi alla larghezza della porzione medio-posteriore delle elitre e alla lunghezza della porzione anteriore dell'addome. Gli individui caratterizzati dai valori più elevati della componente principale 1 presentano un relativo allargamento della porzione anteriore dell'addome, una maggior espansione dello scutello e un relativo accorciamento della parte terminale delle elitre. Viceversa, gli

esemplari con valori inferiori di PC1 mostrano un restringimento della porzione addominale, una minor espansione dello scutello e un allungamento della parte terminale delle elitre.

Valori più elevati della PC2 identificano individui con un lieve allargamento della porzione medio-posteriore delle elitre e un arretramento della parte anteriore dell'addome. A valori negativi di tale componente, invece, sono associati un restringimento della porzione medio-posteriore e un avanzamento della zona addominale anteriore.

Da questo grafico si può notare come la morfologia addominale di *N. roboretana* e, in misura minore, *N. fabianii* appaiano distinte da tutte le altre specie analizzate per quanto riguarda la PC1. Inoltre, anche *N. lessinica* e *N. antrorum antrorum* sembrano mostrare una parziale differenziazione rispetto alle specie che occupano i valori medi della componente principale 1. La PC2, invece, non sembra evidenziare rilevanti differenze tra le diverse specie, le quali presentano valori simili per tale componente. L'unica specie che sembra apparire leggermente diversa lungo l'asse della PC2 è *N. antrorum antrorum*.

PC	Eigenvalues	Variance %	Cumulative %
1.	0,00082836	75,488	75,488
2.	0,00014664	13,363	88,851
3.	0,00005354	4,879	93,730
4.	0,00003449	3,143	96,873
5.	0,00001361	1,241	98,113
6.	0,00000619	0,564	98,677
7.	0,00000606	0,553	99,230
8.	0,00000241	0,219	99,449
9.	0,00000187	0,170	99,619
10.	0,00000111	0,101	99,720

Tabella 8 - Risultati della PCA dell'addome dei 117 individui (sono riportate solo le prime 10 componenti principali).

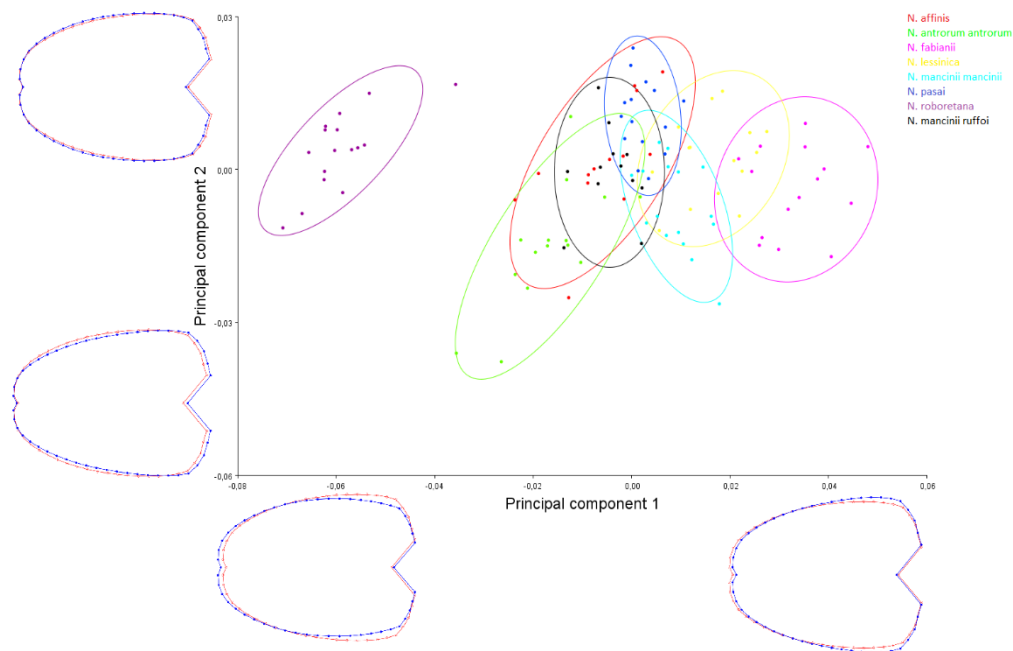


Fig. 17 – Distribuzione dei 117 individui degli 8 taxa sul piano delle prime due componenti principali (PC1 e PC2) per l'addome. Le ellissi raggruppano le diverse specie con un grado di confidenza del 90% e sono codificate in base al colore. Il wireframe visualizza i cambiamenti morfologici dell'addome lungo gli assi (linee blu) rispetto ai valori medi dell'asse stesso (linee rosse).

Per quanto riguarda la forma del pronoto, la PC1 descrive il 79% circa della variazione globale, mentre la PC2 ne spiega il 9%. La varianza cumulativa delle prime due componenti ammonta a circa l'88% della complessiva (Tab. 9).

Nel grafico di dispersione relativo al pronoto, la PC1 descrive soprattutto il cambiamento nella disposizione spaziale dei vertici posteriori, con la relativa modificazione dell'ampiezza del margine posteriore, e la variazione del margine anteriore (Fig. 18). La PC2, invece, mostra prevalentemente il cambiamento morfologico della parte centrale del margine posteriore. In minor misura, sono evidenziati anche le differenze nella decorrenza anteriore dei margini laterali e nella forma del margine anteriore.

Gli individui caratterizzati dai valori più elevati della PC1 presentano un relativo avanzamento e allargamento dei vertici posteriori e un arretramento del margine anteriore, mentre i campioni con bassi valori di PC1 manifestano un arretramento e restringimento di tali vertici e un avanzamento del margine anteriore.

Per quanto riguarda la PC2, i valori più elevati risultano associati ad un arretramento della porzione centrale del margine posteriore e ad un arrotondamento dello stesso, un appiattimento della porzione centrale del margine anteriore e una decorrenza più arcuata della parte anteriore dei margini laterali, fattori che forniscono un aspetto più convesso al pronoto stesso. Viceversa, i valori più bassi della PC2 corrispondono ad un avanzamento relativo della porzione centrale del margine posteriore, uno snellimento dei segmenti anteriori dei margini laterali e un lieve arrotondamento del margine anteriore.

Nel grafico di dispersione relativo al pronoto, la PC1 fornisce una discreta distinzione tra le specie, in cui *N. fabianii* e *N. roboretana* rappresentano i due estremi della disposizione nel morfospazio lungo l'asse di tale componente.



*N. roboretana*, in particolar modo, risulta essere la più differenziata dalle altre specie, anche se tale distinzione è meno marcata se essa si paragona con il grafico dell'addome, mentre *N. antrorum antrorum* si frappa ad essa e il resto delle specie.

La PC2, invece, sembra evidenziare una lieve differenza di forma di *N. fabianii* da tutte le altre specie.

PC	Eigenvalues	Variance %	Cumulative %
1.	0,00068273	79,373	79,373
2.	0,00007825	9,098	88,471
3.	0,00004996	5,808	94,279
4.	0,00001765	2,052	96,331
5.	0,00001017	1,182	97,513
6.	0,00000655	0,761	98,274
7.	0,00000432	0,503	98,777
8.	0,00000341	0,396	99,173
9.	0,00000322	0,374	99,547
10.	0,00000121	0,141	99,688

Tabella 9 - Risultati della PCA del pronoto dei 117 individui (sono riportate solo le prime 10 componenti principali).

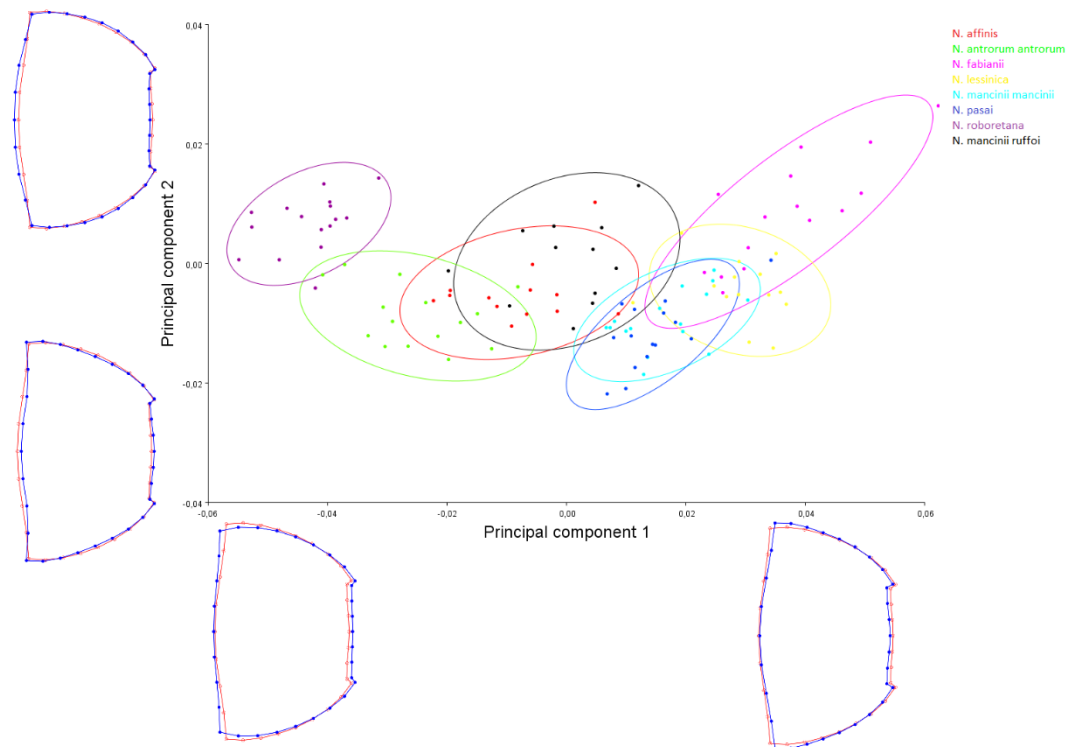


Fig. 18 - Distribuzione dei 117 individui degli 8 taxa sul piano delle prime due componenti principali (PC1 e PC2) per il pronoto. Le ellissi raggruppano le diverse specie con un grado di confidenza del 90% e sono codificate in base al colore. Il wireframe visualizza i cambiamenti morfologici del pronoto lungo gli assi (linee blu) rispetto ai valori medi dell'asse stesso (linee rosse).

### 4.3 Analisi delle componenti canoniche (CVA)

Parallelamente alla PCA è stata condotta la CVA, la quale restituisce un'ulteriore prospettiva sulla diversificazione interspecifica di addome e pronoto. Tale analisi fornisce gli autovalori e le varianze delle relative componenti e permette di osservare la distribuzione grafica degli individui lungo gli assi delle corrispondenti componenti canoniche.

La componente canonica 1 dell'addome include il 72% circa della varianza totale, mentre la seconda componente ne comprende il 16% circa. CV1 e CV2 combinate descrivono l'88% della varianza complessiva (Tab. 10). Nel grafico di dispersione relativo all'addome, prodotto dalle prime due componenti canoniche, la CV1 descrive la differenza della lunghezza delle elitre, della larghezza della porzione anteriore delle medesime e dell'espansione dello scutello (Fig. 19). Gli individui caratterizzati da bassi valori della CV1 presentano un relativo allargamento della porzione anteriore dell'addome, uno scutello leggermente più espanso e un relativo accorciamento della parte terminale dell'addome. Viceversa, gli esemplari con valori di CV1 più elevati mostrano un restringimento della porzione addominale anteriore, uno scutello più ristretto e un allungamento della parte terminale delle elitre.

La CV2 mostra i cambiamenti relativi alla larghezza della porzione mediana e posteriore del margine delle elitre e alla posizione dei vertici anteriori dello scutello. Bassi valori della CV2 corrispondono ad individui che presentano un lieve allargamento della porzione mediana del margine delle elitre, una sezione terminale delle elitre meno pronunciata e una maggior ampiezza dello scutello. Valori più elevati di CV2 sono associati a un restringimento del margine mediano delle elitre, alla ridotta ampiezza dello scutello ed a una sezione posteriore delle elitre più pronunciata.

I grafici delle componenti principali e canoniche per l'addome forniscono una separazione simile delle specie lungo l'asse della prima componente, mentre la CV2 permette una più marcata differenziazione di *N. fabianii* e *N. antrorum antrorum* rispetto alla PC2.

CV	Eigenvalues	Variance %	Cumulative %
1.	82,41297084	72,147	72,147
2.	18,11614924	15,859	88,006
3.	6,36376360	5,571	93,577
4.	2,77902339	2,433	96,010
5.	2,03429973	1,781	97,791
6.	1,40902767	1,234	99,024
7.	1,11468607	0,976	100,000

Tabella 10 - Risultati della CVA dell'addome per i 117 individui.

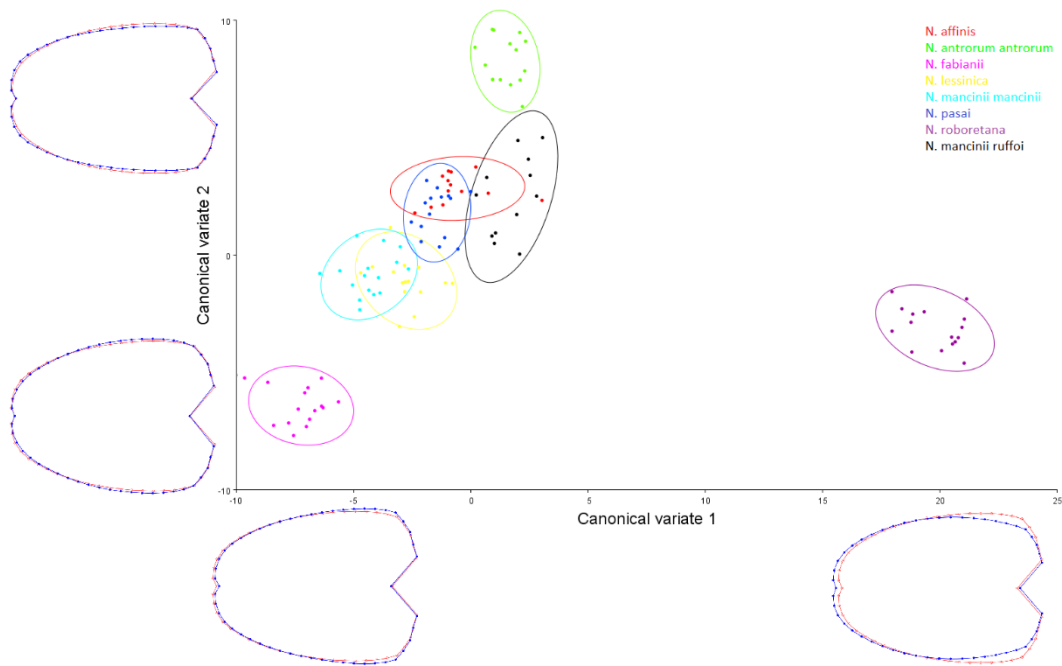


Fig. 19 - Distribuzione dei 117 individui degli 8 taxa sul piano delle prime due componenti canoniche (CV1 e CV2) per l'addome. Le ellissi raggruppano le diverse specie con un grado di confidenza del 90% e sono codificate in base al colore. Il wireframe visualizza i cambiamenti morfologici dell'addome lungo gli assi (linee blu) rispetto ai valori medi dell'asse stesso (linee rosse).

La componente canonica 1 del pronoto include il 55% circa della varianza totale, la seconda componente il 17% circa, mentre la terza il 12%. Le tre componenti combinate descrivono l'84% della varianza complessiva (Tab. 11).

Gli individui caratterizzati dai valori più elevati della componente canonica 1 presentano un relativo avanzamento e allargamento dei vertici posteriori e un arretramento del margine anteriore, mentre gli esemplari con bassi valori di PC1 manifestano un arretramento e restringimento di tali vertici e un avanzamento del margine anteriore (Fig. 20).

La CV2 mostra leggeri cambiamenti relativi al margine posteriore; i valori più bassi sono associati a un margine posteriore più convesso, mentre i valori più alti identificano un margine posteriore meno pronunciato.

La CV3, infine, identifica le differenze associate ai margini laterali del pronoto; gli individui con i valori più elevati di tale componente presentano i margini laterali leggermente più stretti rispetto agli individui con valori più bassi (Fig. 21).

PC1 e CV1 restituiscono una separazione equiparabile tra le specie lungo i rispettivi assi, mentre la CV2 permette di differenziare meglio alcune specie rispetto alla PC2. Lungo quest'asse le specie che risultano maggiormente differenziate sono *N. pasai*, *N. mancinii mancinii* e *N. mancinii ruffoi*, mentre le altre specie presentano valori attorno alle media. Infine, lungo la componente canonica 3 è possibile osservare la separazione di *N. antrorum antrorum* e *N. affinis* dalle altre specie, le quali sono caratterizzate da valori molto simili della componente stessa.

CV	Eigenvalues	Variance %	Cumulative %
1.	30,29191368	55,023	55,023
2.	9,46978064	17,201	72,224
3.	6,75247420	12,265	84,490
4.	4,27958664	7,774	92,263
5.	2,11846448	3,848	96,111
6.	1,26271337	2,294	98,405
7.	0,87812161	1,595	100,000

Tabella 11 - Risultati della CVA del pronoto per i 117 individui.

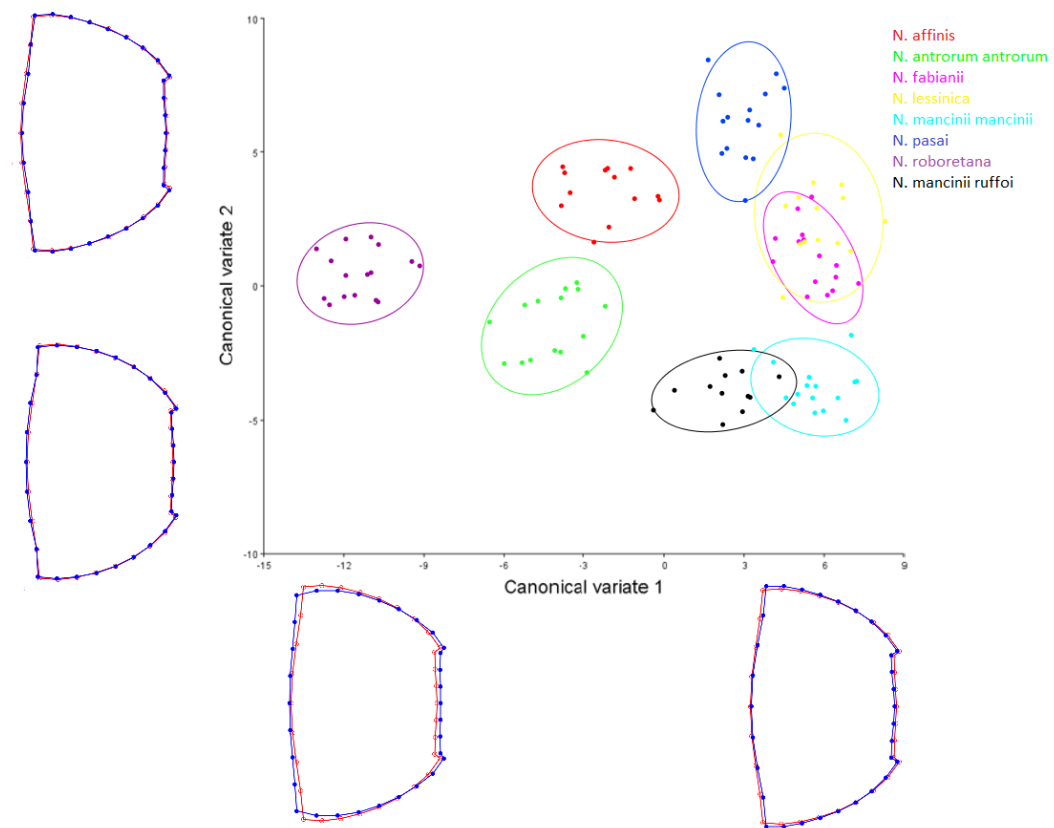


Fig. 20 - Distribuzione dei 117 individui degli 8 taxa sul piano delle prime due componenti canoniche (CV1 e CV2) per il pronoto. Le ellissi raggruppano le diverse specie con un grado di confidenza del 90% e sono codificate in base al colore. Il wireframe visualizza i cambiamenti morfologici del pronoto lungo gli assi (linee blu) rispetto ai valori medi dell'asse stesso (linee rosse).

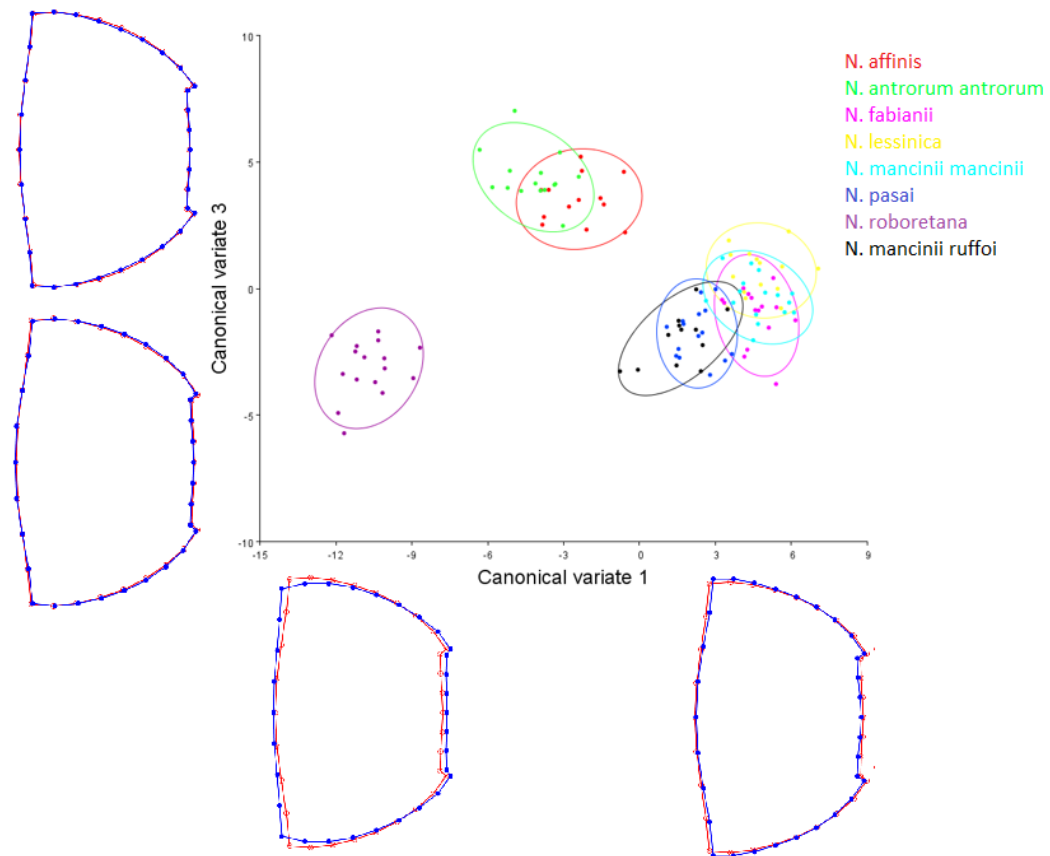


Fig. 21 - Distribuzione dei 117 individui degli 8 taxa sul piano delle prime due componenti canoniche (CV1 e CV3) per il pronoto. Le ellissi raggruppano le diverse specie con un grado di confidenza del 90% e sono codificate in base al colore. Il wireframe visualizza i cambiamenti morfologici del pronoto lungo gli assi (linee blu) rispetto ai valori medi dell'asse stesso (linee rosse).

Oltre ai grafici di dispersione generati, la CVA ha fornito le differenze relative ad addome e pronoto tra le specie, attraverso il calcolo di due tipologie di distanze: la distanza di Mahalanobis e la distanza di Procrustes. Entrambe le distanze mostrano un p-value associato, il quale è considerato significativo per valore inferiori al 5%. Tutti i p-value risultano significativi, sia per l'addome (Tab. 12-13) che per il pronoto (Tab. 14-15).

	NAFF	NANT	NFAB	NLES	NMAN	NPAS	NROB
NANT	<.0001						
NFAB	<.0001	<.0001					
NLES	<.0001	<.0001	<.0001				
NMAN	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001			
NPAS	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
NROB	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
NRUF	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Tabella 12 - P-values derivati dal test di permutazione (10000 round) per le distanze di Mahalanobis tra i gruppi relativi all'addome.

	NAFF	NANT	NFAB	NLES	NMAN	NPAS	NROB
NANT	<.0001						
NFAB	<.0001	<.0001					
NLES	<.0001	<.0001	<.0001				
NMAN	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001			
NPAS	0.0015	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
NROB	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
NRUF	0,0017	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	<.0001

Tabella 13 - P-values derivati dal test di permutazione (10000 round) per le distanze di Procrustes tra i gruppi relativi all'addome.

	NAFF	NANT	NFAB	NLES	NMAN	NPAS	NROB
NANT	<.0001						
NFAB	<.0001	<.0001					
NLES	<.0001	<.0001	<.0001				
NMAN	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001			
NPAS	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
NROB	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
NRUF	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Tabella 14 - P-values derivati dal test di permutazione (10000 round) per le distanze di Mahalanobis tra i gruppi relativi al pronoto.

	NAFF	NANT	NFAB	NLES	NMAN	NPAS	NROB
NANT	<.0001						
NFAB	<.0001	<.0001					
NLES	<.0001	<.0001	0.0005				
NMAN	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001			
NPAS	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
NROB	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
NRUF	0.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Tabella 15 - P-values derivati dal test di permutazione (10000 round) per le distanze di Procrustes tra i gruppi relativi al pronoto.

#### 4.4 Analisi dell'integrazione morfologica tra addome e pronoto

Per esaminare il pattern di integrazione tra addome e pronoto è stata utilizzata la 2B-PLS analisi (Rohlf & Corti, 2000), la quale descrive l'integrazione delle due parti del corpo tramite la loro relativa covarianza.

La prima coppia di variabili generate descrive il 99% della covarianza totale, il p-value associato risulta altamente significativo e il relativo coefficiente di correlazione, che descrive il grado di associazione tra le due variabili considerate, è pari a 0,9 (Tab. 16). Per quantificare la forza dell'associazione complessiva tra addome e pronoto è stato, inoltre, calcolato il coefficiente RV (Escoufier 1973; Klingenberg, 2009), il quale risulta essere pari a 0.79. Tale coefficiente può essere inteso come una generalizzazione in ambito multivariato del coefficiente di correlazione e può variare tra 0 (completa indipendenza) e 1 (completa interdipendenza) (Klingenberg & Marugàn-Lobòn, 2013). Inoltre, per testare la

covarianza tra le due parti del corpo, è stato eseguito un test di permutazione (Good, 2000) contro l'ipotesi nulla di totale indipendenza (10000 round) che ha fornito un p-value altamente significativo (<.0001).

Infine, l'analisi ha fornito un grafico che rappresenta le relazioni di covarianza per la prima coppia di variabili generate (Fig. 22); sebbene correlazioni tra altre variabili siano presenti e significative, esse non sono state considerate in quanto le relative variabili spiegano in minima parte la covarianza tra i due dataset.

	Singular value	P-value (perm.)	% covar. totale	Correlation	P-value (perm.)
PLS1	0,00067570	<.0001	99,375	0,90051	<.0001
PLS2	0,00004425	0.0158	0,426	0,54150	<.0001
PLS3	0,00002741	<.0001	0,164	0,46704	<.0001
PLS4	0,00001198	0.0006	0,031	0,45165	<.0001
PLS5	0,00000301	0.6432	0,002	0,31484	0.0019

Tabella 16 - Risultati dei test di permutazione per la correlazione pronoto-addome dei rispettivi datasets. Sono riportati solo risultati per le prime cinque coppie di variabili; i p-values sono derivati da test di permutazione (10000 round).

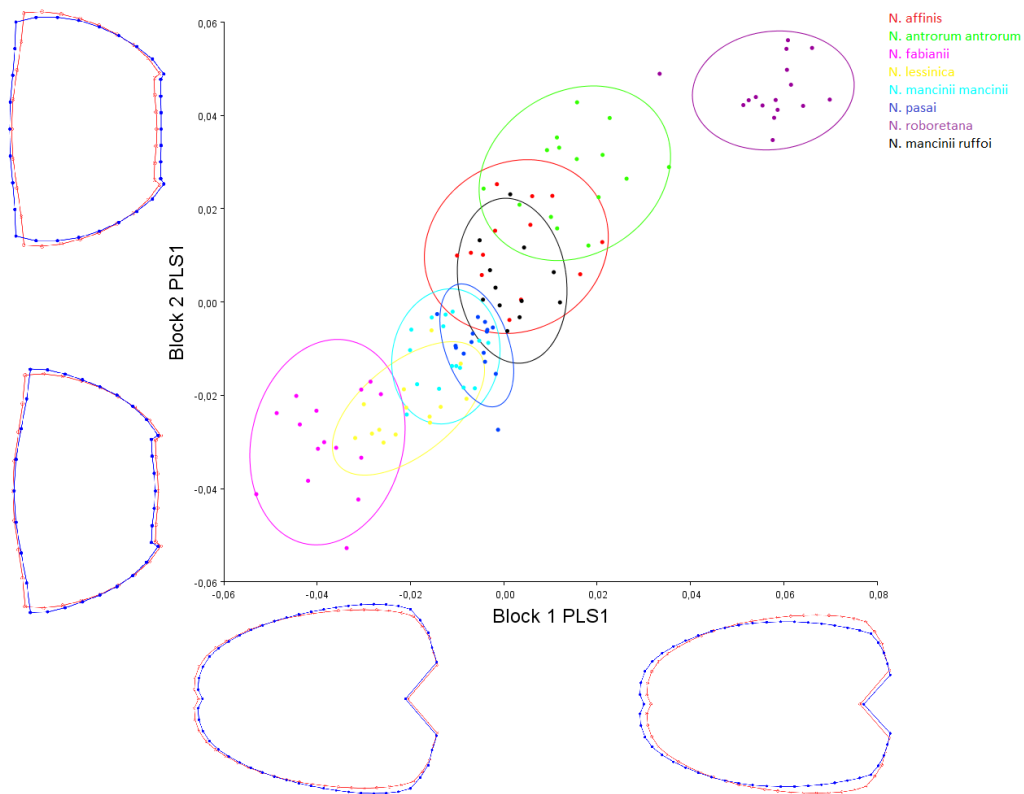


Fig. 22 - Grafico della prima coppia di variabili ottenuto dalla 2B-PLS analisi per la covarianza tra pronoto e addome. La correlazione è pari a 0.9. Il wireframe visualizza i cambiamenti morfologici di pronoto e addome lungo i rispettivi assi (linee blu) rispetto ai valori medi degli assi stessi (linee rosse).

#### 4.5 Analisi del dimorfismo sessuale

L'ultima analisi morfometrica condotta è stata la DFA, strumento che permette di esaminare la separazione tra gruppi noti a priori. Lo scopo di questo esame era quello di individuare l'eventuale presenza di differenze morfologiche tra i sessi delle diverse specie.

Inoltre, è stato effettuato un test di permutazione associato, riferito alla Procrustes distance, che prevede come nulla ipotesi la stessa media per entrambi i gruppi (in questo caso i sessi). I risultati di questa analisi non mostrano risultati significativi per 5 delle specie esaminate, mentre una possibile differenza morfologica della porzione addominale tra i sessi potrebbe essere presente in *N. antrorum antrorum*, *N. mancinii mancinii* e *N. pasai* (Tab. 17).

SPECIE	SESSO		P-VALUE	
	FEMMINE	MASCHI	ADDOME	PRONOTO
<i>N. affinis</i>	6	7	0.66	0.26
<i>N. antrorum antrorum</i>	6	9	<b>0.006</b>	0.2
<i>N. fabianii</i>	12	3	0.77	0.38
<i>N. lessinica</i>	8	7	0.56	0.84
<i>N. mancinii mancinii</i>	10	6	<b>0.002</b>	0.24
<i>N. mancinii ruffoi</i>	4	8	0.6	0.61
<i>N. pasai</i>	8	7	<b>0.02</b>	0.3
<i>N. roboretana</i>	11	5	0.66	0.26

Tabella 17 - Elenco del numero di individui appartenenti ai due sessi delle diverse specie sottoposte alla DFA e relativi p-value delle due parti del corpo analizzate.

Per quanto riguarda *N. antrorum antrorum*, l'output grafico relativo alle forme (Fig. 23) mostra una differenza tra i due sessi, sostenuta da un p-value altamente significativo ( $p\text{-value} = 0.006$ ). Le femmine presentano mediamente i margini laterali delle elitre allargati, un accorciamento della porzione anteriore dell'addome e della porzione terminale delle elitre. Anche il grafico relativo ai punteggi delle discriminanti mostra una netta separazione tra i due sessi (Fig. 24), mentre la cross validation, strumento che permette di stabilire il grado di attendibilità nella separazione tra i sessi operata dalla DFA, identifica una buona affidabilità (Tab. 18)

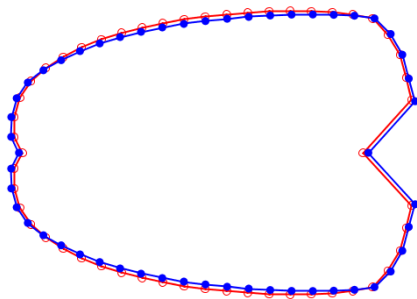


Fig 23 - Grafico delle forme dell'addome di *N. antrorum antrorum* associate ai due sessi. Le linee rosse identificano la forma media delle femmine, le linee blu quella dei maschi.

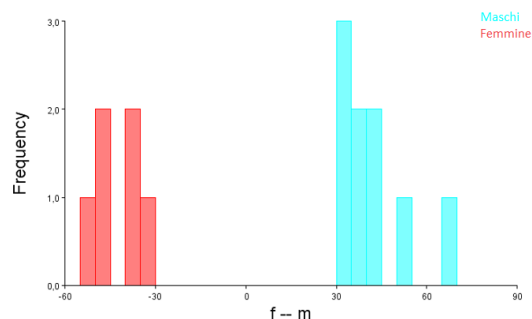


Fig 24 - Grafico di discriminant scores relativo ai sessi di *N. antrorum antrorum* generato dalla DFA.



	Allocated to		Totale
	Femmine	Maschi	
Femmine	5	1	6
Maschi	1	8	9

Tabella 18 - Risultati della cross validation relativo ai sessi di *N. antrorum antrorum*.

Anche per *N. mancinii mancinii* l'output grafico relativo alle forme mostra una differenza tra i due sessi, sostenuta da un p-value altamente significativo (p-value = 0.002).

In questo caso, però, i margini medio-posteriori delle elitre appaiono, in media, più larghi nei maschi, i quali presentano anche una porzione anteriore dell'addome più corta e uno scutello più ampio (Fig. 25). Il grafico relativo ai punteggi delle discriminanti mostra una netta separazione tra i due sessi (Fig. 26), mentre la cross validation, se rapportata al caso di *N. antrorum antrorum*, mostra un minor grado di affidabilità nella separazione operata (Tab. 19).

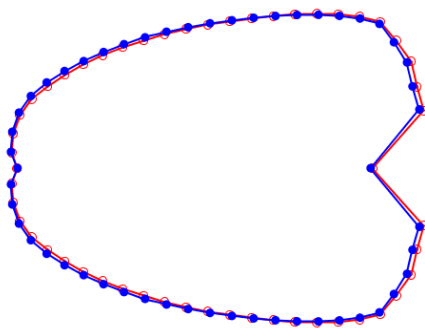


Fig 25 - Grafico delle forme dell'addome di *N. mancinii mancinii* associate ai due sessi. Le linee rosse identificano la forma media delle femmine, le linee blu quella dei maschi.

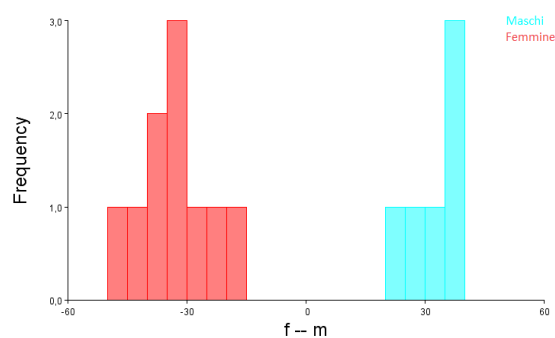


Fig 26 - Grafico di discriminant scores relativo ai sessi di *N. mancinii mancinii* generato dalla DFA.

	Allocated to		Totale
	Femmine	Maschi	
Femmine	8	2	10
Maschi	2	4	6

Tabella 19 - Risultati della cross validation relativo ai sessi di *N. mancinii mancinii*.

Infine, l'ultima differenza tra sessi rilevata dalla DFA è quella relativa a *N. pasai*. In questo caso le femmine appaiono, in media, leggermente più larghe nella porzione mediana del margine delle elitre e presentano un lieve accorciamento della parte anteriore dell'addome (Fig. 27). Il p-value associato risulta significativo (p-value = 0.02). Il grafico relativo al punteggio delle discriminanti presenta una buona separazione tra i sessi (Fig. 28) e la cross validation assegna un buon grado di affidabilità alla separazione operata dalla DFA (Tab. 20).

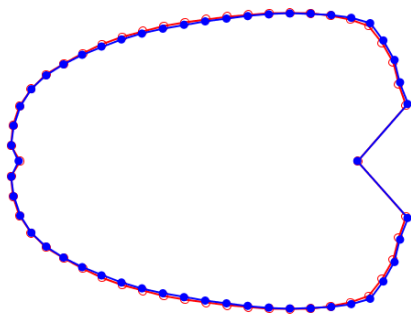


Fig 27 - Grafico delle forme dell'addome di *N. pasai* associate ai due sessi. Le linee rosse identificano la forma media delle femmine, le linee blu quella dei maschi.

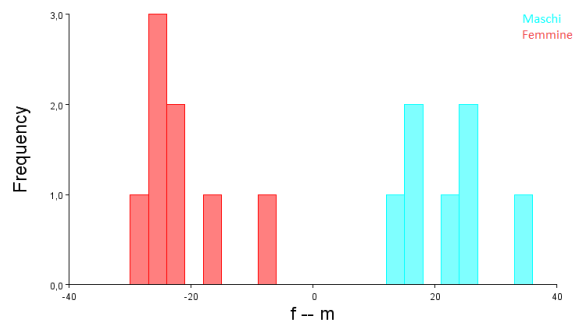


Fig 28 - Grafico di discriminant scores relativo ai sessi di *N. pasai* generato dalla DFA.

	Allocated to		Totale
	Femmine	Maschi	
Femmine	6	2	8
Maschi	1	6	7

Tabella 20 - Risultati della cross validation relativo ai sessi di *N. pasai*.

Sebbene la DFA per queste tre specie mostri una buona separazione tra i sessi, il risultato di questa analisi è da considerarsi preliminare, in quanto i p-value associati a tali separazioni risultano altamente significativi per *N. antrorum antrorum* e *N. mancinii mancinii*, mentre le rispettive cross validation non appaiono sostenere l'elevata significatività degli stessi.

Questo, probabilmente, è dovuto al fatto che vi è un alto numero di variabili considerate (landmark) rispetto al numero di individui presenti nelle diverse analisi di condotte. In queste condizioni, la DFA tende a sovrastimare la separazione tra i gruppi, pertanto, anche se sembrano evidenziarsi differenze tra i sessi per queste specie, per poter assegnare una maggior significatività a questa analisi sarebbe necessario aumentare il numero degli individui considerati.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai risultati delle analisi morfometriche eseguite sui 117 individui raccolti, è possibile evidenziare differenze rilevanti nella morfologia delle diverse specie per entrambe le porzioni di corpo studiate. Inoltre, risulta particolarmente interessante il fatto che le variazioni morfologiche evidenziate dalla prima componente principale, per le due parti del corpo esaminate (Fig. 17-18), corrispondano a quelle associate alle prime componenti canoniche (Fig. 19-20). La percentuale della varianza totale che esse descrivono è molto elevata (Tab. 8-9-10-11) e le relazioni morfologiche delle specie per le due parti del corpo studiate, lungo i rispettivi assi, sono conservate in entrambe le analisi. Questo dato è presente anche nei risultati dell'analisi dell'integrazione di addome e pronoto (Fig. 22). I cambiamenti della forma di addome e pronoto associati agli assi delle prime componenti principali corrispondono a quelli descritti dagli assi della 2B-PLS. Dato che gli assi generati dalla 2B-PLS derivano solo da informazioni riguardanti la covarianza tra le due parti corporee, mentre le componenti principali sono ottenute sulla base dei tratti che presentano la maggior variazione nei rispettivi dataset, la chiara corrispondenza tra di essi è un'evidenza dell'integrazione delle due strutture (Klingenberg & Zaklan, 2000). Considerando la morfologia del corpo nella sua interezza, queste modificazioni si traducono in un cambiamento di forma che varia da una tipologia "bathiscioide", a cui sono ascrivibili *N. affinis*, *N. antrorum antrorum*, *N. lessinica*, *N. fabianii*, *N. mancinii mancinii*, *N. mancinii ruffoi*, *N. pasai*, a una pseudo-pholeunoide, relativa a *N. roboretana*.

Per quanto riguarda, invece, l'analisi delle differenze morfologiche tra i sessi entro le specie, solo in *N. antrorum antrorum*, *N. mancinii mancinii* e *N. pasai* si evidenzia dimorfismo sessuale. Tuttavia, questa analisi è stata condotta su un numero limitato di individui e i risultati ottenuti sono da considerarsi preliminari. Per poter confermare la presenza o l'assenza di tali differenze sarebbe necessario ripetere l'analisi su un numero considerevolmente più ampio di individui.

Sebbene tutte le specie presenti in questo studio siano considerate troglobie, dalle analisi effettuate risulta evidente come *N. roboretana* presenti una morfologia corporea differente dal resto delle specie, poiché presenta addome e pronoto più stretti e allungati rispetto alle altre specie. Una possibile spiegazione di queste caratteristiche potrebbe essere fornita dalla storia evolutiva del genere *Neobathyscia* e dalle vicissitudini paleogeografiche che hanno interessato l'area in cui sono distribuite le specie esaminate.

Alcuni esemplari delle specie raccolte durante i campionamenti sono stati affidati al laboratorio di genetica del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università degli Studi di Verona (Prof. Massimo Delledonne), che ha provveduto al sequenziamento di tre geni, 12S rRNA, 16S rRNA e COI. Successivamente, la Professoressa Allegrucci del Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma Tor Vergata ha utilizzato questi tre geni per elaborare un dendrogramma che ricostruisce le relazioni filogenetiche dei geni sequenziati. Dato che non sono disponibili reperti fossili o eventi geologici cronologicamente noti relativi all'area di studio per calibrare l'orologio molecolare, per stimare le date degli eventi cladogenetici che hanno coinvolto le popolazioni ancestrali dei taxa analizzati è stato utilizzato un tasso di sostituzione noto in letteratura per i Coleotteri Leptodirini (Latella et al., 2018). Sebbene questa analisi molecolare sia preliminare e parziale, dato che non è stato possibile comprendere in questo esame tutte le specie analizzate con la

morfometria, essa fornisce interessanti indizi sulle relazioni filogenetiche delle stesse. Dal dendrogramma prodotto, si nota che la separazione del ramo riferito a *N. roboretana* è temporalmente antecedente agli eventi cladogenetici che coinvolgono le restanti specie di *Neobathyscia* considerate nell'analisi molecolare (Fig. 29). In particolare, la separazione della popolazione ancestrale di *N. roboretana* dagli antenati delle altre specie, considerando i geni sequenziati, risulta essere avvenuta nel Miocene, mentre i processi di speciazione più recenti osservabili nell'albero filogenetico risultano essere riferiti all'epoca Plio-Pleistocenica. Nel Miocene, la zona geografica in cui si colloca l'areale di *Neobathyscia* è stata interessata sia dalla crisi di salinità del Messiniano (circa 5 milioni di anni fa), sia dall'evoluzione neotettonica dei rilievi alpini (Sauro, 1982). Questi eventi hanno influenzato notevolmente il clima e la geografia dell'area e potrebbero aver provocato l'istaurarsi di una barriera che ha portato all'interruzione del flusso genico tra le popolazioni antenate di *N. roboretana* e quelle delle altre specie che oggi sono presenti sui Monti Lessini (Fig. 5).

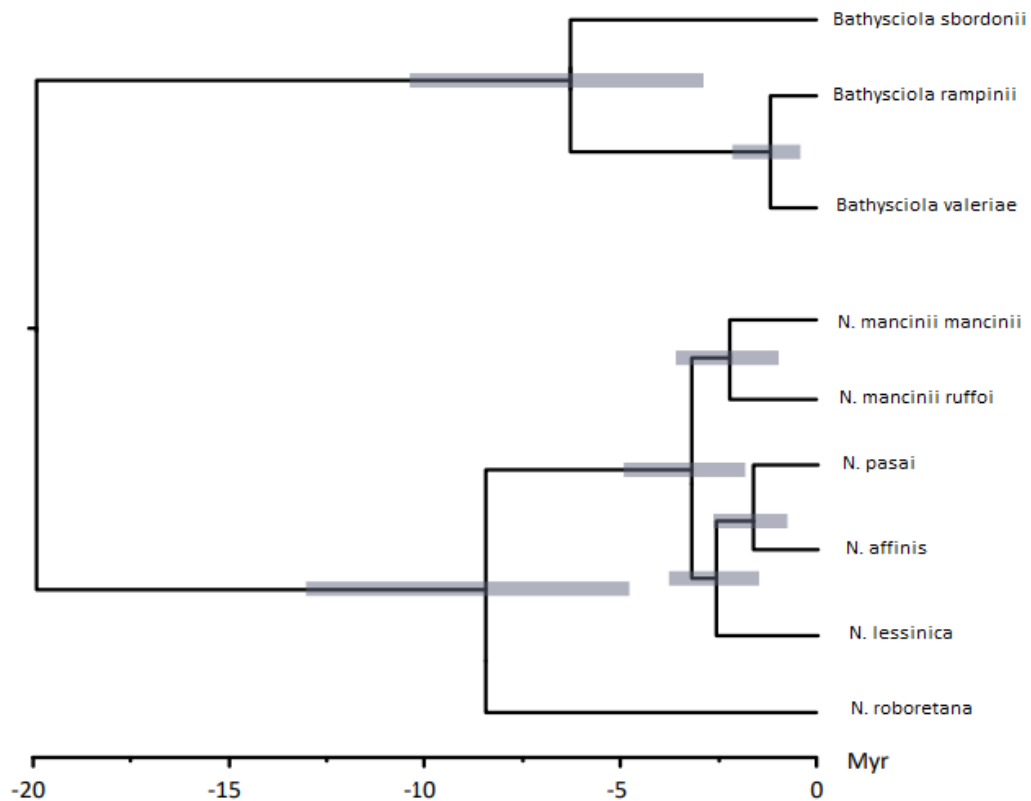


Fig. 29 – Dendrogramma dei tempi di divergenza delle specie di *Neobathyscia* basato sulle analisi filogenetiche per i geni 12S, 16S e COI.

Gli eventi cladogenetici Plio-Pleistocenici sono, invece, riconducibili ai periodi glaciali e interglaciali che, a più riprese, hanno interessato parte delle Prealpi Vicentine.

Sovrapponendo l'attuale distribuzione delle specie di *Neobathyscia* analizzate con la ricostruzione paleogeografica dell'estensione dei ghiacci relativa all'ultimo massimo glaciale, si nota che i progenitori delle specie di *Neobathyscia*, oggi presenti sui Monti Lessini, probabilmente occupavano aree non interamente ricoperte da ghiacciai, mentre gli antenati di *N. roboretana* e, in parte, *N. antrorum antrorum* fossero presenti in zone glaciali o periglaciali (Fig. 30). Sebbene questa rappresentazione sia approssimativa, in quanto l'area considerata è stata interessata da più cicli glaciali-interglaciali durante il Pliocene e il Pleistocene, essa può fornire indizi riguardanti le tempistiche di colonizzazione del sottosuolo.

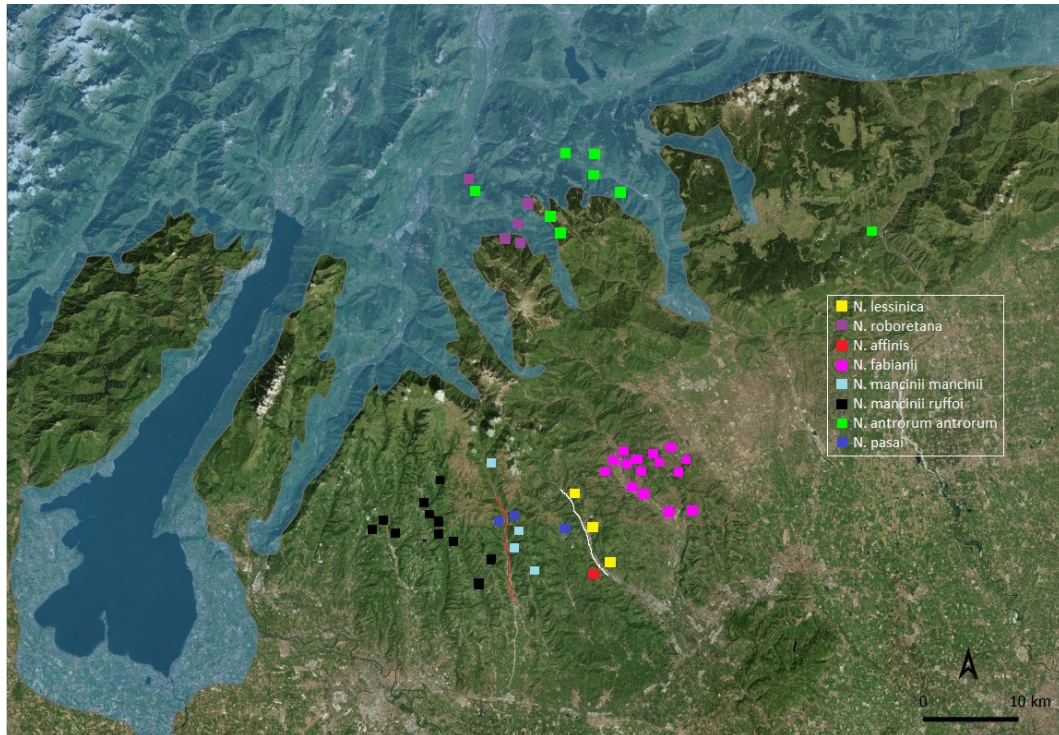


Fig. 30 – Rappresentazione semplificata della massima espansione glaciale wurmiana (Tratta da Penck & Bruckner 1909). In rosso è evidenziata la Val d'Illassi, in bianco la Valle del Chiampo.

Data la localizzazione geografica dei diversi taxa, si può ipotizzare che i progenitori di *N. roboretana*, più a Nord, abbiano colonizzato prima, da un punto di vista cronologico, gli ambienti cavernicoli, in quanto l'area in cui erano presenti era ampiamente glacializzata e quindi inospitale per animali legati al suolo. Le popolazioni più a Sud, al contempo, probabilmente si trovavano in un contesto ambientale differente e solo successivamente, con la discesa delle lingue glaciali lungo le valli presenti sui Monti Lessini (Mattana, 1974), è avvenuta la frammentazione del loro areale. Recenti studi geologici dell'area, infatti, hanno permesso di individuare la presenza di depositi glaciali nella Valle del Chiampo (Sommaruga & Zorzin, 2020). Risulta, quindi, possibile ipotizzare che vi fossero delle lingue glaciali, durante i periodi di espansione dei ghiacci, che scendessero lungo le valli e abbiano prodotto delle barriere geografiche che hanno interrotto il flusso genico tra le popolazioni. Osservando la figura 30, infatti, si nota una netta separazione tra *N. mancinii mancinii* e *N. mancinii ruffoi*, riferibile alla Val d'Illassi

(linea rossa), e una tra *N. pasai*, *N. lessinica* e *N. affinis* individuabile nella Valle del Chiampo (linea bianca).

I progenitori degli organismi terrestri troglobi erano animali endogei che vivevano in ambiente di lettiera umida delle foreste di latifoglie e nel suolo e presentavano preadattamenti morfologici e fisiologici per l'ambiente sotterraneo (Holsinger, 2000; Giachino & Vailati 2005; Latella et al., 2012). Secondo il modello di relitto climatico (Holsinger 1988; Ashmole, 1993), l'istaurarsi di barriere geografiche e il concomitante cambiamento climatico e della vegetazione, spinsero alcune popolazioni a ritirarsi progressivamente nelle grotte umide, mentre altre si estinsero. Successivamente, il prolungato isolamento geografico e il mancato flusso genico tra le popolazioni epigee e ipogee contribuirono ai processi di speciazione e di sviluppo di caratteristiche troglomorfe (Holsinger 2000; Latella et al., 2012). In un contesto di questo tipo, considerando l'attuale distribuzione delle specie nell'area e i dati filogenetici e morfometrici raccolti, è verosimile ipotizzare una separazione dei progenitori di *N. roboretana* che precede gli eventi cladogenetici che hanno coinvolto le attuali specie presenti sui Monti Lessini, probabilmente in epoca miocenica. Successivamente, queste popolazioni, più a Nord rispetto alle altre, durante i periodi glaciali del Plio-Pleistocene, in cui l'ambiente era ricoperto di ghiaccio e le condizioni di vita erano avverse, verosimilmente si rifugiarono in grotta, ove vi erano condizioni ambientali a loro più favorevoli, e rimasero isolate dalle popolazioni più a Sud. Queste ultime, antenate delle specie che oggi sono presenti nei Monti Lessini, probabilmente si trovavano in un contesto climatico-ambientale differente, che permetteva loro di vivere in superficie. Solo successivamente, la frammentazione dell'areale e le condizioni divenute avverse probabilmente spinsero le popolazioni a occupare gli ambienti cavernicoli in cui riuscirono a sopravvivere. L'alternanza di questi cicli nel Pleistocene e la geologia dell'area caratterizzata da un carsismo diffuso, hanno poi contribuito al riarrangiamento della distribuzione delle specie che è arrivato ad oggi.

Sebbene questi fenomeni siano difficilmente schematizzabili, data la complessità degli eventi glaciali e la loro durata, è ipotizzabile che l'occupazione degli ambienti cavernicoli e le fasi di differenziazione siano cronologicamente distinte per *N. roboretana* rispetto alle altre specie. Probabilmente, i progenitori di *N. roboretana* hanno colonizzato prima gli ambienti sotterranei, e hanno subito un processo di adattamento alla vita in ambienti sotterranei più prolungato. Ciò trova riscontro in una morfologia corporea pseudo-pholeunoide, differente rispetto alle specie presenti sui Monti Lessini, le quali sono caratterizzate da una forma bathiscioide.



## 7. BIBLIOGRAFIA

ACCORDI F., SBORDONI V. (1978) - The fine structure of Hamann's Organ in *Leptodirus hohlenwartyi*, a highly specialized cave Bathysciinae (Coleoptera, Catopidae). *International Journal of Speleology*, 9(2): 153-165.

ADAMS D.C., ROHLF F.J., SLICE D.E. (2013) - A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix* 24, 7-14.

ANTUNES-CARVALHO C., RIBERA I., BEUTEL R. G., GNASPINI P. (2019) - Morphology-based phylogenetic reconstruction of Cholevinae (Coleoptera: Leiodidae): A new view on higher-level relationships. *Cladistics*, 35, 1-41.

ASHMOLE NP. (1993) - Colonization of the underground environment in volcanic islands. *Mémoires de Biospéologie*, 20, 1-11.

BOOKSTEIN F.L. (1997) - Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Med. Image Anal.* 1 (3), 225-243.

CARDINI A. (2014) - Missing the third dimension in geometric morphometrics: how to assess if 2D images really are a good proxy for 3D structures? *Hystrix* 25, 63-72.

ESCOUFIER Y. (1973) - Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics* 29:751-760.

GIACHINO P. M., VAILATI D. (2005) - I Cholevidae delle Alpi e Prealpi italiane: inventario, analisi faunistica e origine del popolamento del settore compreso fra I corsi dei fiumi Ticino e Tagliamento (Coleoptera). *Biogeographia, Lavori della Società Italiana di Biogeografia* 26:229-378.

GOOD P. (2000) - *Permutation tests: a practical guide to resampling methods for testing hypotheses*. 2nd ed. New York: Springer.

GUNZ P, MITTEROECKER P. (2013) - Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix* 24:103-109.

HOLSINGER JR. (1988) - Troglobites: the evolution of cave-dwelling organisms. *American Scientist*, 76, 85-105.

HOLSINGER JR. (2000) - Ecological derivation, colonization, and speciation. In H Wilkens, DC Culver, WF Humphreys, eds. *Ecosystems of the world*, vol. 30, Subterranean ecosystems. Amsterdam: Elsevier, 399-415.

KLINGENBERG C.P. (2009) - Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a-priori hypotheses. *Evol. Dev.* 11:405-421.

KLINGENBERG C.P. (2011) - MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol.* 11, 353-357.

KLINGENBERG C. P., MARUGÀN-LOBÓN J. (2013) - Evolutionary covariation in geometric morphometric data: analyzing integration, modularity, and allometry in a phylogenetic context. *Syst. Biol.* 62:591-610.

KLINGENBERG C. P., McINTYRE G. S. (1998) - Geometric Morphometrics of Developmental Instability: Analyzing Patterns of Fluctuating Asymmetry with Procrustes Methods. *Evolution*, 52(5), 1363-1375.

KLINGENBERG C.P., ZAKLAN S.D. (2000) - Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* 54:1273-1285.

LATELLA L. (2011) - Classificazione, evoluzione e adattamenti degli organismi ipogei. In: Inguscio S., Maurano F. (eds). *Atti 48° Corso di III livello di Biospeleologia*. Pertosa, 9-11 aprile 2010: 65-71.

LATELLA L. (2022) - The Subterranean Cholevinae of Italy. In: Wynne J. (ed), *Cave Biodiversity: Speciation and Diversity of Subterranean Fauna*. In press.

LATELLA L., SAURO U. (2011) - Note di Storia Naturale del sottosuolo dei Monti Lessini e del suo popolamento. *Quaderno Culturale - La Lessinia ieri oggi e domani*, 34: 57-64.

LATELLA L., SBORDONI V. (2002) - Fauna delle Grotte. In: Minelli A., Chemini C., Argano R., Ruffo S. (a cura di): *La fauna in Italia*. Touring e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio ed., 339-358.

LATELLA L., SBORDONI V., ALLEGRUCCI G. (2018) - Three new species of *Bathysciola* Jeannel, 1910 (Leiodidae, Cholevinae, Leptodirini) from caves in Central Italy, comparing morphological taxonomy with molecular phylogeny. *Insect Systematics & Evolution*, 49, 409-442.

LATELLA L., STOCH F. (2001) - Biospeleologia. In: Stoch F. (a cura di), *Grotte e fenomeno carsico. La vita nel mondo sotterraneo*. Ministero dell'ambiente e Museo Friulano di Storia Naturale, *Quaderni Habitat*, 1: 53-129.

LATELLA L., VERDARI N., GOBBI M. (2012) - Distribution of terrestrial cave-dwelling arthropods in two adjacent Prealpine Italian areas with different glacial histories. *Zoological Studies*, 51(7), 1113-1121.

MARAZZI S. (2005) - Atlante orografico delle Alpi. SOIUSA. Suddivisione orografica internazionale unificata del Sistema Alpino. *Quaderni di cultura alpina*, Priuli & Verlucca ed., 82-83: 1-414.

MATTANA U. (1974) - Glacialismo e fenomeni periglaciali nel territorio delle Prealpi venete. Univ..

PAVAN M. (1944) - Considerazioni sui concetti di troglobio, troglofilo e troglosseno. *Le Grotte d'Italia*, 5: 35-41.

PENCK A., BRÜCKNER E. (1901) - 1909: *Die Alpen im Eiszeitalter*. V. III., Leipzig.



- RACOVITZA E.G. (1907) - Essai sur le problèmes biospéologiques. Arch. Zool. Exp., 6: 371-448.
- ROHLF F. J. (2015) - The tps series of software. Hystrix, 26, 9-12.
- ROHLF F. J., CORTI M. (2000) - The use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. Syst. Biol. 49:740-753.
- RUFFO S. (1955) - Le attuali conoscenze sulla fauna cavernicola pugliese. Mem. Biogeogr. Adriatica, 3: 1-143.
- SAURO U. (1982) - Materiali e problemi per uno studio paleogeografico delle regioni carsiche italiane. Biogeographia-The Journal of Integrative Biogeography, 7(1), 467-513.
- SBORDONI V., RAMPINI M., COBOLLI SBORDONI M. (1982) - Coleotteri Catopidi cavernicoli italiani. Lavori della Società Italiana di Biogeografia, 7:253-336.
- SCHMIDL A. (1854) - Die grotten und Hohlen von Adelsber, Lueg, Planina und Loos. Braunmuller, Wien: 316 pp.
- SKET B. (2004) - Can we agree in an ecological classification of subterranean animals? XVII International Symposium on Biospeleology, Raipur, India 25-30 November, 2004. Book of abstracts: 30pp.
- SOMMARUGA M., ZORZIN R. (2020) - Tracce di antichi ghiacciai sulla dorsale montuosa di Campofontana (Lessini Veronesi Orientali). Bollettino del Museo Civico di Storia Naturale di Verona, 44:53-89.