

# Uso di marcatori biochimici per lo studio del popolamento stigobio di Sardegna: gli Asellota (Crustacea Isopoda)

ROBERTO ARGANO, GIUSEPPE MESSANA \*, ELVIRA DE MATTHAEIS,  
MARINA COBOLLI, VALERIO KETMAIER

*Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università di Roma "La Sapienza"*

*\* Centro di Studio per la Faunistica ed Ecologia Tropicali, C.N.R., Firenze*

Key words: Paleogeography, Genetic divergence, Stygobitic fauna, *Stenasellus*, *Proasellus*.

## SUMMARY

Levels of genetic divergence on several populations belonging to different Asellota species, obtained via allozymic markers, are reported and discussed with the aim to shed light on the dynamic of colonization of Sardinian surface and underground freshwaters. Two families of Asellota are here considered: Asellidae (genus *Proasellus*) and Stenasellidae (genus *Stenasellus*). Up to date only three species of Stenasellidae were known for Sardinia (*S. racovitzai*, *S. nuragicus*, *S. assorgiai* s.l.). The genus *Proasellus* is present in Sardinia with populations showing different levels of adaptation to underground environment. We studied three strictly stygobitic populations, five epigeal Sardinian populations and one population from Giordania, in the area of the type locality of the species *P. coxalis*, in order to better understand pattern of phylogenetic relationships and colonisation dynamic. Levels of genetic divergence allowed us to hypothesise a model of colonisation of Sardinian freshwaters based on multiple dispersal events. Quaternary climatic changes may be considered responsible of the presently observed pattern of genetic differentiation and of the colonisation of underground waters. Recent researches have led to discover an high number of *Stenasellus* populations: levels of genetic divergence among them allowed us to recognise six species at least, whose phylogenetic relationships are discussed taking into account palaeogeographic events that affected Sardinia from Miocene to date.

## INTRODUZIONE

Le acque sotterranee della Sardegna racchiudono un importante capitolo della storia del popolamento animale dell'isola, ben lontano dall'essere completamente scritto. Questo ambiente, benché avaro di informazioni, costituisce un inesauribile campo di studi che consente, tra l'altro, di saggiare il valore informativo di metodologie diverse, di moda e non, messe a confronto.

Da qualche anno stiamo tentando di realizzare un programma organico di ricerche sugli isopodi dulcacquicoli dell'isola, sia per quanto riguarda gli ambienti di superficie che quelli sotterranei. Si tratta di organismi di grande interesse biogeografico e, più in generale, evolutivo.

Infatti, come è stato più volte affermato, il monofiletismo, che è alla base dell'intero ordine degli Isopodi, garantisce una sostanziale omogeneità organizza-

tiva in un taxon vasto (gli Isopodi ammontano a circa 10.000 specie) e a grande radiazione adattativa (marini, dulcacquicoli, terrestri). Le scarse capacità dispersive, la forte tendenza alla stenoecia, la buona conoscenza sistematica di cui si dispone, contribuiscono a fare di questo gruppo (e ovviamente ancor più degli Asellota di cui ci occupiamo in questa sede) un modello biologico di grande interesse.

In particolare gli Asellota dulcacquicoli della Sardegna sono insediati in un'area geografica che costituisce di per sé un'ulteriore motivo di interesse. Lo stato di insularità, la varietà di ambienti, testimoniata in primo luogo dalla complessità geologica, le relativamente buone conoscenze sulla storia paleogeografica, a partire dall'origine per distacco dall'area pirenaica, fanno della Sardegna una invidiabile palestra per il nostro tipo di studi e, naturalmente, per infiniti altri.

Gli Asellota delle acque dolci sarde, sia superficiali che sotterranee, fanno capo a due distinte famiglie, Stenasellidae e Asellidae, caratterizzate da evidenti relazioni di parentela (Wilson, 1987). Gli Asellidae sono rappresentati tanto da forme superficiali che sotterranee, la cui penetrazione nelle acque continentali sarebbe avvenuta in tempi relativamente recenti (Henry e Magniez, 1970). Gli Stenasellidae, al contrario, sono un gruppo relitto comprendente forme esclusivamente stigobie, la cui storia continentale, dopo una primitiva fase marina, sarebbe databile a epoche estremamente remote, presumibilmente il Cretaceo superiore (Magniez, 1981).

In questa sede verranno riportati dati ottenuti dall'analisi dei polimorfismi enzimatici applicati allo studio della variazione genetica in diverse popolazioni di *Proasellus* e *Stenasellus* campionate in varie località della Sardegna, con lo scopo di evidenziare affinità e differenze nei pattern evolutivi tanto in taxa che presentano sia forme epigee che forme solo recentemente adattatesi all'ambiente ipogeo (*Proasellus*) che in organismi ritenuti antichi colonizzatori dell'ambiente sotterraneo (*Stenasellus*). Utilizzando gli stessi dati si tenterà inoltre di stimare temporalmente gli eventi cladogenetici che hanno dato origine al differenziamento fra le popolazioni analizzate e di riportare queste stime temporali ai modelli disponibili sulla storia paleogeografica dell'isola.

La diagnosi formale degli eventuali nuovi taxa individuati verrà proposta in altra sede.

#### IL CASO *PROASELLUS*

Per quanto riguarda il popolamento ad Asellidae della Sardegna è opportuno rifarsi a Manicasteri et al. (1983). In quella sede veniva disegnato in grandi linee un quadro che prevedeva la presenza sull'isola della specie *P. coxalis* ritenuta, all'epoca, ampiamente diffusa in area circumediterranea, e della forma ipogea *P. patrizii* (Grotta di Su Coloru, Sassari) affine alla precedente e probabilmente da

essa derivata. Veniva inoltre indicata l'esistenza di altre tre entità stigobie (nelle grotte di Molafà, Mara e Romana), sempre del sassarese.

Le quattro entità sotterranee, distinguibili per alcuni caratteri morfologici, venivano considerate, assieme a *P. patrizii* "quattro diversi momenti di uno stesso fenomeno" (Manicastroi et al., 1983). Con questa espressione si attribuiva la responsabilità dell'orientamento in senso stigobio di queste quattro entità e del loro susseguente differenziamento rispetto alla specie di superficie, a uno stesso evento di tipo ecologico. L'instabilità dei sistemi idrici di superficie in ambito insulare costituisce una forte spinta all'isolamento nei sistemi idrici sotterranei per organismi, come appunto gli Asellidi, che, come è noto da tempo, mostrano una notevole attitudine all'adattamento in tal senso. Per sottolineare l'unitarietà del fenomeno di insediamento di queste popolazioni nell'ambiente di rifugio sotterraneo, veniva proposto, in quella sede, che fossero considerate come sottospecie. Il problema era evidentemente quello di individuare con sicurezza la specie di riferimento, che poteva essere una specie di superficie attualmente ancora esistente sull'isola, come *P. coxalis*, o la stigobia *P. patrizii*, spostando così nel tempo l'evento di colonizzazione delle acque sotterranee.

Infine veniva indicata la presenza di due altre specie, una di superficie e una sotterranea, che, pur apparendo sufficientemente differenziate, erano di difficile inquadramento nell'ampio genere *Proasellus*.

C'è da tener presente che la sistematica su base morfologica del genere *Proasellus* pur avendo fornito un valido quadro complessivo della dinamica evolutiva di questo genere, negli ultimi tempi mostra un po' la corda. L'approccio morfologico, fondamentale e insostituibile per l'inquadramento dei problemi e nella formalizzazione delle conclusioni, trova, specialmente nei gruppi di specie evolutivamente più dinamici, un suo limite. Le recenti affermazioni (Moroli, 1992; Stoch, 1989) sull'assenza in Europa (e quindi in Italia) di *P. coxalis*, pur se sostenute da validissime motivazioni, destano qualche perplessità aprendo una vivace problematica in cui trovano spazio ipotesi basate su approcci metodologici alternativi.

Proprio in relazione al problema di cui si tratta, era stato detto che "i caratteri morfologici sono da considerarsi la classica punta dell'iceberg del grado di differenziamento tra due entità sistematiche" (Manicastroi et al., 1983). Quando questi caratteri portano a conclusioni controverse diventa necessario tentare vie di soluzione diverse, in particolare per un complesso di specie come quelle del gruppo *coxalis*, di grande interesse per ricerche di laboratorio nei più vari settori e per studi ecologici e sistematico-biogeografici, su cui la letteratura scientifica è enorme.

Per quanto riguarda il popolamento della Sardegna, diciamo subito, comunque, che a quindici anni di distanza il quadro proposto mantiene, nelle sue linee generali, una sua sostanziale validità. Tuttavia il nuovo materiale reso disponibile dalle nostre recenti campagne di campionamento (Fig. 1), analizzato mediante l'uso di marcatori biochimici per stimare il livello di differenziamento gene-

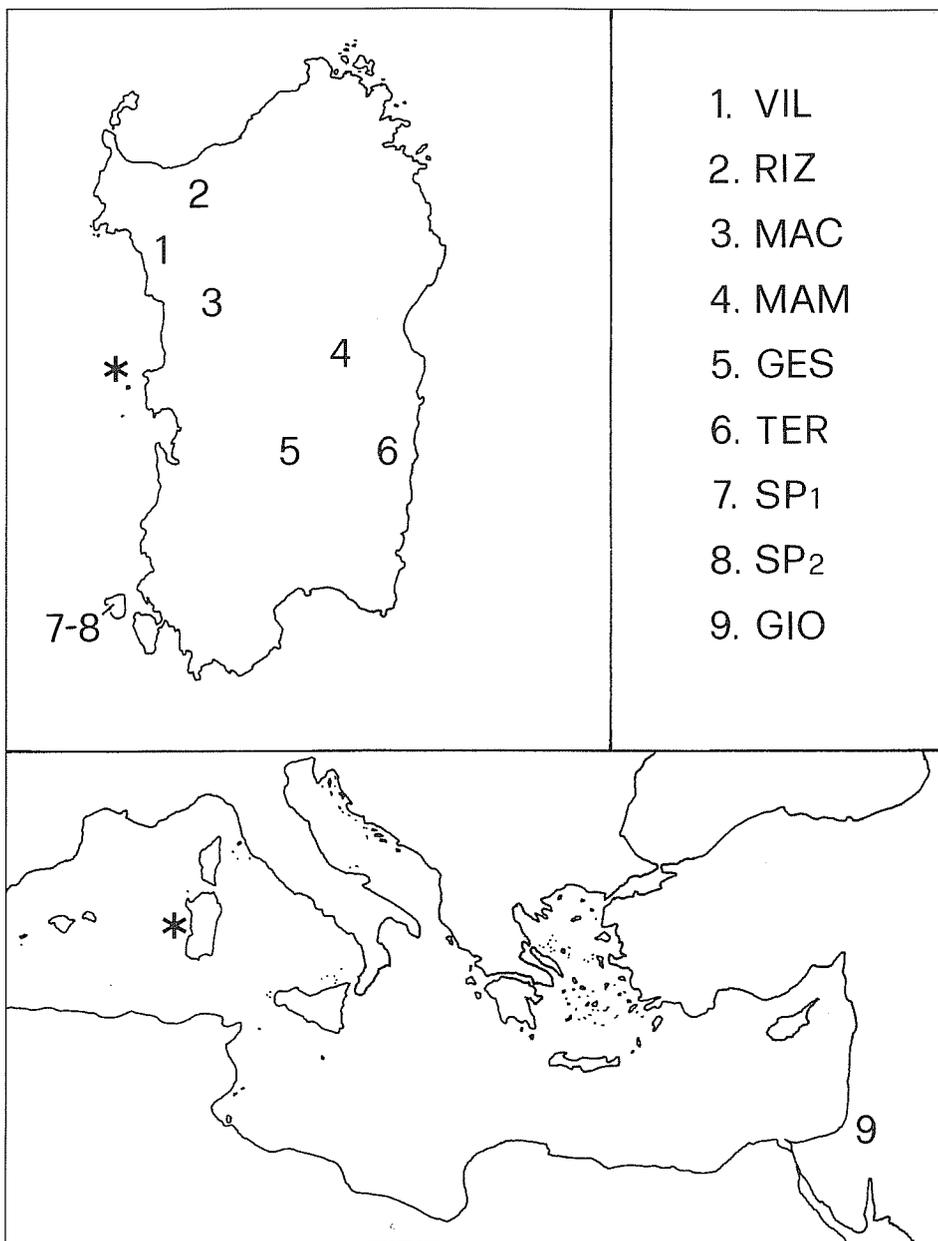


Fig. 1 - Località di raccolta delle popolazioni di *Proasellus* studiate (per le sigle vedi testo).

tico fra popolazioni sia epigee che ipogee, ha fornito un quadro complessivo più ricco di dati e più dinamico.

L'analisi dei polimorfismi enzimatici è stata condotta su di un lotto di 13 proteine enzimatiche, codificate da 19 loci strutturali (*Acph-1; Acph-2; Aph-1; Aph-2; α-Amy; β-Gluco; Est; Hk; Idh-1; Idh-2; Lap; Ldh; No-Dh-1; No-Dh-2; Pep-1; Pep-2; Pep-3; Pgm; Phi*) (per dettagli tecnici vedi De Matthaeis et al., 1983; Ketmaier, 1998).

Il livello di differenziamento fra le popolazioni è stato quantificato mediante l'indice di distanza genetica  $D$  (Nei, 1978), i cui valori sono riportati in Tab. I. Sulla base dei valori di  $D$  è stato costruito il dendrogramma UPGMA (Fig. 2).

Per quanto riguarda le popolazioni sotterranee, depigmentate e anoftalme, abbiamo potuto disporre di tre campioni utili per l'esame elettroforetico. I campioni provengono da una percolazione individuata nella valle di Rizzeddu (RIZ), nell'immediata periferia della città di Sassari, da un pozzo al centro della Giara di Gesturi (GES) e da un fontanile lungo la strada che da Tertenia (TER), nel settore sudorientale dell'isola, porta al mare. La presenza di organismi stigobi in questi ambienti inusuali è legata a piogge particolarmente abbondanti che fanno affiorare la falda e li portano in superficie.

Dalla tabella dei valori di distanza genetica (Tab. I) risulta evidente che Gesturi e Rizzeddu sono relativamente poco differenziate tra loro, malgrado la notevole distanza geografica. Si tratta di un risultato che consente di definire le due popolazioni come due momenti di uno stesso fenomeno di insediamento nell'ambiente sotterraneo a partire da una stesso taxon di superficie: una conferma indiretta dell'ipotesi formulata a suo tempo da Manicastro et al. (1983). La popolazione di Rizzeddu costituisce, probabilmente, uno dei tanti episodi della vivace dinamica di colonizzazione del complesso sistema calcareo del sassarese. Le altre popolazioni stigobie dello stesso genere *Proasellus* di cui si aveva già notizia in quest'area indicano infatti una serie di diversificazioni, confermate da dati morfologici, realizzatesi nel corso della progressiva invasione per vie sotterranee.

Il campione di Tertenia si differenzia maggiormente dagli altri due ed è da attribuirsi a un episodio indipendente e più lontano nel tempo.

Tab. I - Valori di distanza genetica  $D$  (Nei, 1978) fra le popolazioni di *Proasellus* studiate.

POP.	GIO	GES	MAC	MAM	RIZ	SP1	SP2	TER	VIL
GIO	*****								
GES	0.505	*****							
MAC	0.588	0.179	*****						
MAM	0.551	0.494	0.733	*****					
RIZ	0.561	0.180	0.358	0.561	*****				
SP1	1.005	0.571	0.561	0.656	0.716	*****			
SP2	0.549	0.647	0.815	0.500	0.735	0.400	*****		
TER	0.628	0.482	0.606	0.390	0.423	0.631	0.560	*****	
VIL	0.646	0.625	0.421	0.516	0.455	0.846	0.753	0.517	*****

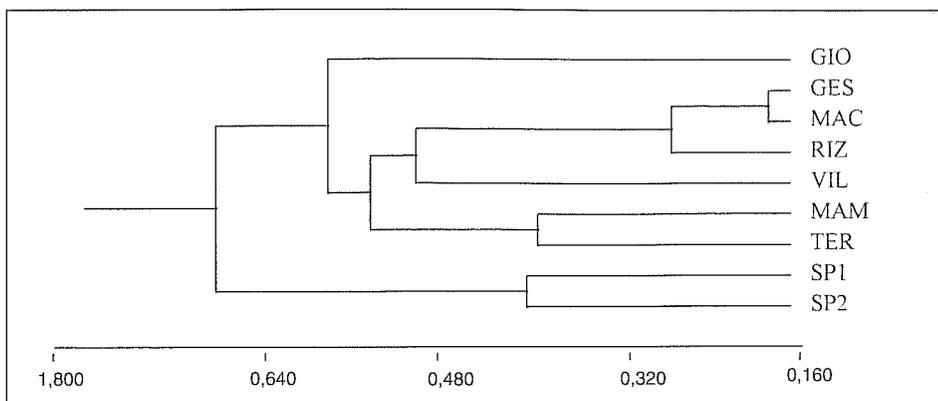


Fig. 2 - Dendrogramma UPGMA costruito sui valori di distanza genetica  $D$  (Nei, 1978) fra le popolazioni di *Proasellus* studiate.

Resta aperto il problema di quale possa essere stata la specie epigea da cui si sono originate le popolazioni sotterranee, ammesso che sia sopravvissuta negli ambienti acquatici superficiali dell'isola.

La prima domanda che ci siamo posta è stata quella di saggiare la validità di *P. coxalis* di Sardegna. Questione non facile in quanto la località tipica della specie, punto di partenza convenzionale ma obbligatorio stante l'attuale incertezza sulla reale geonemia della specie, non esiste più. Dollfus, nella sua descrizione originale (1892) indica alcune località che attualmente rientrano nello stato di Israele. Precedenti tentativi effettuati in queste località ci hanno messo di fronte a una realtà ambientale profondamente mutata rispetto a quella in cui dovette operare l'Autore francese. Le grandi opere di bonifica attuate hanno infatti eliminato del tutto gli antichi ambienti naturali. Avendo avuto occasione di raccogliere alcuni esemplari di *Proasellus* in una zona immediatamente all'interno della costa meridionale del Mar Morto, in Giordania, ci è sembrato sufficientemente corretto utilizzare questo materiale come punto di riferimento.

Abbiamo quindi analizzato il livello di divergenza genetica fra questo campione di Giordania (GIO) e una serie di campioni di popolazioni epigee di *Proasellus* provenienti dalle seguenti località di Sardegna: Macomer, Sassari (MAC); Villanova Monte Leone, Sassari (VIL); Mamoiada, Nuoro (MAM); Isola di San Pietro, Cagliari, due pozzi (SP1, SP2). Le località di raccolta delle popolazioni sono riportate in Fig. 1.

Lo studio allozimico ha permesso di evidenziare un alto grado di differenziamento genetico fra le popolazioni studiate, come deducibile dagli alti valori di distanza genetica (Tab. I). MAC e VIL da una parte e SP1 e SP2 dall'altra si raggruppano in due cluster distinti caratterizzati da un livello interno di divergenza genetica dello stesso ordine di grandezza ( $D_{\text{media}}=0,400$ ). Questi due cluster

e il campione MAM sono differenziati tra loro per valori di  $D$  generalmente riscontrati in confronti eterospecifici (Ayala, 1983; Thorpe, 1983; Hedgecock et al., 1982; Stewart, 1993).

L'alto grado di differenziamento genetico, unitamente alla possibilità di riconoscere gruppi di popolazioni maggiormente affini fra loro, induce a ritenere il popolamento ad Asellidae sardo come risultante di eventi successivi di colonizzazione da parte di linee filetiche ricollegabili all'attuale complesso di specie che fa capo a *P. coxalis*. Fino a oggi, ci si limitava infatti a indicare un'unica specie di superficie *P. coxalis*, tutt'al più attribuibile, su basi puramente intuitive, alla sottospecie *sardous*, creata e descritta, ma senza indicare caratteri diagnostici, a suo tempo da Arcangeli (1942). L'altra specie di superficie, non identificata ma considerata nuova da Manicasteri et al. (1983), rientra probabilmente in questo complesso di specie superficiali sardo affine a *coxalis*.

Ora sappiamo che in Sardegna esistono almeno tre specie di superficie, di cui una limitata all'Isola di San Pietro, che appaiono relazionate in qualche modo con *P. coxalis*. È probabile che queste conclusioni dovranno essere riviste, a livello sistematico, quando sarà studiata con tecniche opportune la relazione filetica di *P. coxalis* con altre entità, come *P. banyulensis*, che Stoch (1989) considera presente sull'Italia continentale e con cui fino a oggi dovrebbe essere stata confusa la specie *P. coxalis*. Solo una revisione sull'intero areale di queste due specie, portata avanti con tecniche differenziate, potrà riorganizzare in un quadro organico il puzzle che attualmente abbiamo di fronte.

Per quanto riguarda il nostro problema, cioè l'origine del popolamento stigobio sardo, oggetto di questa nota, si può comunque arrivare a qualche conclusione interessante.

Il dendrogramma UPGMA proposto in Fig. 2 comprende sia le popolazioni di superficie che quelle sotterranee. Risulta evidente la stretta correlazione tra le tre popolazioni stigobie saggiate e alcune popolazioni epigee.

In particolare i campioni GES, MAC, RIZ costituiscono un cluster notevolmente omogeneo. La popolazione epigea da cui proviene il campione MAC è situata in posizione geograficamente intermedia rispetto alle altre due sotterranee.

Il modello che proponiamo, sulla base dei dati disponibili, prevede un insediamento in ambienti di rifugio sotterranei sotto la spinta di uno stesso evento ecologico che ha interessato gran parte dell'isola. Tale insediamento potrebbe essersi realizzato a partire da una forma di superficie rappresentata attualmente dalla popolazione di Macomer. Il complesso di popolazioni sotterranee che popolano attualmente la vasta area carsica del Sassarese, delle quali fa parte quella di Rizzeddu (RIZ), sono probabilmente il risultato di successivi fenomeni di dispersione nel reticolo idrografico sotterraneo di quest'area. Il più marcato differenziamento genetico della popolazione di Rizzeddu, che probabilmente caratte-

rizza anche le altre popolazioni stigobie dell'area, sarebbe così giustificato, oltre che da spinte selettive e probabili episodi di competizione, anche da fenomeni stocastici quali deriva genetica, effetto del fondatore, ecc. Sarà naturalmente necessaria una verifica che prevede il riesame, possibilmente con le stesse metodologie, di altre popolazioni epigee oltre che di queste stigobie, compresa quella attualmente nota come *P. patrizii*.

Per quanto riguarda invece la popolazione di Tertenia, il suo insediamento nei sistemi idrici sotterranei del bacino idrografico del Rio di Quirra, per quanto ne sappiamo al momento, sembra originato in un periodo antecedente da una diversa specie di superficie, riferibile alla popolazione di Mamoiada.

Le popolazioni epigee di *Proasellus* attualmente presenti in Sardegna e che in questa sede consideriamo strettamente correlate con quelle insediate in ambiente stigobio, mostrano, come s'è detto, una diretta relazione filogenetica con *P. coxalis*.

Secondo Deeleman-Reinhold (1965) e Racovitza (1919) questa specie avrebbe avuto come area d'origine l'Asia Minore, mentre una sua prima espansione verso la parte più meridionale dell'Europa sarebbe databile al pre-Quaternario (Herhaus, 1977). Su questo popolamento perimediterraneo antico avrebbero pesantemente agito le variazioni climatiche del Quaternario, creando di volta in volta situazioni di isolamento geografico e promuovendo fenomeni di differenziamento locale. Di questo popolamento più antico resterebbero abbondanti tracce sotto forma sia di popolazioni di superficie che di popolazioni ipogee, secondo un modello di colonizzazione proposto da Henry e Magniez (1992) per la penisola Iberica. Su questa base si sarebbero poi innestate ondate successive di colonizzazione, che avrebbero portato all'attuale condizione di coesistenza fra forme filogeneticamente indipendenti. Questo scenario, che ha come sfondo l'intera area mediterranea, sembra quindi ripetersi su scala ridotta in Sardegna.

È infine possibile tentare di correlare l'ordinamento delle popolazioni sulla base delle relative distanze genetiche a sistemi idrografici diversi. Infatti, come già accennato, una possibile spiegazione dell'insediamento di popolazioni ipogee a partire da forme epigee potrebbe essere ricercata nell'instabilità dei sistemi idrografici di superficie delle grandi isole del Mediterraneo, rispetto alle regioni continentali, che avrebbero indotto la colonizzazione dei sistemi acquatici sotterranei, come ambiente di rifugio, da parte di forme di superficie (Manicastro et al., 1983). Queste, una volta isolate in ambienti sotterranei più o meno indipendenti fra loro, potrebbero essere andate incontro ai fenomeni di differenziamento che oggi riscontriamo. MAC e GES sono localizzate lungo la faglia Oligo-Miocenica che taglia la Sardegna in direzione nord-sud, attualmente solcata dal bacino idrografico del fiume Tirso. La stazione di raccolta di RIZ, e il complesso di popolazioni stigobie del Sassarese, sono localizzate in un bacino imbrifero diverso, facente capo al fiume Mannu, ma in parte collegato al bacino del Tirso

(Pracchi e Terrosu Asole, 1971), mentre VIL fa capo al bacino idrografico del Temo, nettamente separato dai precedenti.

È interessante notare che un analogo pattern di differenziamento genetico è stato messo in luce da Culver et al. (1995) fra popolazioni ipogee ed epigee di *Gammarus minus*, un anfipode nord-americano caratterizzato da popolazioni a livelli diversi di specializzazione troglobia: anche in quel caso l'ordinamento delle popolazioni sulla base delle relative distanze genetiche rispecchiava l'appartenenza a sistemi idrografici diversi piuttosto che seguire un andamento habitat-dipendente, con valori di distanza genetica fra bacini e all'interno dei medesimi bacini dello stesso ordine di grandezza dei valori ottenuti fra le popolazioni di *Proasellus* qui studiate.

Degno di nota è il dato riguardante le due popolazioni dell'Isola di San Pietro (SP1, SP2), nettamente differenziate e dalle altre e fra di loro. L'esistenza di continuità di terre emerse fra questa piccola isola e la Sardegna durante il Pleistocene (Esu e Kotsakis, 1983) potrebbe giustificare la loro presenza su San Pietro a seguito di fenomeni di dispersione, seguiti, presumibilmente, dal differenziamento genetico. La valutazione del taxon di appartenenza richiede, come è stato detto, indagini ulteriori.

È semmai più difficoltoso riuscire a spiegare l'elevato grado di differenziamento genetico emerso fra SP1 e SP2 ( $D=0,400$ ), popolazioni raccolte in pozzi artesiani molto vicini l'uno all'altro. L'Isola di San Pietro è caratterizzata da presenza di acqua sorgiva e quindi di falde sotterranee proprie ed è formata da rocce effusive (Pracchi e Terrosu Asole, 1971). SP1 e SP2 in realtà debbono essere considerate a tutti gli effetti popolazioni epigee, non presentando nessuna delle specializzazioni morfologiche tipiche dei cavernicoli; la loro localizzazione in biotopi sotterranei è riconducibile alla non disponibilità di ambienti idonei in superficie. Queste due popolazioni potrebbero rappresentare un primo stadio nella colonizzazione dell'ambiente sotterraneo che si è ripetuta più volte in linee filitiche diverse nel genere *Proasellus* (Argano, 1979; Pesce e Argano, 1980).

Una possibile interpretazione del livello di divergenza osservato potrebbe prendere in considerazione la presenza di queste due popolazioni in falde isolate da rocce scarsamente permeabili, anche su scale micro-geografiche, tali da determinare un'effettiva caduta del flusso genico fra le popolazioni, così come osservato nell'anfipode cavernicolo del genere *Niphargus* da Sbordonì et al. (1979).

#### IL CASO *STENASELLUS*

Fino a qualche tempo fa in Sardegna erano note tre specie appartenenti al genere *Stenasellus*: *S. racovitzaei*, *S. nuragicus* e *S. assorgiai*.

La prima di queste specie, descritta da Razzauti (1925) per la Grotta del Danese (Toscana), era nota per una seconda località della Toscana (Fontanile Cavalleggeri,

nel Parco dell'Uccellina) e per una singola femmina raccolta nel 1964 nel sistema iporreico del Rio di Quirra (Sardegna sud-orientale) da M.me Coineau (Magniez, 1974). Dal punto di vista morfologico la forma del Rio di Quirra è difficilmente distinguibile da quella tipica toscana. Anche l'esame del maschio (da noi recentemente trovato nel corso di questa ricerca), limitando l'osservazione ai caratteri diagnostici canonici, confermerebbe la diagnosi proposta da Magniez.

Tuttavia il fatto che una specie, appartenente a un gruppo di così antico insediamento negli ambienti dulcaquicoli sotterranei, potesse essere distribuita su un areale così decisamente discontinuo non rispondeva ai modelli biogeografici ai quali ci ispiriamo.

Sulle tracce di quella singola femmina siamo riusciti a disporre, dopo una serie di tentativi non sempre riusciti, di un discreto campione della popolazione del Rio di Quirra utile per l'analisi dei polimorfismi enzimatici.

Da un primo confronto tra questa forma sarda di *Stenasellus* e *S. racovitzai* delle due località toscane è stato così possibile evidenziare un elevato grado di divergenza genetica calcolata mediante l'indice di distanza genetica  $D$  (Nei, 1978) ( $D_{\text{media}}=1,259$ ) (Messana et al., 1995). Una distanza genetica che giustifica ampiamente il rango di specie che attualmente attribuiamo alla forma del Rio di Quirra.

Una volta identificato questo nuovo endemismo sardo (la descrizione formale, che prevede l'individuazione di nuovi caratteri morfologici, è in corso di elaborazione), ci siamo interrogati sulla sua possibile origine. L'ipotesi più ragionevole è che la nuova specie rientri nella casistica delle molte specie sarde che, presentando rapporti filogenetici con elementi pirenaici, costituiscono la testimonianza biologica dei fenomeni geologici che hanno dato origine all'isola. L'attuale posizione dell'isola di Sardegna al centro del Mar Tirreno è, come è noto, il risultato di eventi tettonici che hanno portato al distacco dalla penisola iberica della microzolla sardo-corsa e alla sua successiva rotazione (Alvarez, 1972).

*S. racovitzai* viene considerata del gruppo centroeuropeo *virei* (Magniez, 1974), presente anche nell'area pirenaica. La strettissima affinità della nuova specie con *S. racovitzai* (e quindi con il gruppo *virei*), riscontrabile su base morfologica, potrebbe costituire una conferma dell'ipotesi esposta. Abbiamo di conseguenza campionato diverse popolazioni francesi di *S. virei* confrontandole con la specie del Rio di Quirra. Una stima temporale in grado di giustificare il grado di divergenza genetica riscontrata ( $D_{\text{media}}=1,161$ ), tenendo conto di tutte le cautele e approssimazioni del caso, porta gli eventi cladogenetici molto indietro nel tempo.

Sono in corso, da parte dei colleghi del Dipartimento di Scienze della Terra della Terza Università di Roma, studi paleomagnetici che consentiranno di datare con maggior precisione l'evento del distacco della zolla sardo-corsa.

La conoscenza di almeno una singola stima temporale di tipo geologico degli eventi paleogeografici ritenuti responsabili di determinati eventi cladogenetici è

ovviamente di fondamentale importanza per tentare la calibrazione di un orologio molecolare all'interno di un certo taxon (Beerli et al., 1996; Caccone et al., 1994; 1997). La storia geologica della Sardegna e il complesso di specie relitte di *Stenasellus* offrono questa possibilità (Ketmaier et al., 1996; 1997). Proporremo perciò una prima calibrazione ad hoc dell'orologio molecolare nel genere *Stenasellus* quando saranno disponibili i risultati delle indagini paleomagnetiche in corso.

Le ricerche che stiamo conducendo hanno inoltre consentito l'identificazione di altre due nuove specie dello stesso complesso *racovitzai*, una sarda e una corsa, che costituiranno un utile materiale di confronto per saggiare la validità di questa proposta.

La forma corsa, già nota da tempo e considerata conspecifica di *S. racovitzai*, presenta in realtà (da una prima approssimativa valutazione basata su pochi individui in Ketmaier, 1998) una distanza genetica rispetto a quest'ultima specie ( $D=0,954$ ) che garantisce il rango di specie nuova che proponiamo. Stiamo lavorando, per una conferma di quest'ultimo dato, su un campione molto più consistente.

La seconda specie sarda del complesso *racovitzai*, ben differenziata dall'altra specie sarda del Rio di Quirra ( $D=0,705$ ), è stata recentemente localizzata nel sassarese, nell'area nord-occidentale dell'isola.

Le altre due specie già note per l'isola, *S. nuragicus* e *S. assorgiai*, erano state a suo tempo scoperte in due distinte grotte dell'Iglesiente, nell'area sud-occidentale dell'isola (Argano, 1968). Magniez (1981) sostiene un'affinità di queste con il gruppo di specie balcaniche che fanno capo al genere *Balkanostenasellus* e non con *S. virei-racovitzai*. Le due specie sono estremamente simili tra loro morfologicamente (l'unico carattere diagnostico differenziale a suo tempo individuato consisteva nella forma del secondo pleopode femminile).

Il rinvenimento di alcuni esemplari in pozzi nella fascia intermedia della piana del Campidano non attribuibili con sicurezza, su base morfologica, all'una o all'altra delle due specie dell'Iglesiente, suggerì l'ipotesi che si trattasse di un'unica specie distribuita nell'area meridionale dell'isola (Manicastro et al., 1983; Messina et al., 1995).

Nel corso delle citate ricerche nel bacino del Rio di Quirra fummo sorpresi nell'individuare una popolazione attribuibile, su base morfologica, al complesso *nuragicus-assorgiai*.

Venne effettuata una prima valutazione del grado di divergenza genetica tra un campione di questa popolazione di Quirra e un campione di *nuragicus-assorgiai* della grotta di Su Mannau. Questa cavità è in continuità con la grotta di San Pietro che costituisce la località tipica di *S. nuragicus* (Argano, 1968). I risultati ( $D=0,243$ ) giustificavano l'attribuzione della popolazione di Quirra al complesso *nuragicus-assorgiai* (Messina et al. 1995).

Per confermare l'appartenenza di quest'ultima popolazione all'una o all'altra specie restava comunque da definire la validità di *S. assorgiai* rispetto a *S. nuragi-*

*cus*. Il confronto tra campioni provenienti dalle località tipiche delle due specie (rispettivamente grotta di Pitzu e Crobisi e grotta di San Pietro) ci ha recentemente permesso di confermare la validità di buone specie di *S. nuragicus* e *S. assorgiai* e di attribuire la popolazione di Quirra a *S. nuragicus*.

Il risultato del confronto ha fornito una prima possibilità di correlare temporalmente (sempre con la cautela e l'approssimazione dovute) gli eventi cladogenetici che hanno differenziato le due specie con episodi di ingressione marina pleistocenici (Ketmaier et al., in prep.). Questi episodi possono aver determinato l'evoluzione allopatrica di ciò che oggi riconosciamo come due entità specifiche ben separate (rispettivamente *S. nuragicus* a est e *S. assorgiai* a ovest dell'attuale Campidano) a partire dal medesimo stock ancestrale.

Nel corso di questa indagine si sono ottenuti alcuni campioni da pozzi artificiali della piana del Campidano che hanno permesso di stabilire che, mentre *S. nuragicus* è attualmente presente tanto a est che a ovest della piana del Campidano, *S. assorgiai* colonizza, con popolazioni più differenziate, il ramo del Campidano che piega verso Iglesias. Il dato conferma le capacità, già evidenziate da Magniez (1981; 1996) per *S. virei*, di questi organismi di utilizzare sistemi idrografici sotterranei come vie di dispersione (in questo caso quelli della piana del Campidano). Il grado di differenziamento genetico emerso fra le tre popolazioni che noi attribuiamo a *S. assorgiai*, maggiore di quello emerso tra quelle di *S. nuragicus*, apre alcuni interrogativi sui quali ci riserviamo di indagare.

L'attuale condizione di contiguità spaziale delle due specie nell'Iglesiente potrebbe essere imputabile a eventi di dispersione di *S. nuragicus* in direzione est-ovest, sfruttando il sistema idrografico sotterraneo che solca la piana del Campidano. Nel corso di questo processo di dispersione verso ovest le popolazioni che via via si formavano subivano probabilmente un processo di differenziamento genetico sia a seguito di fenomeni stocastici quali deriva genetica, effetto del fondatore, ecc., sia per pressioni selettive dovute alle caratteristiche dei nuovi ambienti occupati. I dati genetici sono sostanzialmente in accordo con questo modello di differenziamento, indicando per le popolazioni occidentali di *S. nuragicus* una derivazione più recente rispetto alle orientali. La popolazione di *S. nuragicus* dell'Iglesiente mostra infatti una distanza genetica maggiore, rispetto alla contigua popolazione di *S. assorgiai*, della popolazione di *S. nuragicus* della costa orientale.

Il quadro finora tracciato conferma, nei punti essenziali, le conoscenze acquisite grazie alle precedenti ricerche sistematiche realizzate su base morfologica, ma offre, sia per la quantità di materiale studiato sia per la qualità dei dati, un'immagine della dinamica biogeografica estremamente più articolata.

A quanto detto va aggiunta la scoperta di due ulteriori nuove specie individuate di recente. L'esame di alcuni esemplari provenienti dal sassarese e dal nuo-

rese forniti da L. Pesce, ci hanno indotto a effettuare una serie di campagne di ricerca in queste due aree. L'esplorazione dell'ambiente stigobio consente di portare alla luce dati imprevedibili e molto disparati, anche se di grande interesse. Si lavora quindi in genere su indicazioni preziose ma spesso insufficienti a elaborare un'analisi sostenibile. Il materiale in questione era costituito da alcuni esemplari di sesso femminile e da un individuo immaturo di sesso maschile, insufficiente quindi per uno studio accurato. Su questa base i campioni erano stati a suo tempo tentativamente attribuiti al gruppo *nuragicus* (quello del sassarese) e *racovitzai* (del nuorese) (Manicasteri et al., 1983).

I campioni attualmente disponibili hanno consentito invece di individuare, in via del tutto indicativa, due popolazioni distinte, affini tra loro, che sembrano relativamente vicine al gruppo *nuragicus*. Questa affermazione si basa su dati elettroforetici preliminari che indicano una notevole distanza genetica rispetto al gruppo *racovitzai* ( $D_{media}=1,717$ ) e una certa affinità col gruppo *nuragicus* ( $D_{media}=0,582$ ). Sulla base di prime osservazioni morfologiche le due popolazioni mostrano caratteri in comune con le specie del gruppo *breuili*, attualmente presente nei sistemi sotterranei del bacino idrografico del Guadalquivir, in Spagna. Gli eventi cladogenetici che hanno portato, nell'area settentrionale dell'isola, alla formazione di queste due entità a partire da un progenitore sardo sono probabilmente analoghi a quelli che hanno portato al differenziamento tra *nuragicus* e *assorgiai*.

La situazione complessiva porta quindi attualmente a sei (considerando queste due ultime popolazioni) il numero delle specie di *Stenasellus* note per la Sardegna: due del gruppo *racovitzai* (una del bacino di Quirra e l'altra dell'area nord-occidentale dell'isola) affine al gruppo centroeuropeo *virei*, due del gruppo *nuragicus*, a gravitazione balcanica, e due, su cui si hanno ancora dati preliminari, individuate nel nuorese e nel sassarese che, al momento, consideriamo a gravitazione spagnola.

Nella fase antecedente al distacco della microzolla è, a questo punto, legittimo supporre che nell'area in cui si sarebbe realizzato questo evento geologico, coesistessero almeno due entità tassonomiche decisamente distinte. Il distribuirsi di queste entità sulle masse continentali disponibili attraverso i sistemi idrografici sotterranei, e la conseguente inevitabile competizione, deve aver portato i loro discendenti all'insediamento in tre diverse aree geografiche. L'attuale complesso centroeuropeo *virei* rappresenta il risultato della dispersione, e successivo differenziamento, verso nord di una di queste entità. Le altre due si sono invece orientate rispettivamente verso le regioni sudoccidentale (complesso spagnolo) e sudorientale (complesso balcanico) andando indipendentemente incontro, nel corso della loro espansione, a eventi cladogenetici sulle rispettive aree continentali. Al momento del distacco della microzolla queste vicende erano appena all'inizio e rappresentanti di ognuna di queste entità, evidentemente all'epoca in fase

di relativa simpatria, sono rimasti imprigionati sul sistema sardo-corso che cominciava la sua deriva nel Mediterraneo. I medesimi fenomeni descritti per le regioni continentali sembra si siano realizzati, su scala minore, sul sistema sardo-corso, o meglio, per quanto ne sappiamo al momento, soprattutto in Sardegna, dando origine alle coppie di specie che abbiamo individuato.

Il modello proposto che, nelle sue linee essenziali poggia sui dati morfologici ed elettroforetici esposti e in fase di più accurata elaborazione, costituisce evidentemente soprattutto un articolato piano di lavoro per il prossimo futuro.

#### RINGRAZIAMENTI

Desideriamo ringraziare i proff. Augusto Vigna Taglianti, Valerio Sbordoni, Vezio Cottarelli, Giuseppe Lucio Pesce, il dott. Giuseppe Grafitti e il Gruppo Speleologico Sassarese, il dott. Umberto Pessolano e la studentessa Arianna Fulvo. Nel corso degli anni ci hanno affidato in studio vari campioni di *Asellota* di Sardegna. Grazie a questo materiale abbiamo potuto programmare in modo efficiente le campagne di campionamento finalizzate al presente studio.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ W. 1972 - Rotation of the Corsica-Sardinia microplate. *Nature*, 235: 103-105.
- ARCANGELI A. 1942 - Il genere *Asellus* in Italia, con speciale riguardo alla diffusione del sottogenere *Proasellus*. *Boll. Mus. Zool. Anat. Comp. Torino*, 49: 175-202.
- ARGANO R. 1968 - Due nuovi *Stenasellus* di Sardegna (Crustacea, Isopoda, Asellota). *Fragm. Entomol.*, 6: 1-22.
- ARGANO R. 1979 - Isopodi (Crustacea, Isopoda). In: *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*, 5. C.N.R., AQ/1/43: 1-65.
- AYALA F.J. 1983 - Enzymes as a taxonomic characters. In: G.S. Oxford, D. Rollinson (eds.), *Protein polymorphisms: adaptive and taxonomic significance*. Academic Press. London.
- BEERLI P., HOTZ H., UZZELL T. 1996 - Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for aegean water frogs. *Evolution*, 50: 1676-1687.
- CACCONE A., MILINKOVITCH M.C., SBORDONI V., POWELL J.R. 1994 - Molecular biogeography: using the Corsica-Sardinia microplate disjunction to calibrate mitochondrial rDNA evolutionary rates in mountain newts (*Euproctus*). *J. Evol. Biol.*, 7: 227-245.
- CACCONE A., MILINKOVITCH M.C., SBORDONI V., POWELL J.R. 1997 - Mitochondrial DNA rates and biogeography in European newts (genus *Euproctus*). *Syst. Biol.*, 46: 126-144.
- CULVER C.D., KANE T.C., FONG D.W. 1995 - Adaptation and natural selection in caves. The evolution of *Gammarus minus*. Harvard University Press. Cambridge. London.
- DE MATTHAEIS E., ALLEGRUCCI G., CACCONE A., CESARONI D., COBOLLI SBORDONI M., SBORDONI V. 1983 - Genetic differentiation between *Penaeus kerathurus* and *P. japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 12: 191-197.
- DEELEMEN-REINHOLD C.L. 1965 - Contribution à la connaissance du genre *Asellus* en Yougoslavie et en Turquie. *Zool. Meded., Leiden*, 40: 151-170.
- DOLLFUS A., 1892c. Notes sur les Isopodes Terrestres et fluviatiles de Syrie recueillis principalement par M. le Dr. Th. Barrois. *Rev. Biol. Nord France* 4:1-15, plates III-IV; Lille.
- ESU D., KOTSAKIS T. 1983 - Les vertébrés et les mollusques continentaux du Tertiaire de la Sardaigne: Paleobiogéographie et biostratigraphie. *Geol. Rom.*, 22: 177-206.
- HEDGECOCK D., TRACEY M.L., NELSON K. 1982 - Genetics. In: D.E. Bliss (ed.), *The Biology of Crustacea*. Vol. 2. Academic Press. London.
- HENRY J.P., MAGNIEZ G. 1970 - Contribution à la systématique des Asellides (Crustacea, Isopoda). *Ann. Spéleol.*, 25: 335-367.

- HENRY J.P., MAGNIEZ G. 1992 - Evenements quaternaires en Europe et repartition des Asellotes stygobies. Mém. Biospéol., 19: 121-126.
- HERHAUS K.F. 1977 - Die verbreitung von *Proasellus coxalis* (Dollfus, 1892) (Crustacea, Isopoda, Asellidae) in Mitteleuropa. Zool. Anz. Jena, 199: 314-324.
- KETMAIER V. 1998 - Livelli di divergenza e variabilità genetica in popolazioni epigee ed ipogee di Isopodi Aselloidei. Tesi di Dottorato, Dottorato di Ricerca in Biologia Animale, X Ciclo, Università degli Studi di Roma "La Sapienza".
- KETMAIER V., ARGANO R., COBOLLI M., DE MATTHAEIS E., MESSANA G., 1996 Biochemical systematics and biogeography: dating the divergence time between *Stenasellus* species (Crustacea, Isopoda, Asellota). 2nd Europ. Crustacean Conference. (Liege, Belgium, 2-6/9/1996): 7
- KETMAIER V., ARGANO R., COBOLLI M., DE MATTHAEIS E., MESSANA G., 1997 - Genetic divergence and evolutionary rates: calibrating a molecular clock for southern european *Stenasellus* species (Isopoda, Stenasellidae). XIII Int. Symp. Biospeleology. (Marocco, Marrakesh, 20-27/4/ 1997): 45
- MAGNIEZ G. 1974 - Données faunistiques et ecologiques sur les Stenasellidae (Crustacea Isopoda Asellota des eaux souterraines). Int J. Speleol., 6: 1-80.
- MAGNIEZ G. 1981 - Biogeographical and paleogeographical problems in Stenasellids (Crustacea Isopoda Asellota of underground waters). Int. J. Speleol., 11: 71-82.
- MAGNIEZ G. 1996 - Histoire des Stenasellidae Ibero-Aquitains (Crustacea Isopoda Asellota, Aselloidea). Mém. Biospéol., 23: 173-179.
- MANICASTRI C., BALDARI F., ARGANO R. 1983 - Aspetti biogeografici del popolamento isopodologico della Sardegna. Lav. Soc. It. Biogeogr., 8: 251-269.
- MESSANA G., COBOLLI M., DE MATTHAEIS E., KETMAIER V., ARGANO R. 1995 - A preliminary essay on the biogeography of Italian Stenasellids (Crustacea, Isopoda, Asellota). Mém. Biospéol., 22: 20- 26.
- MOROLI M. 1992 - Uno studio morfometrico multivariato della variazione in *Proasellus coxalis* (Dollfus, 1892) (Crustacea, Isopoda, Asellota). Tesi di Dottorato, Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica, IV Ciclo, Università degli Studi di Roma "La Sapienza".
- NEI M. 1978 - Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
- PESCE L., ARGANO R. 1980 - Nouvelles données sur les Asellides de la Grèce Continentale et Insulaire. Bull. Zool. Mus. Univ. Amsterdam, 7: 49-59.
- PRACCHI R. e TERROSU ASOLE A. 1971 - Atlante della Sardegna. La Zattera Editrice. Cagliari.
- RACOVITZA E.G. 1919 - Notes sur les Isopodes. 3. *Asellus banyulensis* n. sp. 4. *Asellus coxalis* Dollfus 5. *A. coxalis peyerimboffi* n. subsp. Arch. Zool. exp. gen., 58 (N.R.): 49-77.
- RAZZAUTI A., 1925. Sopra un nuovo crostaceo troglobio italiano (*S. Racovitzai* sp.n.). Comunicazione preliminare. Atti e Memorie della R. Acad. Petrarca di Sc. Lett. ed Arti in Arezzo (n.s.) 5 (1): 27-28
- SBORDONI V., COBOLLI SBORDONI M., DE MATTHAEIS E. 1979 - Divergenza genetica tra popolazioni e specie ipogee ed epigee di *Nipargus* (Crustacea, Amphipoda). Lav. Soc. It. Biogeogr., 4: 1-23.
- STEWART B.A. 1993 - The use of protein electrophoresis for determining species boundaries in amphipods. Proceedings of the First European Crustacean Conference. Crustaceana, 65: 265-277.
- STOCH F. 1989 - Il gruppo *pavani* del genere *Proasellus* (Crustacea, Isopoda) in Italia: considerazioni tassonomiche e filogenetiche. Gortania - Atti Mus. Friul. Storia Nat., 10: 163-192.
- THORPE J.P. 1983 - Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separation. In: G.S. Oxford, D. Rollinson (eds.), Protein polymorphisms: adaptive and taxonomic significance. Academic Press. London.
- WILSON G.D.F. 1987 - The road to Janiroidea: comparative morphology and evolution of the asellote isopod crustaceans. Z. zool. Syst. Evol.-forsch., 25: 257-280.