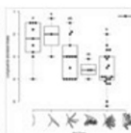
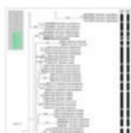


Documenti più visitati

Documenti ad alto accesso

Redattori più attivi



Arthropod Systematics & Phylogeny 81, 2023, 801–818 | DOI 10.3897/asp.81.e106948

801

SENCKENBERG
world of biodiversity

Two new subterranean *Typhlonesticus* (Araneae: Nesticidae) from the Alps with notes on their ecology, distribution and conservation

Marco Isaia^{1,2}, Giuseppe Nicolosi¹, Alessandro Infuso¹, Carles Ribera³¹ Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Turin, Via Accademia Albertina 13, 10123 Torino, Italy² National Biodiversity Future Center, Palermo 90133, Italy³ Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals and Institut de Recerca de la Biodiversitat, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain<https://zoobank.org/F295E683-AA9E-498C-B44F-3EB6B3721CA5>

Corresponding author: Marco Isaia (marco.isaia@unito.it)

Received 25 May 2023

Accepted 02 August 2023

Published 02 November 2023

Academic Editors Lorenzo Prendini, Klaus-Dieter Klass

Citation: Isaia M, Nicolosi G, Infuso A, Ribera C (2023) Two new subterranean *Typhlonesticus* (Araneae: Nesticidae) from the Alps with notes on their ecology, distribution and conservation. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 81: 801–818. <https://doi.org/10.3897/asp.81.e106948>

Due nuovi *Typhlonesticus* sotterranei (Araneae : Nesticidae) delle Alpi con note sulla loro ecologia, distribuzione e conservazione

▼ Marco Isaia , Giuseppe Nicolosi , Alessandro Infuso , Carles Ribera

Riassunto

Il genere di ragni *Typhlonesticus* Kulczyński, 1914 (Araneae : Nesticidae) comprende sette specie, la maggior parte delle quali mostra una stretta preferenza per le grotte, le miniere abbandonate e altri habitat sotterranei. In Italia il genere è rappresentato da due specie: *T. morisii* (Brignoli, 1975), una specie endemica delle Alpi sud-occidentali estremamente ristretta con un altissimo livello di adattamento sotterraneo e *T. idriacus* (Roewer, 1931), che mostra una specie molto più ampia distribuzione nel NE-Italia e scarsi adattamenti alla vita sotterranea. Le nostre recenti indagini biospeleologiche nelle Alpi hanno portato alla scoperta di nuove popolazioni di *Typhlonesticus* altamente troglomorfo che, sulla base di dati morfologici e molecolari, hanno dimostrato di appartenere a due nuove specie. Considerando la rarità di queste nuove specie, forniamo informazioni generali sulla loro ecologia e distribuzione, inclusa un'analisi comparativa dei tratti troglomorfi del *Typhlonesticus* in relazione a fattori biogeografici. Vengono inoltre fornite informazioni sullo stato di conservazione, utili per valutarne il rischio di estinzione sulla base delle linee guida dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN).

Parole chiave: Fauna sotterranea alpina, Biogeografia, Specie endemiche, Rischio di estinzione, Sistematica, Troglomorfismo

1. Introduzione

Il genere *Typhlonesticus* Kulczyński, 1914 (Araneae : Nesticidae) comprende attualmente sette specie di ragni cavernicoli, la maggior parte dei quali caratterizzati da un elevato livello di adattamento alla vita sotterranea. Date le loro preferenze di habitat, la maggior parte delle specie mostra distribuzioni strette, in alcuni casi addirittura puntiformi. Il genere è distribuito principalmente in Europa con sei specie, più una specie americana che è stata recentemente trasferita a *Typhlonesticus* da Ribera e Dimitrov (2023) (Catalogo World Spider, 2023). Il genere *Typhlonesticus* , così come attualmente definito, non dispone attualmente di una diagnosi morfologica esaustiva, essendo le uniche informazioni disponibili rinvenute in Kulczyński (1914: 379) “Nestico valde affine, differt ab eo defectu oculorum”. Un elenco di caratteri utili a delimitare il genere è stato successivamente fornito da Lehtinen e Saaristo (1980: 50), che designò *T. absoloni* Kratochvíl, 1933 come specie tipo.

Secondo l'ultima panoramica dei ragni sotterranei europei (Mammola et al. 2018a), tutte le specie europee di *Typhlonesticus* sono troglobionti obbligati, trovandosi esclusivamente in ambienti sotterranei. Questa preferenza ecologica è parallela a una serie di adattamenti morfologici e fisiologici all'ambiente sotterraneo (cioè, troglomorfismo; vedi Christiansen 2012) riguardanti, tra l'altro, dimensioni, allungamento delle gambe, perdita di pigmentazione e regressione degli occhi. Per quanto riguarda *Typhlonesticus* , il troglomorfismo è particolarmente sviluppato in *T. absoloni* (Kratochvíl, 1933), *T. obcaecatus* (Simon, 1907), *T. parvus* Kulczyński, 1914, *T. gocmeni* Ribera, Elverici, Kunt e Özkütük, 2014 e *T. morisii* (Brignoli, 1975), mentre in *T. idriacus* (Roewer, 1931) e *T. silvestrii* (Fage, 1929) i caratteri troglomorfi sono molto meno pronunciati.

Nelle Alpi il genere è rappresentato da *T. morisii* e *T. idriacus* . *T. morisii* è stato descritto su materiale raccolto negli anni '70 da Angelo Morisi nel bunker militare di Vernante (provincia di Cuneo, Piemonte, Alpi sud-occidentali), un sito sotterraneo artificiale rinomato tra i biospeleologi locali per ospitare un notevole assemblaggio di specie sotterranee altamente specializzate e per essere la località tipo di numerose specie endemiche di artropodi troglobi (Isaia et al. 2011). Secondo la descrizione originale (Brignoli 1975: 29), *T. morisii* presenta occhi completamente depigmentati e appena visibili (“occhi depigmentati, appena

visibili”). La specie è rimasta non segnalata fino agli anni 2000, quando è stata più volte raccolta nella località tipo (Arnò e Lana 2005;Isaia et al. 2007,2011). Nel 2017 abbiamo segnalato cinque nuovi record (Isaia et al. 2017) in diverse località delle Alpi sud-occidentali, ampliando l'areale della specie alla Provincia di Imperia (Liguria) e al Dipartimento delle Alpi Marittime (Francia). Rispetto a *T. morisii* e ad altre specie europee, l'altro *Typhlonesticus* italiano, *T. idriacus*, mostra adattamenti sotterranei meno pronunciati e un areale molto più ampio, coprendo un'area dal Lago di Garda a ovest fino a Trieste (NE-Italia), Idrija (NW - Slovenia) e Carinzia (Austria) ad est (Pantini e Isaia 2019). La specie è attualmente segnalata in 14 località. Il ritrovamento di una femmina appartenente ad una specie non descritta di *Typhlonesticus* nelle Alpi Centrali ed i primi risultati di un'analisi filogenetica comprendente materiale di *T. morisii* hanno stimolato le nostre approfondite ricerche biospeleologiche nelle Prealpi bergamasche (Lombardia) ed un dettagliato riesame delle specie materiale di *Typhlonesticus* disponibile nelle collezioni MI e MCSNB. Di conseguenza, forniamo qui la descrizione di due nuove specie di *Typhlonesticus* e un'analisi comparativa dei tratti troglomorfi in relazione all'estensione e all'intervallo altimetrico all'interno del genere. Parallelamente, considerata la rarità delle specie *Typhlonesticus* in Italia, forniamo anche alcune informazioni generali sull'ecologia e sullo stato di conservazione delle nuove specie, compresi dettagli utili per la valutazione del loro rischio di estinzione secondo le Categorie e i Criteri della Lista Rossa dell'Organizzazione Internazionale Unione per la Conservazione della Natura (IUCN 2001, 2012).

2. Metodi

2.1. Analisi molecolare

2.1.1. Campionamento, estrazione del DNA, amplificazione PCR e sequenziamento

La nostra analisi include tutte le specie attualmente accettate del genere *Typhlonesticus* insieme ai rappresentanti di tutti i generi europei di Nesticidi utilizzati come outgroup. Tutti gli esemplari della nuova specie sono stati raccolti sul campo, conservati direttamente in etanolo al 96% o assoluto e conservati a – 20°C. Il DNA genomico totale è stato estratto dal tessuto delle gambe o del torace utilizzando il kit EZNA® Tissue DNA (V-Spin) (Omega Bio-tek) seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione del DNA è stata misurata mediante fluorimetria (Qubit HS dsDNA Assay, Thermo Fisher Scientific, CA). Frammenti parziali di cinque geni, due mitocondriali – subunità I del citocromo c ossidasi (*cox1*) e 16S rRNA (16S) – e tre nucleari – 18S rRNA (18S), 28S rRNA (28S) e istone H3 (H3) – sono stati amplificati e sequenziati utilizzando i primer elencati nella Tabella dei materiali supplementari S1.

Le reazioni PCR sono state condotte con un volume finale di 20 µL utilizzando MyRed Taq Polymerase (Bioline Inc). I prodotti della PCR sono stati sequenziati in cicli in entrambe le direzioni utilizzando gli stessi primer per PCR. Il sequenziamento è stato eseguito presso il centro di sequenziamento MacroGen di Madrid.

I cromatogrammi sono stati modificati e assemblati con Geneious v. 10.0.9 (<https://geneious.com>).

Tutte le sequenze appena generate sono state depositate in GenBank (vedere la Tabella dei materiali supplementari S2 per i numeri di accesso).

2.1.2. Allineamento e selezione del modello evolutivo

L'allineamento di *cox1* e H3 era banale, dato che i frammenti amplificati non mostravano inserzioni/eliminazioni e quindi le sequenze venivano aggiustate manualmente. Abbiamo tradotto le sequenze in amminoacidi e controllato i codoni di stop per evitare errori di sequenziamento/modifica. Per i frammenti del gene ribosomiale, abbiamo eseguito allineamenti utilizzando la versione online di Mafft (Katoh e Toh 2008) utilizzando l'algoritmo G-INS-i con opzioni predefinite.

I migliori schemi di partizionamento e modelli di sostituzione per RAxML sono stati esplorati utilizzando PartitionFinder v.1.0.1 (Lanfear et al. 2012). Abbiamo suddiviso i dati in base alla posizione del codone (nel caso dei due geni codificanti proteine) ed esplorato simultaneamente il miglior schema di partizionamento e i modelli di sostituzione utilizzando l'algoritmo All euristico. Il criterio informativo bayesiano è stato utilizzato per selezionare il miglior schema di partizione e i corrispondenti modelli più adatti.

2.1.3. Analisi filogenetiche

Le analisi di massima verosimiglianza sono state effettuate nel programma informatico RAxML 7.4.2 (Stamatakis 2006) attraverso il front-end grafico RAxML-GUI 1.3 (Silvestro e Michalak 2012) applicando lo schema di partizione e i modelli di evoluzione molecolare selezionati da PartitionFinder. Un modello di sostituzione nucleotidica GTR+G+I è stato applicato a ciascuna delle partizioni corrispondenti al miglior schema di partizione selezionato. Il supporto nodale è stato valutato utilizzando la massima verosimiglianza più un bootstrap approfondito in 10 esecuzioni con 1000 repliche. L'albero filogenetico grafico è stato generato e modificato con il software FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

2.2. Tassonomia

2.2.1. Campionamento taxon e studio morfologico

I campioni del nuovo *Typhlonesticus* utilizzati nello studio morfologico sono stati raccolti sul campo e conservati direttamente in etanolo al 70%. Le fotografie sono immagini multifocus Z-stack scattate con una fotocamera Flexacam C1 montata su un microscopio binoculare stereoscopico Leica Stereozoom S8 APO. I campioni sono stati esaminati e misurati utilizzando un binocolo stereoscopico Leica M80 con ingrandimento fino a 60x collegato a una fotocamera EC3. Tutte le misure sono espresse in mm.

La vulva femminile è stata rimossa e trattata con KOH al 10% prima dell'esame. Dopo l'osservazione e i disegni, la vulva è stata lavata in acido acetico (5%) e successivamente conservata in etanolo al 70% in una microfiala contenuta nella stessa provetta contenente il campione. Tutte le strutture maschili illustrate provengono dal lato sinistro. Noi seguiamo Coyle e McGarity (1992) per descrivere il paracymbium e Huber (1993) e Agnarsson et al. (2007) per altre parti degli organi copulatori maschili e femminili.

Vengono effettuate le misurazioni dei tratti troglomorfi (diametro degli occhi mediani anteriori e allungamento del femore). Mammola et al. (2022) e verificati sia su pubblicazioni originali che su materiale originale disponibile nelle collezioni MI, CRBA e MCSNB. L'allungamento del femore l viene misurato come il rapporto tra la lunghezza del femore l e la dimensione corporea delle femmine.

2.2.2 Depositaro

Gli olotipi sono depositati presso il Museo Civico di Scienze Naturali "E. Caffi" (Bergamo, Italia) (MCSNB), paratipi e altri materiali sono conservati presso la collezione di Marco Isaia presso il Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi dell'Università di Torino (CI). Inoltre, abbiamo esaminato l'olotipo di *T. morisii*, conservato presso il Museo di Storia Naturale di Verona (MSNV), e il materiale di *T. idriacus* conservato presso il Centre de Recursos de Biodiversitat Animal (CRBA).

2.2.3. Conservazione e biogeografia

Segue la descrizione dello stato di conservazione e le informazioni di base per la valutazione della Lista Rossa IUCN per le Categorie e i Criteri della Lista Rossa dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN 2001, 2012).

Il calcolo dell'estensione dell'occorrenza (EOO) e dell'intervallo altimetrico di tutte le specie di *Typhlonesticus* (Tabella 1) si basa sulle occorrenze disponibili in letteratura (vedi legenda tabella), successivamente elaborate in ambiente GIS. I codici catastali speleologici delle grotte sono riportati tra parentesi quadre ['codice regionale' e 'numero'], e le coordinate delle località sono indicate in gradi decimali (dato WGS84). Ci riferiamo a SOUISA (Marrazzi 2005) per la classificazione geografica delle Alpi.

		Troglomorphic traits			Biogeographic features			References
		Body size	Fem I elongation	Diameter of anterior median eyes	EOO	Alti-metric range	Number of occurrences	
<i>T. absoloni</i> (Kratochvil, 1933)*	Montenegro	5,750	1,096	0,001	30	200	5	Kulczyński (1914, 1933, 1934, 1939); Deeleman-Reinhold (1974)
<i>T. angelicus</i> sp. nov.	SW-Alps (Italy and France)	4,605	0,933	0,035	103	931	4	This work
<i>T. gocmeni</i> Ribera, Elverici, Kunt & Özkütük, 2014	Turkey	3,240	0,914	0,001	2	0	1	Ribera et al. 2014
<i>T. idriacus</i> (Roewer, 1931)	E-Alps (Italy, Slovenia, Austria)	4,168	0,705	0,053	14078	1040	36	Thaler (1981); Dresco (1966); Roewer (1931); Gasparo (1996, 1997); Gasparo et al. (2001); Paoletti (1978); Brignoli (1972); Kostanjšek (2010); Kranjc, Novak (1977)
<i>T. morisii</i> (Brignoli, 1975)	SW-Alps	4,025	1,001	0,001	2	0	1	Isaia et al. (2011)
<i>T. obcaecatus</i> (Simon, 1907)	Spain	3,750	1,041	0,001	2	0	1	Ribera (1979)
<i>T. parvus</i> Kulczyński, 1914	Bosnia and Herzegovina	2,400	0,958	0,001	4	140	3	Kratochvil (1933, 1934); Brignoli (1971)
<i>T. santinellii</i> sp. nov.	Orobic Alps (Italy)	4,710	0,919	0,040	8	38	3	This work
<i>T. silvestrii</i> (Fage, 1929)*	E-USA	3,000	0,567	0,060	70000	2000	38	Gertsch (1984)

Tabella 1.

Tratti troglomorfi e caratteristiche biogeografiche dei ragni *Typhlonesticus*. Da qui derivano le dimensioni del corpo, l'allungamento del femore I e il diametro degli occhi mediani anteriori (Mammola et al. (2022)) e verificati su pubblicazioni originali e/o su materiale originale. Le misure degli olotipi vengono prese come riferimento. L'allungamento della gamba viene misurato come rapporto tra la lunghezza del femore I e la dimensione corporea delle femmine. Il calcolo dell'estensione dell'evento (EOO, km²) si basa sugli eventi presenti in letteratura (vedere riferimento corrispondente). * I valori dell'EOO e dell'intervallo altimetrico sono valori approssimativi, basati su eventi non esatti.

L'EOO e l'intervallo altimetrico sono stati entrambi trasformati in log per stabilizzare la varianza e correlati ai tratti troglomorfici (dimensioni del corpo, allungamento del femore I e diametro degli occhi mediani anteriori) tramite modelli lineari in ambiente R.

2.2.4. Abbreviazioni utilizzate nel testo e nelle illustrazioni

AER = fila oculare anteriore; ALE = occhi laterali anteriori; AME = occhi mediani anteriori; AOO = Area di occupazione; CI = Fondo Marco Isaia, Università di Torino; CRBA = Centre de Recursos de Biodiversitat Animal, Universitat de Barcelona; dp = processo dorsale del paracymbium; e = embolo; EOO = portata dell'occorrenza; FE = femore; id = condotto di inseminazione; ma = apofisi mediana; MCSNB = Museo Civico di Scienze Naturali "E. Caffi" (Bergamo, Italia); Me = metatarso; MI = collezione Marco Isaia presso il Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi dell'Università di Torino; MSNV = Museo di Storia Naturale di Verona; Pa = rotula; PER = fila oculare posteriore; PLE = occhi laterali posteriori; PME = occhi mediani posteriori; p = paracimbio; p1 = processo 1 del conduttore; p2 = processo 2 del conduttore; s = spermateca; st = sottotegulo; t = tegulo; Ta = tarso; Ti = tibia; vp = processo ventrale del paracymbium.

Le illustrazioni sono state realizzate da Alessandro Infuso direttamente sui campioni osservati allo stereomicroscopio.

3. Risultati

3.1. Dati molecolari

I campioni, le località e i numeri di accesso GenBank delle sequenze utilizzate in questo studio sono elencati nella Tabella S2. La matrice concatenata utilizzata nelle analisi era composta da 18 terminali e 3430 caratteri allineati (cox1 = 930, 16S = 489, H3 = 317, 18S = 820 e 28S = 874).

Il miglior schema di partizionamento selezionato con PartitionFinder secondo il criterio BIC comprende quattro partizioni:

cox1 1a e 2a^{posizione}, 16S, 18S e 28S; cox1 3a^{posizione} e H3 1a^{posizione}; H3 2^o posizione; H3 3a^{posizione}.

3.2. Analisi di massima verosimiglianza

Figura 1 mostra l'albero di massima verosimiglianza ottenuto con la matrice dei dati combinati. Le nuove specie si raggruppano tra le due specie geograficamente più vicine, *Typhlonesticus morisii* e *T. idriacus*, essendo *T. angelicus* sp. nov. le specie sorelle di *T. morisii* (supporto bootstrap 100%) e *T. santinellii* sp. nov. la specie sorella di entrambe (con un supporto bootstrap del 98%). *T. absoloni*, *T. obcaecatus* e *T. idriacus* sono scarsamente supportati (supporti bootstrap bassi), mentre l'insieme di queste sette specie costituisce un lignaggio evolutivo altamente supportato (supporto bootstrap = 100).

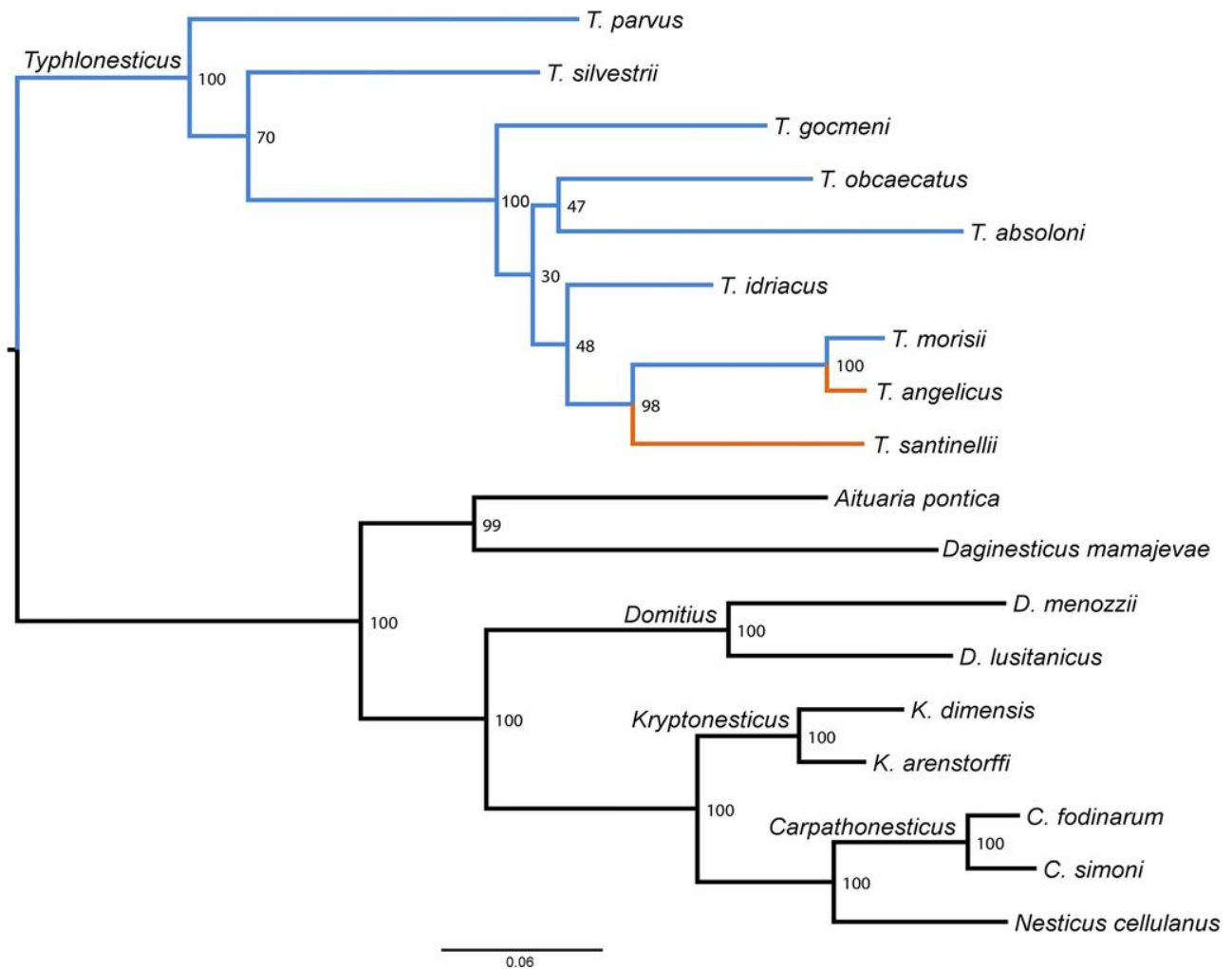


Figura 1.

Albero ML dedotto utilizzando la matrice di dati concatenata del mtDNA *cox1* e *rrnL* e dei frammenti del gene nuDNA H3, 18S e 28S. I numeri accanto ai nodi corrispondono ai valori di supporto bootstrap. Barra della scala: unità in sostituzioni nucleotidiche per sito.

3.3. Tassonomia

Famiglia *Nesticidae* Simon, 1894

Genere *Typhlonesticus* Kulczyński, 1914

3.3.1. *Typhlonesticus angelicus* Isaia e Ribera, sp. nov.

<https://zoobank.org/3B2E78D4-7FC3-4006-932D-364240633BA0>

Figura 2: A–E, 5A, C, 7°

Materiale esaminato

Olotipo: ITALIA, Piemonte, Provincia di Cuneo : Chiusa di Pesio, Grotta Superiore delle Camoscere [Pi 250], [44.2183°N](#), [7.6605°E](#) (Fig.7D), 1200 m slm, 3.XII.2018, Isaia M. e Mammola S. tappa. 1f (MCSNB) (sotto "*Typhlonesticus morisii*" in Isaia et al. 2017: 323). — Paratipi : stessa località dell'olotipo, 15.VII.1987, Comotti G. e Baldan A. leg. 1f (MCSNB) • 3.XII.2018, Isaia M. e Mammola S. gamba. 1 juv. (CI) • Liguria, Provincia di Imperia : Triora, Prospetto di Miniera del Monte Grai, [43.99650°N](#), [7.67296°E](#), 1878 m slm, 12.VIII.2016, Beikes S. e Isaia M. leg. 1f (CI) • Roccaforte Mondovì, Grotta dei Partigiani della Tura [Pi 286], [44.24081°N](#), [7.73308°E](#), 1780 m slm, 18.VIII.2016, Giachino PM e Lana E. leg. 1m • FRANCIA, Alpi Marittime : Brigue, Bunker Opera 34, Balconi di Marta, [44.01534N](#), [7.64178°E](#), 1914 m slm, 12.VIII.2016, Beikes S. e Isaia M. leg. 1m, 2juv. (CI) (tutto il materiale citato (sub "*Typhlonesticus morisii*" in Isaia et al. 2017: 323). — Altro materiale: ITALIA, Piemonte, Provincia di Cuneo : Roccaforte Mondovì, Grotta dei Partigiani della Tura [Pi 286], [44.24081°N](#), [7.73308°E](#), 1780 m slm, 22.V.2016, Chesta M. e Lana E. gamba. 1f (CI) • stessa località, 7.VI.2016, Chesta M. e Lana E. leg. 1m, 2f, 1 juv. (CI) • stessa località, 25.VI.2016, Chesta M. e Lana E. leg. 1f (CI) • stessa località, 18.VIII.2016, Giachino PM e Lana E. leg. 3m, 1juv. (CI) • Roccaforte Mondovì, Grotticella della Tura [Pi nc], nei pressi di Pi 286, 25.VI.2016, Chesta M. e Lana E. leg. 1f (CI) • stessa località, 12.VIII.2016, Chesta M. e Lana E. leg. 2m, 1f, 2juv. (CI) (tutto il materiale citato sub "*Typhlonesticus morisii*" in Isaia et al. 2017: 323).

Diagnosi

I maschi della nuova specie differiscono da *Typhlonesticus morisii* per la forma e la disposizione delle apofisi paracimbiali, principalmente quella ventrale, che è diritta in *T. angelicus* sp. nov. ("vp" nella Fig.2D, E) e piegato distalmente in *T. morisii* (Fig.4D, E). Sottili differenze si trovano anche nella forma dei processi p1 e p2 (Fig2D,5C) e la forma dell'apofisi mediana ("ma" nelle Figg2D,5C). — Femmine di *T. angelicus* sp. nov. sono meglio diagnosticati dall'orientamento dei condotti di inseminazione (Fig2A, B,5A), non ritorte e collegate direttamente alle spermateche ventralmente anziché dorsalmente, come in *T. morisii* (Figg.4A,B,5H).

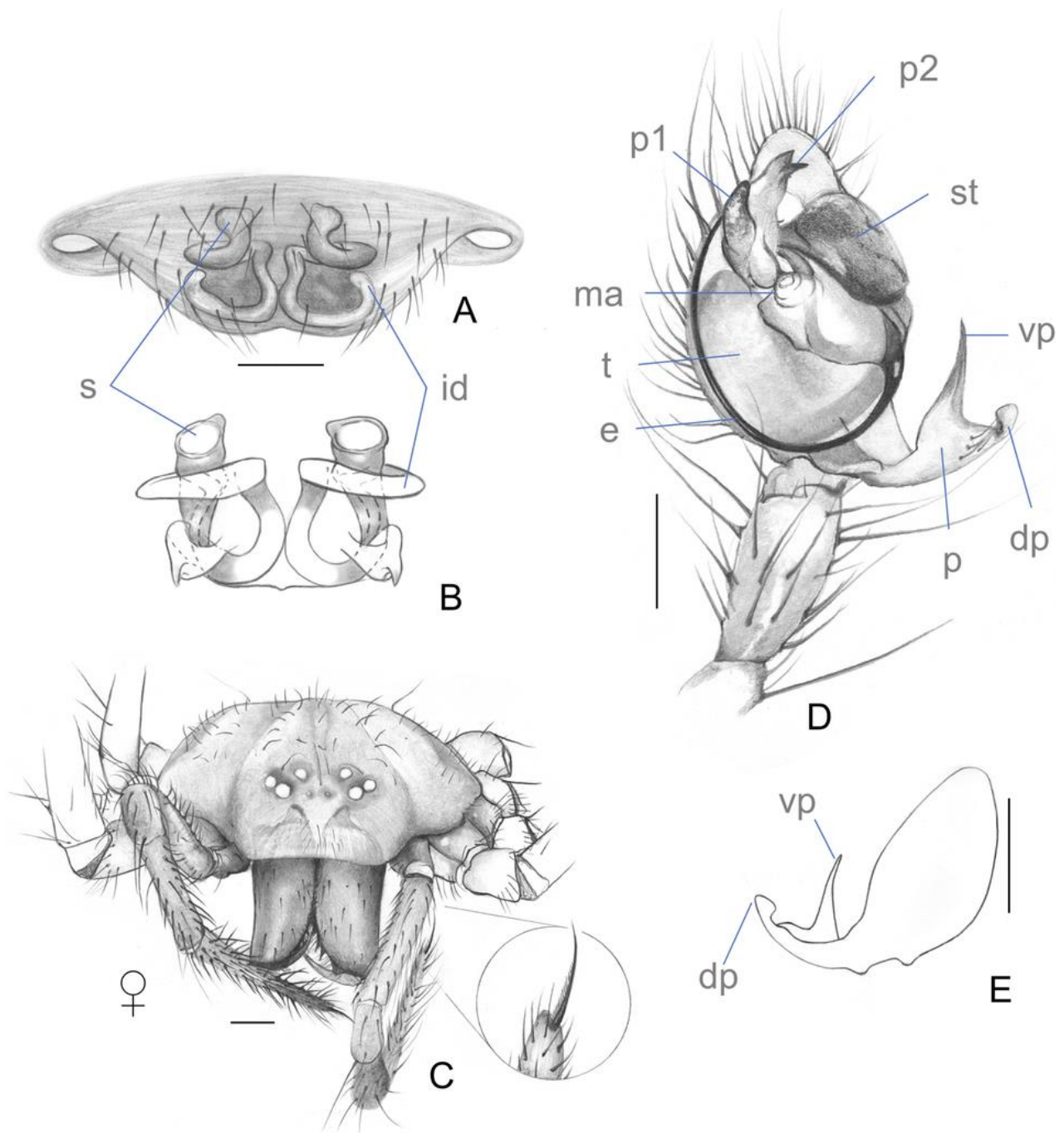


Figura 2.

Typhlonesticus angelicus sp. nov., olotipo femminile da Chiusa di Pesio, Grotta Superiore delle Camoscere [Pi 250] (Isaia M. e Mammola S. leg., 3.XII.2018) (A, B, C) e paratipo maschile da Grotta dei Partigiani della Tura [Pi 286] (Giachino PM e Lana E. leg., 18.VIII.2016) (D, E). Epigine in vista ventrale (A), vulva in vista dorsale (B), cefalotorace femminile in vista frontale (C), pedipalpo maschile sinistro in vista ventrale (D) e cymbium maschile in vista dorsale (E) (vedere sezione 2.2.3. per le abbreviazioni). Barre di scala 0,2 mm.

Descrizione della femmina

Olotipo femminile da Grotta superiore delle Camoscere [Pi 250], 3.XII.2018, Isaia M. e Mammola S. leg. — Colorazione : carapace giallo pallido. Regione della testa dello stesso colore. Sterno giallo bruno, senza disegno. Opistosoma grigio-bianco senza disegno. Zampe dello stesso colore del carapace. — Prosoma : carapace lungo 1,70, largo 1,42, regione cefalica non differenziata dal resto del carapace. Altezza del clipeo inferiore a AME 0,302. Labium tanto lungo quanto largo o moderatamente più largo che lungo. Sterno 0,97

lungo, 0,86 largo. Occhi ridotti e depigmentati, non sono visibili lenti corneali. Entrambe le file di occhi erano ricurve in vista dorsale PER 0,52 di larghezza, AER 0,36. AME ridotto ad una piccola macchia di pigmento. Diametro dell'occhio: AME 0,03, ALE 0,05; PME 0,05; PLE 0,05. — Opistosoma : lungo 2,37, largo 1,80. Lunghezza totale 4,07 (4,25 comprese filiere). Formula delle gambe: I>II>IV>III. Piastra epiginale lunga 0,35, larga 0,47. Epigino convesso e prominente, senza placche sclerotizzate (Fig2A,5A). Il bordo posteriore è leggermente sclerotizzato. Attraverso il tegumento si possono osservare le spermateche ed i condotti di inseminazione. Vulva semplice (Fig2B,5A), costituito da due piccole spermateche, dotti di inseminazione e fecondazione. I condotti di inseminazione si avvolgono a spirale, formando un giro attorno ai condotti di fecondazione prima di raggiungere la spermateca. Tasche vulvali assenti (Fig.2A, B). — Appendici : cheliceri lunghi 0,58, larghi 0,31, con 3 denti equidistanti sul promargine e 18-20 denti molto piccoli raggruppati sul retromargine. — Misure delle gambe : Gamba I: femore 4,13, rotula 0,82, tibia 4,01, metatarso 3,82, tarso 1,59, totale 14,37. Gamba II: femore 3,42, rotula 0,68, tibia 3,03, metatarso 2,99, tarso 1,31, totale 11,43. Gamba III: femore 2,63, rotula 0,59, tibia 2,05, metatarso 2,17, tarso 0,94, totale 8,39. Gamba IV: femore 3,63, rotula 0,75, tibia 3,07, metatarso 2,63, tarso 1,13, totale 11,21. Palpo: femore 1,07, rotula 0,32, tibia 0,63, tarso 1,09, totale 3,11.

Descrizione del paratipo maschile

Paratipo da Roccaforte Mondovì, Grotta dei Partigiani della Tura [Pi 286], 1780 m slm, [44.24081°N, 7.73308°E](#), 18.VIII.2016, Giachino PM e Lana E. leg. — Colorazione : carapace giallo bruno. Sterno giallo bruno, senza disegno. Regione della testa dello stesso colore. Opistosoma grigio-bianco senza disegno. Zampe dello stesso colore del prosoma, tutti i trocanteri dentellati. — Prosoma : carapace lungo 1,66, largo 1,54. Carapace approssimativamente circolare se visto dorsale. Regione cefalica non differenziata dal resto del carapace. Altezza del clipeo inferiore a AME 0,39. Labium tanto lungo quanto largo o moderatamente più largo che lungo. Sterno 1,07 lungo, 1,06 largo. Occhi ridotti e depigmentati. Nessuna lente corneale visibile. Entrambe le file di occhi erano ricurve in vista dorsale, larghezza PER 0,54, AER 0,31. Diametro dell'occhio: AME 0,04, ALE 0,05; PME 0,05; PLE 0,05. — Opistosoma : lungo 2,63, largo 1,50. Lunghezza totale 4,29 (4,51 comprese le filiere). Formula delle gambe: I>II>IV>III. — Appendici : cheliceri: lunghi 0,91, larghi 0,33, con 3 denti equidistanti sul promargine e 18-20 denti molto piccoli raggruppati sul retromargine. Formula delle gambe: I>II>IV>III — Palpo maschile (Fig.2D, E): Paracymbium corto, con processo ventrale ben sviluppato costituito da una lamella lunga e appiattita, incurvata verso l'apice e rastremata e da una dorsale costituita da una corta apofisi laminare, terminante con un lobo arrotondato ed ingrossato diretto verso quello ventrale (Fichi2D, E,5C). Complesso di conduttori con due processi ben sviluppati (p1 e p2): p1 più lungo che largo in vista laterale (Fig.5C), rastremata nel terzo distale; p2 è in posizione apicale e termina con due uncini apicali convergenti che fungono da conduttore per l'embolo. Embolo filamentoso che segue un andamento semicircolare verso l'apice e confinante con il tegulo (Fig2D,5C). Apofisi mediana larga e ben sviluppata, diretta ventralmente, più larga alla base e più stretta nella parte mediale-finale, a forma di cono con estremità smussata (Fig.2D). — Misure delle gambe : Gamba I: femore 4,57, rotula 0,79, tibia 4,66, metatarso 4,42, tarso 1,57, totale 16,01. Gamba II: femore 4,48, rotula 0,81, tibia 4,52, metatarso 4,35, tarso 1,52, totale 15,68. Gamba III: femore 3,25, rotula 0,74, tibia 2,74, metatarso 2,92, tarso 1,16, totale 10,81. Gamba IV: femore 4,42, rotula 0,80, tibia 3,97, metatarso 3,65, tarso 1,39, totale 14,23. Palpo: femore 1,16, rotula 0,28, tibia 0,44, tarso 0,75, totale 2,63.

Etimologia

La specie è dedicata ad Angelo Morisi (1943–2016) amatissimo naturalista piemontese, esperto di rettili, anfibi, invertebrati cavernicoli, macroinvertebrati d'acqua dolce, pesci e licheni. Angelo era uno scienziato naturalista di buon cuore, altruista e premuroso, pioniere della ricerca biospeleologica in Piemonte, e primo collezionista di numerose specie troglobionanti rare che portano ancora il suo nome, tra cui *Typhlonesticus morisii*, specie *sorella di T. angelicus sp. nov.* L'epiteto specifico è in forma di aggettivo e coniuga il nome di Angelo e le fattezze di benevoli esseri immortali dotati di un corpo di luce traslucido, appena visibile all'occhio umano.

Distribuzione, note di campionamento ed ecologia

Typhlonesticus angelicus sp. nov. è ristretto agli habitat sotterranei della porzione centrale delle Alpi del Marguareis, all'interno della sezione delle Alpi Liguri (Fig.6). Finora sono note cinque popolazioni isolate, che coprono un'area di circa 100 km² che si estende dall'alta Valle Maudagna (due popolazioni vicine) e dalla media Valle Pesio (una popolazione) a nord fino al confine con l'Italia e la Francia (due popolazioni). La popolazione di Balconi di Marta (Brigue), precedentemente assegnata a *T. morisii* e ora riassegnata a *T. angelicus*, rappresenta l'unica segnalazione di *Typhlonesticus* per la Francia, lasciando *T. morisii* come conosciuto unicamente per l'Italia (Vernante). Tutte le grotte si aprono in praterie alpine a 1.800–2.000 m s.l.m., ad eccezione della località tipo progettata Pi 250 – Grotta Superiore delle Camoscere (Val Pesio) (Fig.7D) che si apre al limite superiore di una faggeta, a circa 1.200 m slm — Diversi biospeleologi italiani di fama, tra cui lo stesso Angelo Morisi e Gianni Comotti, primo collezionista nella storia di un esemplare femminile di questa nuova specie, hanno visitato questa grotta attraverso tempi che portano alla scoperta di una straordinaria comunità altamente specializzata di artropodi endemici sotterranei, tra cui

Troglohyphantes vignai Brignoli, 1971 (Araneae: Linyphiidae),

Leptoneta crypticola Simon, 1907 (Araneae: Leptonetidae),

Holoscotolemon oreophilum Martens, 1978 (Opiliones: Travuniidae), (Isaia et al. 2011,2022)

e il raro coleottero sotterraneo

Agostinia launoi (Gestro, 1892) (Carabidae, Trechinae).

Individui di *T. angelicus* sp. nov. sono stati rinvenuti preferibilmente sulle pareti delle caverne e, in misura minore, sul suolo delle caverne, appesi a testa in giù sulla loro rete incrociata o camminando su rocce verticali (Fig.7A), per lo più nascosti nelle fessure delle rocce. Le femmine possono essere trovate durante tutto l'anno, mentre i maschi sembrano essere molto rari.

Tutte le grotte abitate da *T. angelicus* sp. nov. sono caratterizzati da un'umidità relativa costantemente elevata prossima alla saturazione. - *Typhlonesticus angelicus* sp. nov. preferisce la fascia montana medio alpina (media = 1.693 m; n = 4) e frequenta siti caratterizzati da temperature medie annuali comprese tra 4,1 e 9,1°C (media = 5,7°C; intervallo: 5,0; n = 4), più fredde di *T. morisii* si trova unicamente a Sotterranei di Vernante, dove la temperatura varia da 8,3 a 9,8°C durante l'anno.

Stato di conservazione e informazioni di base per una valutazione della Lista Rossa IUCN. Descrizione dell'intervallo, area di occupazione (AOO) ed estensione dell'occorrenza (EOO)

La specie è endemica delle Alpi del Marguareis in un range altimetrico di circa 700 m (quota min–max 1.200–1.914 m s.l.m.) (Fig.6). Finora sono conosciute cinque popolazioni (quattro se si considerano come una sola le due vicine località di Roccaforte Mondovì), comprendenti un AOO stimato di 16 km² e un EOO di 103 km². Deduciamo un declino sia dell'EOO che dell'AOO a causa del riscaldamento globale dovuto alla sensibilità dei troglobionti all'aumento della temperatura globale (vedi Mammola et al. 2019a). La capacità di dispersione di questa specie non è nota ma, dato l'elevato sviluppo dei caratteri troglomorfi e l'areale ristretto, si presume che sia molto bassa. — Località: nei criteri della Lista Rossa, "località" si riferisce ad un'area a rischio ed è diversa dalle nozioni generali di località. Il termine 'localizzazione', infatti, definisce un'area geograficamente o ecologicamente distinta nella quale un unico evento minaccioso può colpire rapidamente tutti gli individui del taxon presenti. Si prevede che il riscaldamento globale influenzerà tutte le popolazioni conosciute di *T. angelicus* sp. nov., di conseguenza, per la valutazione del rischio di questa specie dovrebbe essere presa in considerazione un'unica località. — Minacce: la specie è potenzialmente esposta a causa del suo areale di distribuzione geografica estremamente ristretto, della sua bassa capacità di dispersione e della sua presunta bassa tolleranza termica correlata all'alto livello di troglomorfismo. — Azioni di conservazione: considerato il riscaldamento globale in corso, è opportuno considerare il rischio di estinzione di *T. angelicus* sp. nov. Poiché si conosce molto poco sulla biologia e sul ciclo vitale di questa specie, ad oggi non è possibile fornire precise azioni gestionali. Tuttavia l'inserimento di questa specie nella Lista Rossa IUCN rappresenta un importante punto di partenza per la sua conservazione. Come visto per altri sistemi sotterranei di interesse conservazionistico per le specie elencate nella lista rossa e legalmente protette, tre grotte su cinque ospitano *T. angelicus* sp. nov. beneficiano dell'inclusione in aree protette o siti di importanza conservativa, vale a dire IT1160056 (Alpi Marittime) e IT1160057 (Alta Valle Pesio e Tanaro). — Nota sullo stato di conservazione in Francia: *T. morisii* è citato nello stato "CR" nella Lista rossa dei ragni in Francia dall'inizio

del 2023 (Bounias-Delacour et al., 2023). La sua nuova distribuzione e la sua sostituzione presso la località francese di Balconi di Marta con *T. angelicus*, conferirebbero a quest'ultimo lo stesso status in Francia.

3.3.2. *Typhlonesticus santinellii* Isaia e Ribera, sp. nov.

<https://zoobank.org/A5B798A7-3A15-4C06-AEC1-90FE8BF6F26F>

Figura 3: A–E, 5B, D, 7C

Materiale esaminato

Olotipo: ITALIA, Lombardia, Provincia di Bergamo: Oneta, Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo (Fig. 7G), 45.8833°N, 9.8243°E, 1.208 m slm, 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. 1 m (MCSNB). — Paratipi: ITALIA, Lombardia, Provincia di Bergamo: Oneta, Miniere di Gorno, Alpe Grem, Cantiere #7, 45.8862°N, 9.8235°E, 1.320 m slm, 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. gamba. 1f (CI) • Oneta, Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo (Fig. 7G), 45.8833°N, 9.8243°E, 1208 m slm, 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. 1f (MCSNB) • Monasterolo Castello, Grotta Murdosso [LoBG 7407] (Fig. 7H), 45.7474°N 9.9542°E, 1092 m slm, 12.V.2019, Santinelli R. gamba. 1f, 1 m subadulto (CI).

Diagnosi

I maschi di *Typhlonesticus santinellii* sp. nov. differiscono da *T. morisii* e *T. angelicus* sp. nov. dalla forma dei processi p1 e p2, la forma dell'apofisi mediana (Fig. 3D, 5 D) e dalla forma e disposizione delle apofisi paracimbiali, principalmente quella ventrale ("vp" in Fig. 3D, E), che è più corto e affusolato in *T. santinellii* sp. nov. che in *T. angelicus* sp. nov. e *T. morisii*. — La diagnosi migliore per le femmine è basata sull'orientamento dei condotti di inseminazione e sulla forma delle spermateche (Fig. 3A, B, 5B).

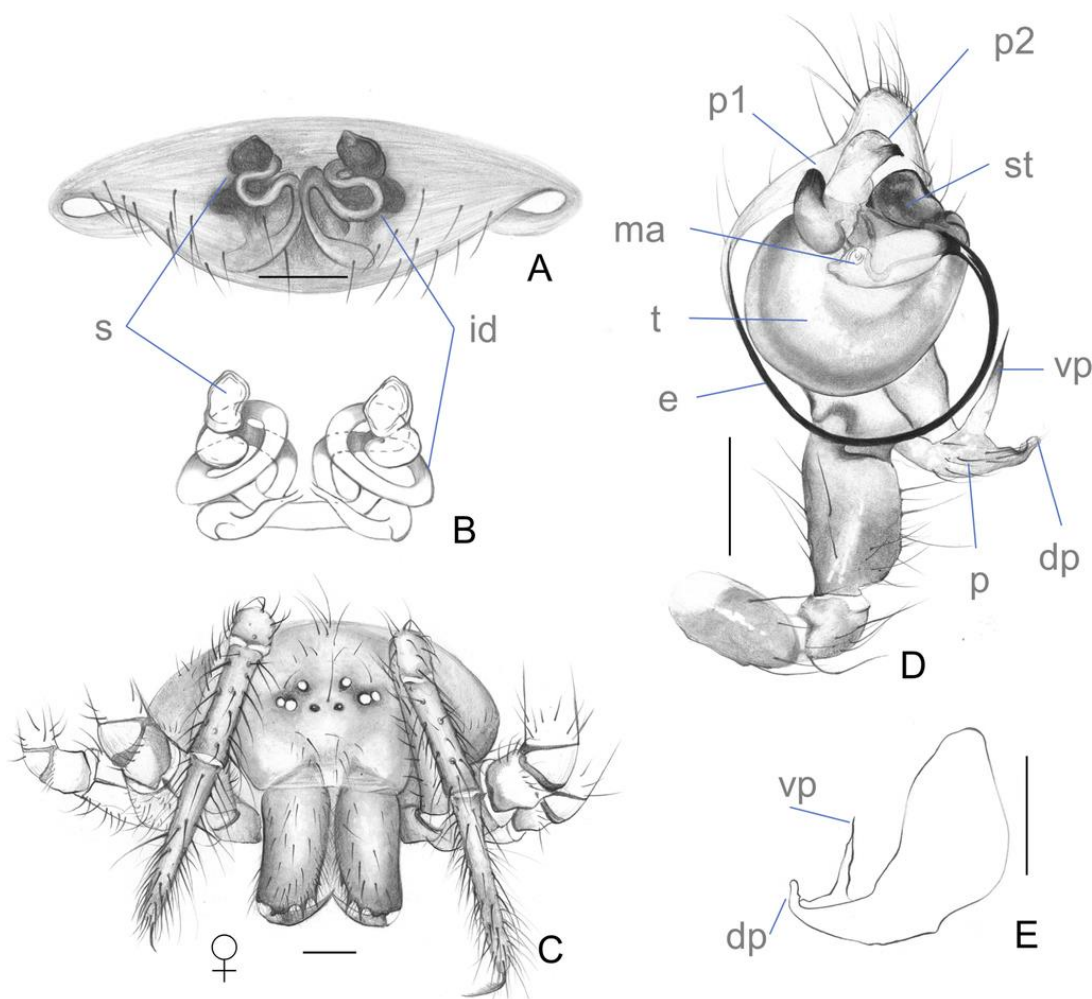


Figura 3.

Typhlonesticus santinellii sp. nov., paratipo femminile da Monasterolo Castello, Grotta Murdosso [LoBG 7407] (Santinelli R. leg., 12.V.2019) (A, B, C) e olotipo maschile da Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo (Falgarì N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg., 14.X.2022) (D, E). Epigine in vista ventrale (A), vulva in vista dorsale (B), cefalotorace femminile in vista frontale (C), pedipalpo maschile sinistro in vista ventrale (D) e cymbium maschile in vista dorsale (E) (vedere sezione 2.2.3. per le abbreviazioni). Barre di scala 0,2 mm.

Descrizione del maschio

Olotipo maschile da Miniere di Gorno, Galleria del Pozzo, [45.8833°N](#), [9.8243°E](#), 1208 m slm, 14.X.2022, Falgarì N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. — Colorazione : carapace giallo-marrone. Regione della testa dello stesso colore. Sterno giallo bruno, senza disegno. Opistosoma grigio-bianco senza disegno. Zampe dello stesso colore del prosoma, tutti i trocanteri dentellati. — Prosoma : carapace lungo 1,42, largo 1,30. Regione cefalica non differenziata dal resto del carapace. Altezza clipeo 0,32 (sotto AME). Labium tanto lungo quanto largo o moderatamente più largo che lungo. Sterno 0,88 lungo, 0,90 largo. Occhi ridotti e privi di pigmento, non sono visibili lenti corneali. Entrambe le file di occhi sono ricurve in vista dorsale (PER 0,43 di larghezza, AER 0,37), diametro degli occhi: AME 0,01, ALE 0,06; PME 0,05; PLE 0,06. — Opistosoma : lungo 1,84, largo 1,13. Lunghezza totale 3,26 (3,43 comprese le filiere). Formula delle gambe: I>II>IV>III. — Appendici : cheliceri: lunghi 0,72, larghi 0,30, con tre denti equidistanti sul promargine e 18-20 denti molto piccoli raggruppati sul retromargine. Palpo maschile (Figg3D, E,5 D): Paracymbium corto. Processo ventrale costituito da una lamella lunga ed appiattita, diritta, rastremata nella parte distale, terminante con una sottile spina, e da un processo dorsale poco sviluppato costituito da una breve apofisi laminare, ricurva perpendicolarmente all'apice, terminante con un lobo arrotondato. Complesso di conduttori con due processi ben sviluppati (p1 e p2): p1 è più lungo che largo, appuntito, si assottiglia lungo la sua lunghezza in vista laterale (Fig.3D,5 D); p2 è in posizione apicale e termina con due uncini quasi paralleli, che fungono da conduttore per l'embolo (Figg.3D,5 D). Embolo filamentoso che segue un andamento semicircolare verso l'apice e confinante con il tegulo (Fig3D,5 D). Apofisi mediana larga e ben sviluppata, diretta ventralmente, più larga alla base e più stretta nella parte mediale-finale, a forma di cono con estremità smussata. (Fichi3D,5 D). — Misure delle gambe : Gamba I: femore 5,23, rotula 0,76, tibia 5,36, metatarso 5,30, tarso 1,80, totale 18,45. Gamba II: femore 3,98, rotula 0,68, tibia 3,78, metatarso 3,69, tarso 1,39, totale 13,52. Gamba III: femore 3,96, rotula 0,65, tibia 3,32, metatarso 3,15, tarso 1,20, totale 12,28. Gamba IV: femore 3,99, rotula 0,66, tibia 3,77, metatarso 3,64, tarso 1,35, totale 13,41. Palpo: femore 1,02, rotula 0,24, tibia 0,31, tarso 0,84, totale 2,41.

Descrizione della femmina

Paratipo femminile da Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo, [45.8833°N](#), [9.8243°E](#), 1.208 m slm, 14.X.2022, Falgarì N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. gamba. — Colorazione : carapace giallo pallido. Regione della testa dello stesso colore. Sterno giallo bruno, senza disegno. Opistosoma grigio-bianco senza disegno. Gambe dello stesso colore del prosoma. — Prosoma : carapace lungo 1,51, largo 1,36, approssimativamente circolare nella vista dorsale. Regione cefalica non differenziata dal resto del carapace. Altezza clipeo sotto AME 0,29, sotto ALE 0,298. Labium tanto lungo quanto largo o moderatamente più largo che lungo. Sterno 0,79 lungo, 0,96 largo. Occhi ridotti e depigmentati, non sono visibili lenti corneali. Entrambe le file di occhi erano ricurve in vista dorsale, PER 0,49 di larghezza, AER 0,36. AME ridotto ad una piccola macchia di pigmento.

Diametro dell'occhio: AME 0,01, ALE 0,05; PME 0,06; PLE 0,06. - Opistosoma : lungo 2,01, largo 1,67. Lunghezza totale 3,52 (3,65 comprese le filiere). Formula delle gambe: I>II>IV>III. Placca epiginale lunga 0,30, larga 0,55, convessa e prominente, senza placche sclerotizzate (Figg.3A,5B). Il bordo posteriore è leggermente sclerotizzato. Attraverso il tegumento si possono osservare le spermateche ed i condotti di inseminazione. Vulva semplice (Figg3B,5B), costituito da due piccole spermateche romboedriche, dotti di inseminazione e fecondazione. I condotti di inseminazione si avvolgono a spirale, formando tre giri attorno ai condotti di fecondazione prima di raggiungere le spermateche (Fig.3A,B). — Appendici : cheliceri lunghi 0,76, larghi 0,28 con tre denti equidistanti sul promargine e 18-20 denti molto piccoli raggruppati sul retromargine. Gambe dello stesso colore del prosoma. — Misure delle gambe : Gamba I: femore 4,48, rotula 0,79, tibia 4,46, metatarso 4,12, tarso 1,59, totale 15,44. Gamba II: femore 3,52, rotula 0,74, tibia

3,11, metatarso 3,08, tarso 1,26, totale 11,71. Gamba III: femore 2,72, rotula 0,65, tibia 1,97, metatarso 2,19, tarso 0,99, totale 8,52. Gamba IV: femore 3,73, rotula 0,78, tibia 3,02, metatarso 2,74, tarso 1,19, totale 11,46. Palpo: femore 1,09, rotula 0,31, tibia 0,60, tarso 1,14, totale 3,14.

Etimologia

La specie è dedicata allo speleologo Roberto “Robertone” Santinelli, che per primo raccolse l'esemplare femminile nella grotta di Murdosso, consentendo la diagnosi della nuova specie. Sostantivo al genitivo.

Distribuzione, note di campionamento ed ecologia

Typhlonesticus santinellii sp. nov. è ristretta agli habitat sotterranei della porzione centrale delle Alpi Orobiche, all'interno della sezione delle Alpi e Prealpi Bergamasche (Marrazzi 2005) (Fico.6). Si conoscono finora tre popolazioni (due delle quali molto vicine tra loro), che coprono un'area inferiore a 5 km² nella Val del Riso, nei comuni di Monasterolo Castello (grotta di Murdosso) e Oneta (complesso minerario di Gorno), entrambi in provincia di Bergamo. La grotta di Murdosso si apre in un bosco di faggi nei pressi dei Colli di San Fermo. Il primo esemplare femminile è stato raccolto da Roberto Santinelli sotto grossi detriti rocciosi, durante le operazioni di disossamento della grotta condotte dai gruppi speleologici: Underland e I Tassi.. Nonostante diversi tentativi, non furono raccolti ulteriori esemplari nella grotta di Murdosso dopo la raccolta della prima femmina. Le due ulteriori occorrenze si riferiscono alle gallerie del complesso minerario abbandonato di Gorno, oggi “Ecomuseo delle miniere di Gorno”, museo etnologico dedicato al patrimonio culturale dell'attività mineraria in questa zona. Il maschio e alcuni altri esemplari sono stati raccolti durante la nostra spedizione biospeleologica nel complesso minerario guidato da Fabrizio Scolari (Ecomuseo delle miniere di Gorno) nell'ottobre 2022. Le gallerie in cui è stata rinvenuta la nuova specie si aprono nelle praterie alpine a 1.200-1.300 m asl. Gli individui di *T. santinellii* sp. nov. si trovavano preferibilmente sulle pareti delle caverne e tra le rocce vicino al suolo, appesi a testa in giù sulla loro rete incrociata. Le indagini presso il complesso minerario di Gorno sono iniziate su suggerimento di Marco Valle, Direttore del Museo Civico di Scienze Naturali di Bergamo che condusse alcune indagini biologiche nel complesso minerario di Gorno agli inizi degli anni '80, insieme al biospeleologo locale Gianni Comotti. Marco Valle notò che tra il materiale aracnologico raccolto durante quelle esplorazioni vi era un notevole nesticida, che fu inviato per esame a Konrad Thaler. Il materiale fu restituito da Thaler al Museo di Bergamo nel 1984, ad eccezione di una donna identificata come “*Nesticus* cf. *morisii*”, che venne conservato per ulteriori studi. Nonostante la nostra ricerca nella collezione Thaler e altrove, non siamo riusciti a localizzare tale materiale. Il recente ritrovamento della nuova specie nel complesso minerario di Gorno ha però confermato le prime impressioni di Marco Valle e Konrad Thaler. — *Typhlonesticus santinellii* sp. nov. è stato raccolto in una grotta naturale e nel complesso minerario di Gorno ad un'altitudine media di 1.206 m (n = 3) e frequenta siti con temperature medie annuali comprese tra 6,3 e 7,8°C (media = 7,0°C; range: 1,5; n = 3).

Stato di conservazione e informazioni di base per una valutazione della Lista Rossa IUCN. Descrizione dell'intervallo, area di occupazione (AOO) ed estensione dell'occorrenza (EOO)

La specie è endemica di un piccolo settore delle Alpi Orobiche che copre un range altimetrico di circa 250 m (quota min–max 1.092–1.320 m) (Fig.6). Finora sono note tre popolazioni (due se si considerano come una sola le due vicine popolazioni del complesso minerario di Gorno), comprendenti un EOO stimato di 4 km² e un AOO di 8 km². Analogamente a *T. angelicus* sp. nov., deduciamo un calo sia dell'EOO che dell'AOO a causa del riscaldamento globale. Si presume che abbia una capacità di dispersione molto bassa. — Località: si prevede che il riscaldamento globale colpirà tutte le popolazioni conosciute di *T. santinellii* sp. nov., di conseguenza, per la valutazione del rischio di questa specie dovrebbe essere presa in considerazione un'unica località. — Minacce: la specie è potenzialmente esposta a causa del suo areale di distribuzione geografica estremamente ristretto, della sua bassa capacità di dispersione e della sua bassa tolleranza termica correlata all'elevato livello di adattamento alla vita sotterranea. — Azioni di conservazione: alla luce del riscaldamento globale in corso, vale la pena considerare il rischio di estinzione di *T. santinellii* sp. nov. Per quanto riguarda *T. angelicus* sp. nov., non è possibile fornire azioni gestionali precise, ma l'inserimento nella Lista Rossa IUCN rappresenta un importante punto di partenza per la sua conservazione.

I siti sotterranei del complesso minerario di Gorno che ospitano *T. santinelli* sp. nov. beneficiano dell'inserimento nei siti di importanza conservativa, ovvero il SC IT2060009 Val Nossana – Cima di Grem, gestito dal Parco Regionale delle Orobie Bergamasche. L'attuale gestione del sito sotterraneo come attrazione turistica non sembra compromettere la sopravvivenza di questa specie.

3.3.3. *Typhlonesticus morisii* (Brignoli, 1975)

Fig. 4: A–E,5F, H,7B

Materiale esaminato

Olotipo: ITALIA, Piemonte, Provincia di Cuneo : Vernante, Sotterranei del Forte A di Vernante Opera 11, Tetto Ruinas [Art. Pi CN] (Fig.7E, F), [44.2524°N](#), [7.5276°E](#) , 800 m slm, 14.X.1972, Morisi A. leg. 1m (MSNV) (Brignoli 1975). — Altro materiale : stessa località dell'olotipo, 15.VI.2009, Isaia M. e Paschetta M. leg. 1 juv. (CI) (Isaia et al. 2011); 26.IV.2004, Lana E. e Arnò C. leg. 1f (CI) (Isaia et al. 2011); 25/03/2022, Isaia M. e Nicolosi G. gamba. 4f (CI).

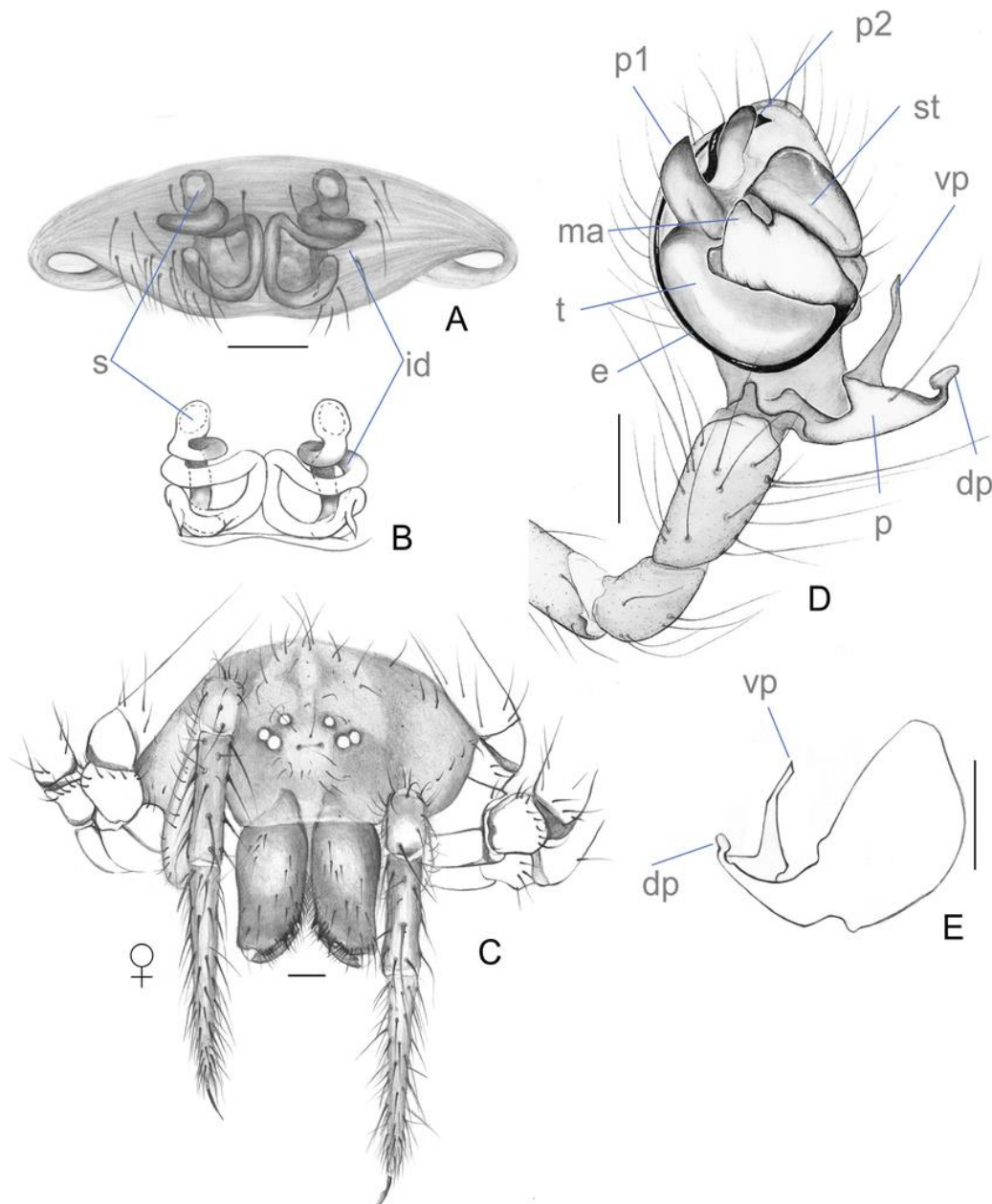


Figura 4.

Typhlonesticus morisii (Brignoli), femmina della località tipo, Vernante, Sotterranei del Forte A di Vernante Opera 11, Tetto Ruinas [Art. Pi CN] (Isaia M., Nicolosi G. leg., 25.III.2022) (CI) (A, B, C) e maschio olotipo della stessa località, Morisi A. leg., 14.X.1972 (D, E). Epigine in vista ventrale (A), vulva in vista dorsale (B), cefalotorace femminile in vista frontale (C), pedipalpo maschile sinistro in vista ventrale (D) e cymbium maschile in vista dorsale (E) (vedere sezione 2.2.3. per le abbreviazioni). Barre di scala 0,2 mm.

3.3.4. *Typhlonesticus idriacus* (Roewer, 1931)

Fig.5: E,G

Materiale esaminato

ITALIA, Friuli Venezia Giulia, Provincia di Udine : Nimis, Grotta di Pre Oreak, 46,24054°N, 13,2920°E, 285 m slm, 15.IX.2007, Lopez A. leg. 1f (CRBA).

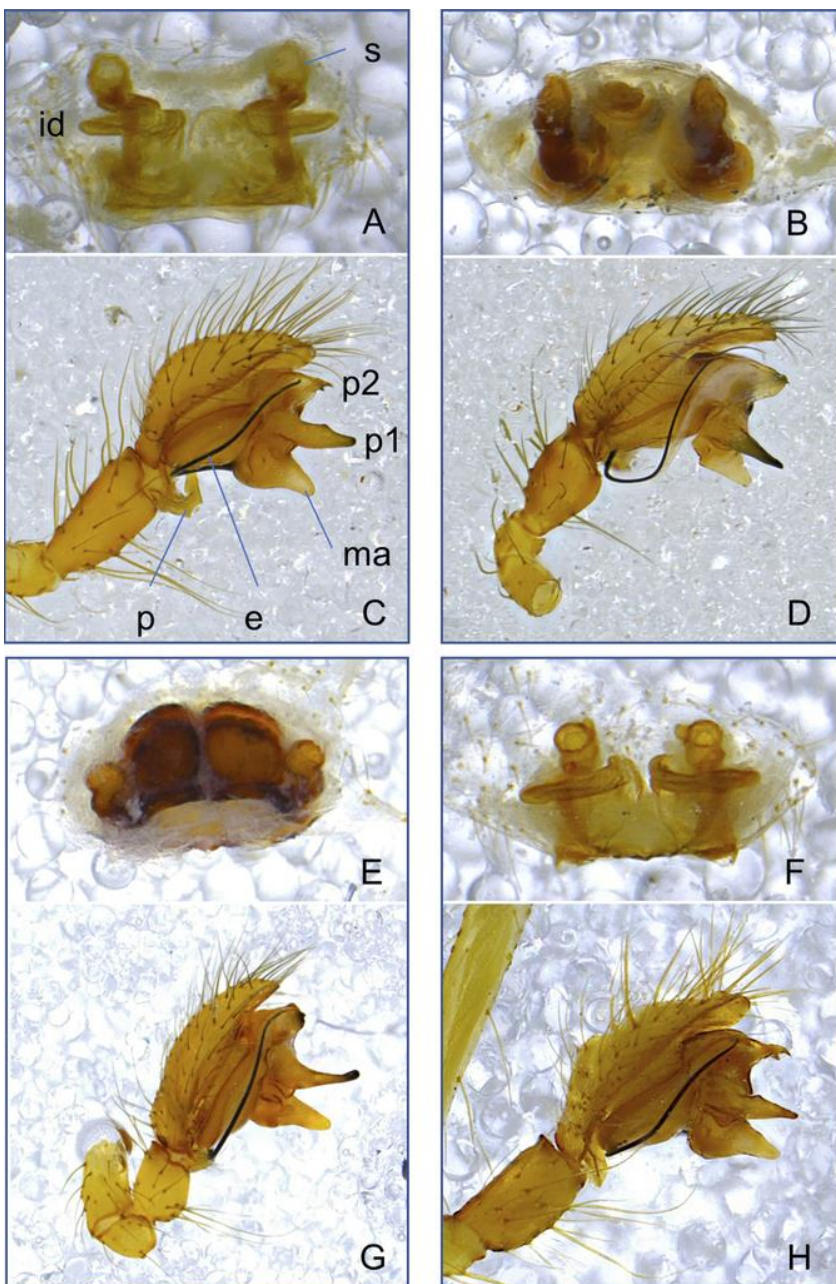


Figura 5.

Le quattro specie italiane di *Typhlonesticus* : fotografie delle vulve (A, B, E, F) e dei pedipalpi maschili di sinistra in vista prolaterale (C, D, G, H). A, C *Typhlonesticus angelicus* sp. nov. ; B, D *Typhlonesticus santinellii* sp. nov. ; E, G *Typhlonesticus idriacus* (Roew er); F, H : *Typhlonesticus morisii* (Brignoli).

3.4. Biogeografia e troglomorfo in *Typhlonesticus*

Un'analisi comparativa dei tratti troglomorfi e delle caratteristiche biogeografiche dei ragni *Typhlonesticus* è presentata nella tabella 1. *T. absoloni* (Montenegro) si distingue per il massimo allungamento delle zampe (> 1), la riduzione degli occhi (AME : 0,001 mm) e la massima dimensione corporea (5,750 mm). *T. morisii* e *T. obcaecatus* sono di dimensioni più piccole ma ugualmente notevoli in termini di allungamento delle zampe (> 1) e riduzione degli occhi (0,001 mm). D'altro canto, *T. silvestrii* e *T. idriacus* mostrano il livello più basso di troglomorfo, con occhi mediani anteriori più grandi (0,060 e 0,053, rispettivamente) e allungamento della parte inferiore della gamba (0,56 e 0,70 rispettivamente) all'interno del genere. Per quanto riguarda le due nuove specie, mostrano valori elevati di allungamento delle zampe (> 0,90) e di riduzione degli occhi (0,035 e 0,040).

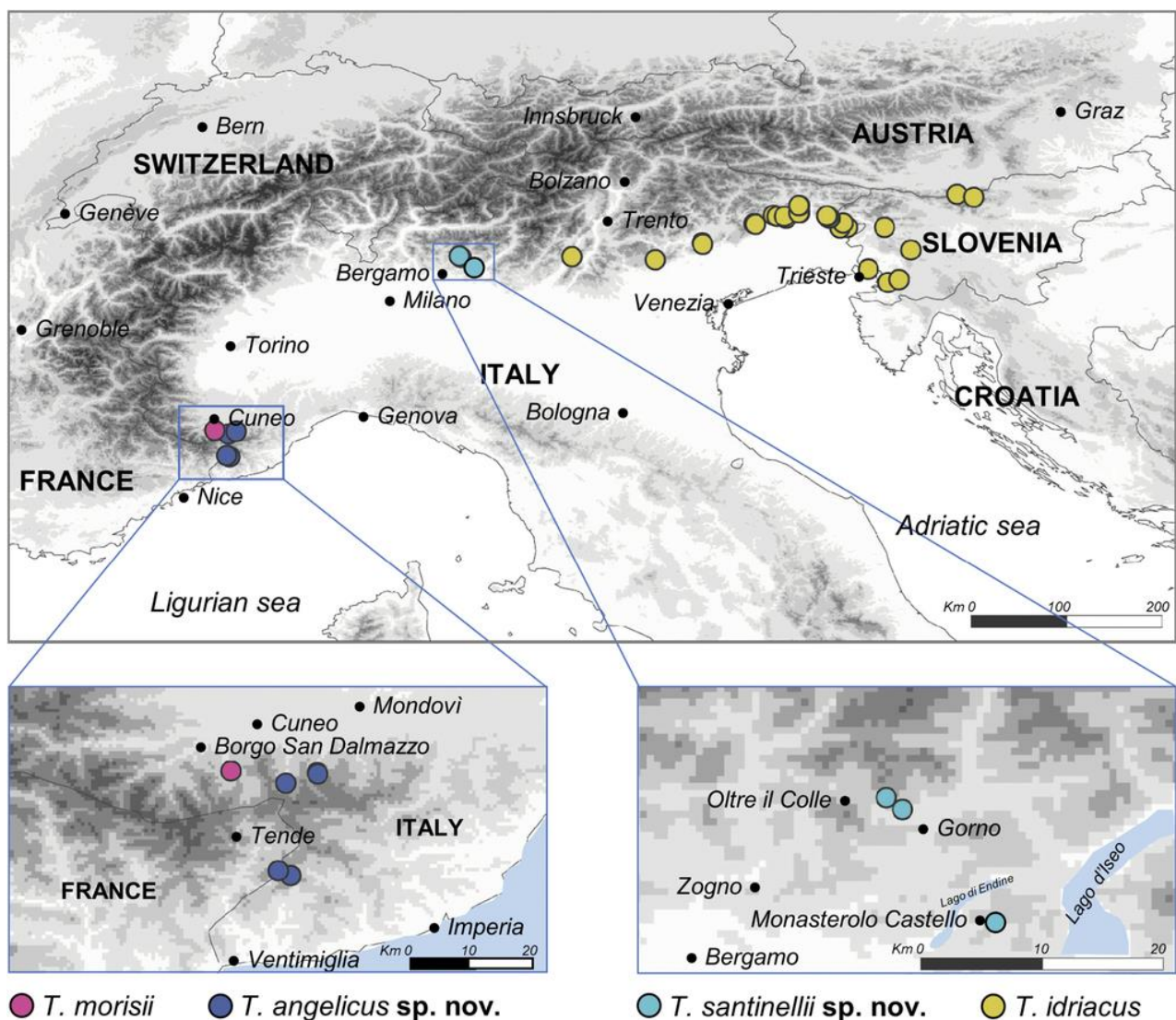


Figura 6.

Distribuzione del *Typhlonesticus* in Italia.



Figura 7.
 Esempari vivi di *Typhlonesticus angelicus* sp. nov. (Un maschio), *T. morisii* (Brignoli) (B femmina) e *T. santinelli* sp. nov. (C femmina) nei loro habitat naturali.

L'ingresso della Grotta superiore delle Camoscere [Pi 250], località tipo di *T. angelicus* sp. nov. (D), il bunker militare di Sotterranei di Vernante, località tipo di *T. morisii* (Brignoli) (E , F); le mura della Galleria del Pozzo all'interno del complesso minerario di Gorno, località tipo di *T. santinellii* sp. nov. (G); l'ingresso della grotta di Murdosso [Lo BG 7407], dove la prima femmina di *T. santinellii* sp. nov. è stato raccolto durante le operazioni di sbloccaggio della grotta condotte dai gruppi Underland e I Tassi (H).

Quando si mettono in relazione i tratti troglomorfi con le caratteristiche biogeografiche (Fig.8), abbiamo svelato una relazione positiva significativa tra l'entità dell'occorrenza e il diametro degli occhi mediani anteriori (Est: 0,0126; Std Err.: 0,0027; P: 0,0026**) e una relazione significativa inversa con l'allungamento della gamba (Est: -0,0840 ; Err. Std. 0,018; P: 0,0024**). La stessa tendenza è stata recuperata rapportando l'escursione altimetrica al diametro degli occhi mediani anteriori (Est: 0,0057; Std Err. 0,0020; P: 0,0275*). Non è stata recuperata alcuna relazione significativa quando si mette in relazione l'allungamento delle gambe con l'intervallo altimetrico (Est: -0,0298; Std Err. 0,0163; P: 0,1110 ns) o la dimensione del corpo con entrambi gli intervalli altimetrici (Est: 0,0379, Std Err. 0,1194; P: 0,7602 ns) ed entità dell'occorrenza (Est: -0,0160; Std Err. 0,2214; P: 0,9442 ns).

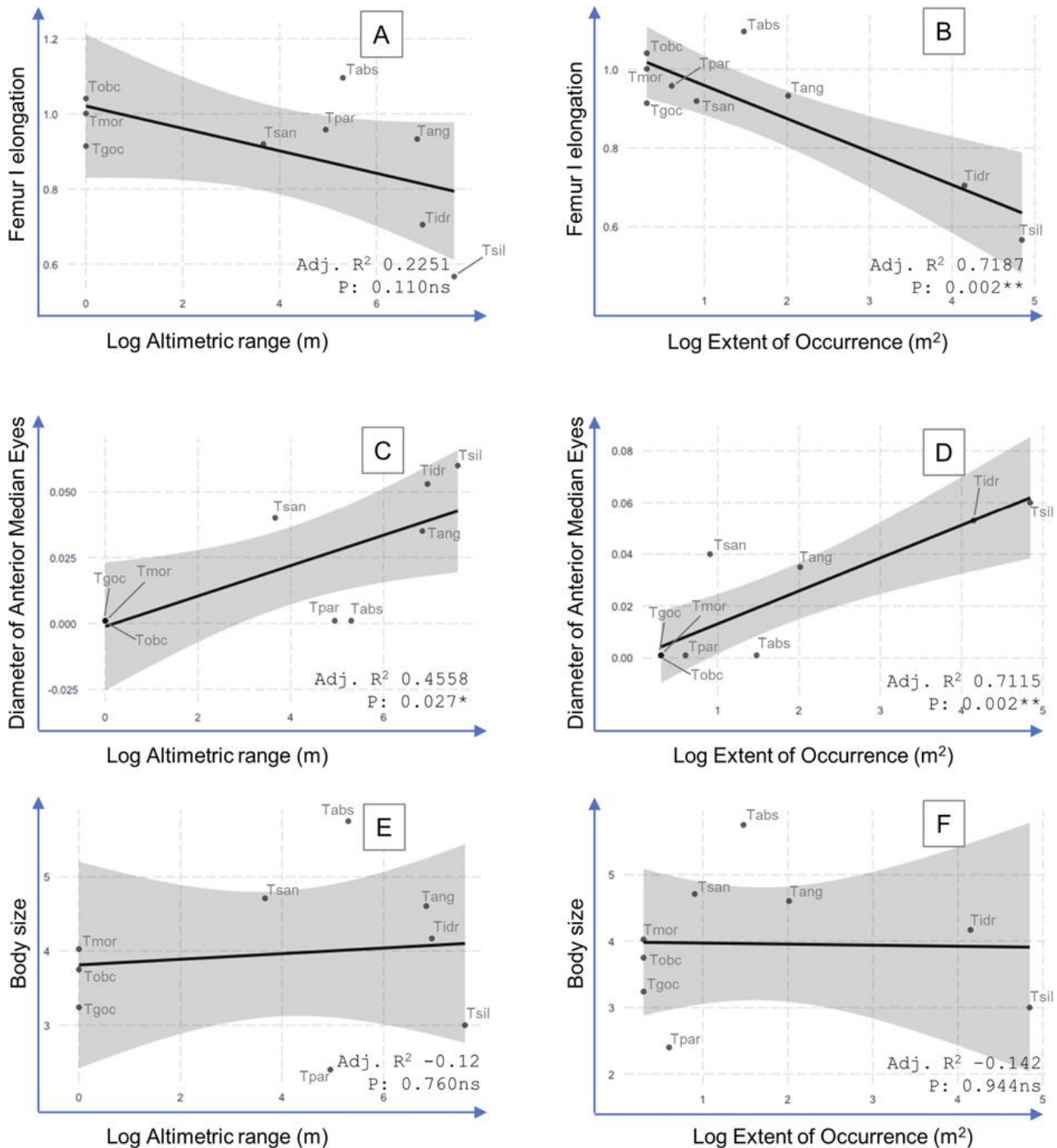


Figura 8.

Relazione lineare prevista (linea continua) e intervallo di confidenza al 95% (ombreggiatura grigia) tra caratteristiche biogeografiche e tratti troglomorfici in *Typhlonesticus* (tutte le specie), derivati dal modello misto lineare. Le statistiche di regressione per ciascuna regressione sono riportate in basso a destra. L'allungamento del femore I è espresso come il rapporto tra la lunghezza del femore I e la dimensione corporea delle femmine, il diametro degli occhi mediani anteriori è in mm. L'entità dell'occorrenza e l'intervallo altimetrico vengono trasformati in Log. Abbreviazioni delle specie: Tobc = *T. obcaecatus*; Tmor = *T. morisii*; Tgoc = *T. gocmeni*; Tsan = *T. santinellii*; Tpar = *T. parvus*; Tabs = *T. absoloni*; Tang = *T. angelicus*; Tidr = *T. idriacus*; Tsil = *T. silvestrii*.

È interessante notare che *T. absoloni* (Montenegro) si discosta dalle tendenze previste, mostrando un maggiore allungamento delle gambe (Fig.8A,B) e occhi più piccoli (Fig.8C, D) di quanto previsto per le dimensioni del raggio d'azione (30 km²) e l'intervallo altimetrico (200 m) dati. *T. santinellii*, invece, mostra occhi più grandi di quanto previsto per il suo areale (8 km²).

4. Discussione

Le nuove specie vengono diagnosticate entrambe in base ai dettagli morfologici dell'epigino e degli organi copulatori maschili. In particolare, la disposizione delle spermateche e dell'apofisi del paracymbium si è rivelata diagnostica, con una trascurabile sovrapposizione tra le specie.

Per quanto riguarda *T. santinellii* sp. nov., l'esame comparativo dell'epigino della femmina della grotta di Murdosso (Alpi Centrali) con materiale di *Typhlonesticus* ha consentito una prima identificazione preliminare di una presunta nuova specie, successivamente corroborata da evidenze molecolari. Allo stesso tempo, un attento riesame morfologico del materiale non topotipico in CI e MCSNB collezioni precedentemente identificate come *T. morisii* (vedilsaia et al. 2017: 323) e la filogenesi corrispondente hanno permesso la delimitazione di *T. angelicus* sp. nov., lasciando *T. morisii* segnalato in modo univoco nella località tipo.

Secondo l'approccio sia molecolare che morfologico, *T. angelicus* sp. nov. è vicino a *T. morisii* e, in misura minore, a *T. santinellii* sp. nov. e *T. idriacus*. Le quattro specie alpine sono raggruppate distintamente nel cluster alpino, a testimonianza della loro reciproca affinità.

Con l'inclusione di *T. angelicus* sp. nov. e *T. santinellii* sp. nov., il lignaggio evolutivo del *Typhlonesticus* comprende ora nove specie, otto delle quali distribuite nelle catene montuose settentrionali del bacino del Mediterraneo, dalla Turchia ai Pirenei, più *T. silvestrii* degli Stati Uniti occidentali.

Secondo Ribera e Dimitrov (2023), il genere *Typhlonesticus* ha avuto origine nel 91,9 Mya (71,1–111,9) e costituisce il lignaggio più antico dei *Nesticidae* europei. Con l'eccezione delle due specie più basali, *T. parvus* e *T. silvestrii*, il resto della specie ha avuto origine durante l'Oligocene, circa 22,4 Mya (15,4–30). In quel periodo il clima in Europa cambiò progressivamente aumentando la stagionalità e l'aridità (Bruch et al. 2011; Eronen et al. 2009) e il Mar Egeo non era ancora aperto, consentendo collegamenti attraverso le catene montuose dell'Europa meridionale, dall'Anatolia alla penisola iberica (Ribera e Dimitrov 2023). In questo scenario, le catene montuose del bacino settentrionale del Mediterraneo fungevano da rifugi climatici per il *Typhlonesticus*. Le due nuove specie si raggruppano con *T. morisii* e *T. idriacus*, formando il gruppo alpino di questo genere.

Pur non essendo mai state rinvenute in sintopia, tutte le specie di *Typhlonesticus* si trovano costantemente nello stesso habitat, cioè nella zona buia di grotte naturali o in ambienti sotterranei artificiali, come miniere e bunker. Un'eccezione a questo modello è fornita dalla specie americana *T. silvestrii*, recentemente trasferita al genere *by*Ribera e Dimitrov (2023), l'unica specie di *Typhlonesticus* segnalata sia in habitat ipogei che epigei.

La capacità dei ragni *Typhlonesticus* di mantenere popolazioni sotterranee permanenti (un "troglotro" in senso stretto) (Traiano e Carvalho 2017) si riflette nel loro alto livello di adattamento morfologico alla vita sotterranea (cioè tratti troglomorfici; Christiansen 2012). La nostra analisi comparativa all'interno del genere rivela una relazione statisticamente significativa tra i caratteri troglomorfi (allungamento delle gambe e regressione degli occhi) e le dimensioni della gamma. Di conseguenza, le specie che mostrano un livello più elevato di troglomorfismo hanno intervalli di distribuzione più piccoli e, presumibilmente, una minore capacità di dispersione. L'andamento relativo alle caratteristiche geografiche e all'allungamento delle zampe è coerente tra i rappresentanti del genere, ad eccezione di *T. absoloni* (Montenegro) (Fig. 8A,B), che devia anche rispetto alla regressione oculare (Fig. 8C, D). In via provvisoria, questa deviazione suggerirebbe l'esistenza di una diversità trascurata in questa specie, proprio come svelato in questo lavoro per *T. morisii* e *T. angelicus* sp. nov. Una deviazione simile, ma opposta, è evidente anche in *T. santinellii* sp. nov., mostrando occhi più grandi del previsto per la sua portata. Tale andamento deviante sosterebbe la presenza di nuove segnalazioni di questa specie al di fuori dell'areale attualmente conosciuto.

I tratti spesso associati alla vita sotterranea nei ragni sono particolarmente notevoli nel *Typhlonesticus*, essendo completamente depigmentato, mostrando occhi non funzionali e un maggiore allungamento delle gambe. Se, da un lato, il significato adattativo della mancanza di pigmento e della riduzione dell'occhio è particolarmente coerente con un ambiente buio, il significato funzionale dell'allungamento delle gambe è

meno immediato (vedi Gertsch 1973; Mammola e Isaia 2017; Liu et al. 2017; Mammola et al. 2018b). Tuttavia, tutte le ipotesi funzionali rimangono non testate sperimentalmente (Isaia et al. 2022, 2023).

La piccola distribuzione e gli intervalli altimetrici osservati in *Typhlonesticus* sono plausibilmente paralleli a una bassa tolleranza termica in queste specie, che si prevede si allineino con il modello generale osservato in Mammola et al. (2019b) per i ragni *Troglohyphantes* e per altri artropodi sotterranei (es. Pallarés et al. 2019, 2020, 2021; Raschmanová et al. 2018; Jones et al. 2021; Colado et al. 2022). Di conseguenza, le specie sotterranee specializzate mostrano tolleranze termiche inferiori rispetto alle specie superficiali affini, condizione che si traduce in una capacità di dispersione estremamente scarsa e in un'elevata strutturazione genetica delle popolazioni, rendendo queste specie particolarmente vulnerabili al riscaldamento globale in atto.

5. Conclusioni

Combinando prove morfologiche e genetiche, abbiamo rivelato l'esistenza di due nuove specie di *Typhlonesticus*, il più antico lignaggio evolutivo di ragni Nesticidi in Europa. Le nuove specie sono caratterizzate da un elevato livello di adattamento all'ambiente sotterraneo, a conferma della straordinaria ricchezza della diversità sotterranea delle Alpi. Utilizzando un approccio basato sui tratti, abbiamo dedotto quanto i *Typhlonesticus* altamente troglomorfi siano particolarmente vulnerabili ai cambiamenti ambientali, e in particolare abbiamo interpretato il loro isolamento e il loro piccolo areale di distribuzione come condizioni critiche che amplificano il loro rischio di estinzione, soprattutto dal punto di vista del riscaldamento globale. Affrontiamo in particolare questo problema raccomandando ulteriori studi incentrati sulla tolleranza termica di queste specie, con l'obiettivo di comprendere la loro possibile risposta all'aumento delle temperature globali.

6. Ringraziamenti

Un ringraziamento speciale va a **Roberto Santinelli** e **Nicolò Falgari** per aver guidato le spedizioni alla grotta di Murdosso. Ringraziamo di cuore Fabrizio Scolari (Ecomuseo di Gorno) e Paolo Pantini (Museo Civico di Scienze Naturali di Bergamo) per aver guidato la spedizione al complesso minerario di Gorno nell'ottobre 2022. Grazie a Sanne Beikes e Stefano Mammola per l'assistenza sul campo. Grazie a Martina Pavlek per aver fornito i dati sulla presenza delle specie balcaniche di *Typhlonesticus*. Ringraziamo anche Alba Enguídanos per il supporto tecnico e il sequenziamento.

Questo contributo è dedicato alla memoria di Angelo Morisi (1943–2016), stimato zoologo, pioniere delle ricerche biosepolgiche sul Piemonte e buon amico di Marco Isaia. Gli siamo grati per il grande contributo che ha dato alla conoscenza della fauna piemontese e per essere stata una costante fonte di ispirazione, soprattutto per i giovani zoologi.

7. Riferimenti

Agnarsson I, Coddington JA, Knoflach B (2007) Morfologia ed evoluzione dei genitali maschili del ragno ragnatela (*Araneae*, *Theridiidae*). Il giornale di Arachnology 35 : 334–395.

<https://doi.org/10.1636/SH-06-36.1>

Arnò C, Lana E (2005) Ragni cavernicoli del Piemonte e Val d'Aosta. Associazione Gruppi Speleologici Piemontesi ONLUS (AGSP).

Bounias-Delacour A, Canard A, Courtial C, Danflous S, Déjean S, Guerbaa K, Iorio E, Jacquet C, Lecigne S, Montagne D, Montardi Y, Villepoux O, Baraud L, Jeusset A, Kirchner F, Régnier C, Véron S, Cadiou D, Gigot G (2023) La liste rouge des espèces menacées en France. Araignées de France métropolitaine, 20 pp.

Brignoli PM (1971) Contributo alla conoscenza dei ragni cavernicoli della Jugoslavia. Frammenti Entomologica 7 : 103-119.

Brignoli PM (1972) Catalogo dei ragni cavernicoli italiani. Quaderni di speleologia. Circolo Speleologico Romano 1 : 5–211.

- Brignoli PM (1975) Ragni d'Italia. XXV. Su alcuni ragni cavernicoli dell'Italia settentrionale (*Araneae*). *Notiziario del Circolo Speleologico Romano* 20 : 1–35.
- Bruch AA, Utescher T, Mosbrugger V (2011) Modelli di precipitazione nel miocene dell'Europa centrale e sviluppo della continentalità. *Paleogeografia Paleoclimatologia Paleoecologia* 304 (3): 202–211.
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.10.002>
- Christiansen K (2012) Adattamenti morfologici. In: White WB, Culver DC (a cura di), *Enciclopedia delle caverne*. Stampa accademica, Waltham , 517–528.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383832-2.00075-X>
- Colado R, Pallarés S, Fresneda J, Mammola S, Rizzo V, Sánchez-Fernández D (2022) La stabilità climatica, non la temperatura media dell'habitat, determina la tolleranza termica degli scarabei sotterranei. *Ecologia* 103(4): e3629.
<https://doi.org/10.1002/ecy.3629>
- Coyle FA, McGarity AC (1992) Due nuove specie di ragni *Nesticus* degli Appalachi meridionali (*Araneae*, *Nesticidae*). *Giornale di Arachnology* 19 : 161–168.
- Deeleman-Reinhold CL (1974) La fauna dei ragni delle caverne del Montenegro (*Araneae*). *Glasnik Republickog Zavoda za Zastitu Prirode i Prirodnjackog Muzeja Titogradu* 6 : 9–33.
- Dresco E (1966) Étude de quelques espèces d'araignées du kind *Nesticus* (fam. *Nesticidae*). *Annales de Spéléologie* 21: 795–813.
- Eronen JT, Ataabadi MM, Micheels A, Karme A, Bernor RL, Fortelius M (2009) Storia della distribuzione e controlli climatici della cronofauna pikermiana del tardo Miocene. *Atti dell'Accademia Nazionale delle Scienze* 106(29): 11867–11871.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902598106>
- Gasparo F (1996) Sulla presenza del genere *Stalita* Schiödte (*Araneae*, *Dysderidae*) in Friuli (Italia nordorientale). *Atti e Memorie della Commissione Grotte "Eugenio Boegan"* 33 : 47–53.
- Gasparo F (1997) *Miscellanea biospeologica. Parte I: Friuli. Atti e Memorie della Commissione Grotte "E. Boegan"* 34 : 17–48.
- Gasparo F, Governatori G, Stoch F (2001) Osservazioni sulla fauna delle grotte e delle acque carsiche sotterranee delle Prealpi Carniche Orientali. In: Muscio G. (a cura di) *Il fenomeno carsico nelle Prealpi Carniche Orientali (Friuli)*. Memorie dell'Istituto Italiano di Speleologia s. 2, 12: 75–88.
- Gertsch WJ (1973) La famiglia dei ragni *Leptonetidae* nel Nord America. *Giornale di Aracnologia* 145–203.
- Gertsch WJ (1984) La famiglia dei ragni *Nesticidae* (*Araneae*) in Nord America, America Centrale e Indie occidentali. *Bollettino del Texas Memorial Museum* 31 : 1–91.
- Huber BA (1993) Meccanica genitale e selezione sessuale nel ragno *Nesticus cellulanus* (*Araneae: Nesticidae*). *Giornale canadese di zoologia* 71 (12): 2437–2447.
<https://doi.org/10.1139/z93-340>
- Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (2001) . *Categorie e criteri della Lista Rossa IUCN: versione 3.1. Commissione per la sopravvivenza delle specie dell'IUCN*. IUCN, Gland, Svizzera e Cambridge, Regno Unito ii + 30pp..
- Linee guida dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (2012) per l'applicazione dei criteri della Lista Rossa IUCN a livello regionale e nazionale: Versione 4.0. IUCN, Gland, Svizzera e Cambridge, Regno Unito. Disponibile su www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria .
- Isaia M, Arnedo MA, Mammola S (2022) Un approccio multistrato rivela diversità tassonomiche e fisiologiche trascurate nei ragni sotterranei alpini (*Araneae: Linyphiidae: Troglolyphante*). *Sistematica degli invertebrati* 36 (4): 354–371.
<https://doi.org/10.1071/IS21054>
- Isaia M, Mammola S, Arnedo MA (2023) Un ragno sotterraneo relitto (*Araneae: Linyphiidae: Troglolyphantes*) rivela una componente unica della biogeografia della Corsica. *Sistematica e diversità degli insetti* 7 (3): 1–16.
<https://doi.org/10.1093/isd/ixad008>
- Isaia M, Mammola S, Mazzuca P, Arnedo MA, Pantini P (2017) Advances in the systematics of the spider genus *Troglolyphantes* (*Araneae*, *Linyphiidae*). *Sistematica e biodiversità* 15 (4): 307–326.
<https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1254304>

- Isaia M, Pantini P, Beikes S, Badino G (2007) Catalogo ragionato dei ragni (*Arachnida* , *Araneae*) del Piemonte e della Lombardia. Memorie dell'Associazione Naturalistica Piemontese 9 : 1–161.
- Isaia M, Paschetta M, Lana E, Pantini P, Schönhofer AL, Christian E, Badino G (2011) Aracnidi sotterranei delle Alpi occidentali italiane (*Arachnida* : *Araneae* , *Opiliones* , *Palpigradi* , *Pseudoscorpiones*). Monografie XLVII, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, 325 pp.
- Jones KK, Humphreys WF, Saccò M, Bertozzi T, Austin AD, Cooper SJ (2021) Il massimo termico critico dei coleotteri subacquei (*Coleoptera*: *Dytiscidae*): un confronto tra specie sotterranee e di superficie. Ricerca attuale nella scienza degli insetti 1: 100019.
<https://doi.org/10.1016/j.cris.2021.100019>
- Katoh K, Toh H (2008) Miglioramento della precisione dell'allineamento multiplo di ncRNA incorporando informazioni strutturali in una struttura basata su MAFFT. BMC Bioinformatica 9: 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-212>
- Kranjc A, Novak T (1977) Golarjev ali Jamniški pekel pod Olševo. Naše Jame 19 : 29–36.
- Kratochvíl J (1933) Evropské druhy celedi *Nesticidae* Dahl. Práce Moravské Přírodovědecké Společnosti 8 (10): 1–69.
- Kratochvíl J (1934) Pregled pecinskih paukova u Jugoslaviji. Prirodoslovne Razprave 2 : 165–226.
- Kratochvíl J (1939) A proposito dei due araignées cavernicoles de Yougoslavie. Věstník Československé Zoologické Společnosti 6–7: 279–289.
- Kostanjšek R (2010) Un contributo alla fauna dei ragni slovena – I. Natura Sloveniae 12 : 23–33.
- Kulczyński W (1914) Araneorum specie novae minusve cognitae, in montibus Kras dictis a Dre C. Absolon aliisque Collectae. Bollettino internazionale dell'Accademia delle scienze di Cracovia 353–387.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guidon S (2012) Partition Finder: selezione combinata di schemi di partizionamento e modelli di sostituzione per analisi filogenetiche. Biologia molecolare ed evoluzione 29: 1695–1701.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Lehtinen PT, Saaristo MI (1980) Ragni della regione orientale-australiana. II. *Nesticidi* . Annales Zoologici Fennici 17 : 47–66.
- Liu W, Golovatch S, Wesener T, Tian M (2017) Evoluzione convergente di adattamenti morfologici unici a un ambiente sotterraneo nei millepiedi delle caverne (*Diplopoda*). PLoS ONE 12: e0170717.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170717>
- Mammola S, Arnedo MA, Pantini P, Piano E, Chiappetta N, Isaia M (2018b) Speciazione ecologica nell'oscurità? Partizionamento della nicchia spaziale nei ragni sotterranei fratelli (*Araneae* : *Linyphiidae* : *Troglohyphantes*). Sistematica degli invertebrati 32 (5): 1069–1082.
<https://doi.org/10.1071/IS17090>
- Mammola S, Cardoso P, Ribera C, Pavlek M, Isaia M (2018a) Una sintesi sui ragni cavernicoli in Europa. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 56 (3): 301–316.
<https://doi.org/10.1111/jzs.12201>
- Mammola S, Isaia M (2017) Ragni nelle caverne. Atti della Royal Society di Londra. Serie B: Scienze biologiche 284.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0193>
- Mammola S, Pavlek M, Huber BA, Isaia M, Ballarin F, Tolve M, Čupić I, Hesselberg T, Lunghi E, Mouron S, Graco-Roza C, Cardoso P (2022) Un database dei tratti e una lista di controllo aggiornata per i ragni sotterranei europei . Dati scientifici 9(236).
<https://doi.org/10.1038/s41597-022-01316-3> .
- Mammola S, Piano E, Cardoso P, Vernon P, Domínguez-Villar D, Culver DC, Pipan T, Isaia M (2019a) Il cambiamento climatico va in profondità: gli effetti delle alterazioni climatiche globali sugli ecosistemi delle caverne. La revisione dell'Antropocene 6 (1–2): 98–116. <https://doi.org/10.1177/2053019619851594>
- Mammola S, Piano E, Malard F, Vernon P, Isaia M (2019b) Estendere l'ipotesi di Janzen alle regioni temperate: un test utilizzando ecosistemi sotterranei. Ecologia funzionale 33 (9): 1638–1650.
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.13382>
- Marazzi S (2005) Atlante Orografico delle Alpi. Priuli e Verlucca, SOIUSA, Pavone Canavese.

Pallarés S, Colado R, Botella-Cruz M, Montes A, Balart-García P, Bilton DT, Millán A, Ribera I, Sánchez-Fernández D (2021) La perdita di capacità di acclimatazione al calore potrebbe lasciare gli specialisti del sottosuolo altamente sensibili ai cambiamenti climatici. *Conservazione degli animali* 24 (3): 482–490.

<https://doi.org/10.1111/acv.12654>

Pallarés S, Colado R, Pérez-Fernández T, Wesener T, Ribera I, Sánchez-Fernández D (2019) Tolleranza al calore e capacità di acclimatazione negli artropodi sotterranei che vivono in condizioni termiche comuni e stabili. *Ecologia ed evoluzione* 9 : 13731–13739.

<https://doi.org/10.1002/ece3.5782>

Pallarés S, Sanchez-Hernandez JC, Colado R, Balart-García P, Comas J, Sánchez-Fernández D (2020) Oltre gli esperimenti di sopravvivenza: utilizzo di biomarcatori di stress ossidativo e neurotossicità per valutare la vulnerabilità della fauna sotterranea ai cambiamenti climatici. *Fisiologia della conservazione* 8(1): coaa067.

<https://doi.org/10.1093/conphys/coaa067>

Pantini P, Isaia M (2019) *Araneae*.it: il catalogo online dei ragni italiani, con aggiunte su altri ordini di aracnidi presenti in Italia (*Arachnida: Araneae, Opilione, Palpigradi, Pseudoscorpionida, Scorpiones, Solifugae*).

Frammenti Entomologica 51(2): 127-152. Online su www.araneae.it

<https://doi.org/10.4081/fe.2019.374>

Paoletti MG (1978) Cenni sulla fauna ipogea delle prealpi bellunesi e colli subalpini. *Le Grotte d'Italia* 7 (4): 45–198

Raschmanová N, Šustr V, Kováč L, Parimuchová A, Devetter M (2018) Testare l'ipotesi della variabilità climatica nei *Collemboli* edafici e sotterranei (*Hexapoda*). *Giornale di biologia*

I campi di ricerca coperti da *Arthropod Systematics & Phylogeny* sono la tassonomia, la morfologia/anatomia, la filogenesi (molecolare o basata sulla morfologia), la biogeografia storica e la paleontologia dei taxa di artropodi.

<https://arthropod-systematics.arphahub.com/>

ISSN 1864-8312 (in linea) | ISSN 1863-7221 (stampa)



Two new subterranean *Typhlonesticus* (Araneae: Nesticidae) from the Alps with notes on their ecology, distribution and conservation

Marco Isaia^{1,2}, Giuseppe Nicolosi¹, Alessandro Infuso¹, Carles Ribera³

¹ Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Turin, Via Accademia Albertina 13, 10123 Torino, Italy

² National Biodiversity Future Center, Palermo 90133, Italy

³ Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals and Institut de Recerca de la Biodiversitat, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

<https://zoobank.org/F295E683-AA9E-498C-B44F-3EB6B3721CA5>

Corresponding author: Marco Isaia (marco.isaia@unito.it)

Received 25 May 2023

Accepted 02 August 2023

Published 02 November 2023

Academic Editors Lorenzo Prendini, Klaus-Dieter Klass

Citation: Isaia M, Nicolosi G, Infuso A, Ribera C (2023) Two new subterranean *Typhlonesticus* (Araneae: Nesticidae) from the Alps with notes on their ecology, distribution and conservation. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 81: 801–818. <https://doi.org/10.3897/asp.81.e106948>

Abstract

The spider genus *Typhlonesticus* Kulczyński, 1914 (Araneae: Nesticidae) includes seven species, most of which exhibiting strict preference for caves, abandoned mines and other subterranean habitats. In Italy the genus is represented by two species: *T. morisii* (Brignoli, 1975), an extremely narrow endemic species from SW-Alps with a very high level of subterranean adaptation and *T. idriacus* (Roewer, 1931), showing a much wider distribution in NE-Italy and poor adaptations to subterranean life. Our recent biospeleological surveys in the Alps lead to the discovery of new populations of highly troglomorphic *Typhlonesticus* that proved to belong to two new species based on morphological and molecular data. Considering the rarity of these new species, we provide general information on their ecology and distribution, including a comparative analysis of troglomorphic traits in *Typhlonesticus* in relation to biogeographic factors. Information on the conservation status, useful for assessing their extinction risk based on International Union for Conservation of Nature (IUCN) guidelines, is also provided.

Keywords

Alpine subterranean fauna, Biogeography, Endemic species, Extinction risk, Systematics, Troglomorphy

1. Introduction

The genus *Typhlonesticus* Kulczyński, 1914 (Araneae: Nesticidae) currently includes seven species of cave dwelling spiders, most of them characterised by a high level of adaptation to subterranean life. Given their habitat preferences, most of the species show narrow distributions, in some cases even point-like. The genus is primarily distributed in Europe with six species, plus

a W-American one that was recently transferred to *Typhlonesticus* by Ribera and Dimitrov (2023) (World Spider Catalog, 2023). As currently defined, the genus *Typhlonesticus* currently lacks an exhaustive morphological diagnosis, being the only available information found in Kulczyński (1914: 379) “Nestico valde affine, differt ab eo defectu oculorum”. A list of characters useful to

delimitate the genus was later provided by Lehtinen and Saaristo (1980: 50), who designated *T. absoloni* Kratochvíl, 1933 as type species.

According to the latest overview of European subterranean spiders (Mammola et al. 2018a), all European species of *Typhlonesticus* are obligate troglobionts, being exclusively found in subterranean habitats. This ecological preference parallels a suite of morphological and physiological adaptations to the subterranean environment (i.e., troglomorphism; see Christiansen 2012) pertaining, among others, size, leg elongation, loss of pigmentation and eye regression. As for *Typhlonesticus*, troglomorphism is particularly developed in *T. absoloni* (Kratochvíl, 1933), *T. obcaecatus* (Simon, 1907), *T. parvus* Kulczyński, 1914, *T. gocmeni* Ribera, Elverici, Kunt and Özkütük, 2014 and *T. morisii* (Brignoli, 1975), while in *T. idriacus* (Roewer, 1931) and *T. silvestrii* (Fage, 1929) troglomorphic characters are much less pronounced.

In the Alps the genus is represented by *T. morisii* and *T. idriacus*. *T. morisii* was described on material collected in the 1970s by Angelo Morisi in the military bunker of Vernante (Province of Cuneo, Piemonte, SW-Alps), an artificial subterranean site renowned among local biospeleologists for hosting a remarkable assemblage of highly specialised subterranean species and for being the type locality of several endemic species of troglobiont arthropods (Isaia et al. 2011). According to the original description (Brignoli 1975: 29), *T. morisii* exhibits fully depigmented and barely visible eyes (“occhi depigmentati, appena visibili”). The species remained unrecorded until the 2000s, when it was repeatedly re-collected at the type locality (Arnò and Lana 2005; Isaia et al. 2007, 2011). In 2017 we reported five new records (Isaia et al. 2017) in different localities across the SW-Alps, widening the species range to the Province of Imperia (Liguria) and to the Department of Alpes Maritimes (France). Compared to *T. morisii* and other European species, the other Italian *Typhlonesticus*, *T. idriacus*, shows less pronounced subterranean adaptations and a much wider range, covering an area from Garda Lake in the West to Trieste (NE-Italy), Idrija (NW-Slovenia) and Carinthia (Austria) in the East (Pantini and Isaia 2019). The species is currently recorded in 14 localities.

The finding of a female belonging to an undescribed species of *Typhlonesticus* in Central Alps and the first results of a phylogenetic analysis including material of *T. morisii* stimulated our thorough biospeleological searches in the Prealps of Bergamo (Lombardia) and a detailed re-examination of the material of *Typhlonesticus* available in MI and MCSNB collections.

As a result, we here provide the description of two new species of *Typhlonesticus* and a comparative analysis of troglomorphic traits in relation to range size and altimetric range within the genus. In parallel, considering the rarity of *Typhlonesticus* species in Italy, we also provide some general information about the ecology and conservation status of the new species, including details useful for the assessment of their extinction risk according to the Red List Categories and Criteria of the International Union for Conservation of Nature (IUCN 2001, 2012).

2. Methods

2.1. Molecular analysis

2.1.1. Sampling, DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Our analysis includes all currently accepted species of the genus *Typhlonesticus* along with representatives of all European genera of Nesticids that were used as outgroups. All specimens of the new species were collected in the field, preserved directly in 96% or absolute ethanol and stored at -20°C . Total genomic DNA was extracted from legs or thorax tissue using the E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (V-Spin) (Omega Bio-tek) following the manufacturer protocol. DNA concentration was measured by fluorimetry (Qubit HS dsDNA Assay, Thermo Fisher Scientific, CA). Partial fragments of five genes, two mitochondrial – cytochrome c oxidase subunit I (cox1) and 16S rRNA (16S) – and three nuclear – 18S rRNA (18S), 28S rRNA (28S) and Histone H3 (H3) – were amplified and sequenced using the primers listed in Supplement Material Table S1.

PCR reactions were conducted at a final volume of 20 μL using MyRed Taq Polymerase (Bioline Inc). PCR products were cycle-sequenced in both directions using the same PCR primers. The sequencing was performed at the Macrogen sequencing centre in Madrid. Chromatograms were edited and assembled with Geneious v. 10.0.9 (<https://geneious.com>). All newly generated sequences were deposited in GenBank (see Supplement Material Table S2 for accession numbers).

2.1.2. Alignment and evolutionary model selection

The alignment of cox1 and H3 was trivial, given that the amplified fragments showed no insertions/deletions and hence the sequences were adjusted manually. We translated sequences into amino acids and checked for stop-codons to avoid sequencing/editing errors. For the ribosomal gene fragments, we performed alignments using the online version of Mafft (Katoh and Toh 2008) using the G-INS-i algorithm with default options.

The best partitioning schemes and substitution models for RAxML were explored using PartitionFinder v.1.0.1 (Lanfear et al. 2012). We partitioned data by codon position (in the case of the two protein coding genes) and explored the best partitioning scheme and substitution models simultaneously using the All heuristic algorithm. Bayesian information criterion was used to select the best partition scheme and the corresponding best fit models.

2.1.3. Phylogenetic analyses

Maximum likelihood analyses were carried out in the computer program RAxML 7.4.2 (Stamatakis 2006) through the graphical front-end RAxML-GUI 1.3 (Silvestro and Michalak 2012) applying the partition scheme

and models of molecular evolution selected by Partition-Finder. A GTR+G+I nucleotide substitution model was applied to each of the partitions corresponding to the best partition scheme selected. Nodal support was evaluated using the maximum likelihood plus thorough bootstrap in 10 runs with 1000 replicates. The graphical phylogenetic tree was generated and edited with FigTree v1.3.1 software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

2.2. Taxonomy

2.2.1. Taxon sampling and morphological study

Specimens of the new *Typhlonesticus* used in the morphological study were collected in the field and preserved directly in 70% ethanol. Photographs are multifocus Z-stack images taken with a Flexacam C1 camera mounted on a Leica Stereozoom S8 APO stereoscopic binocular microscope. Specimens were examined and measured using a Leica M80 stereoscopic binocular up to 60x magnification connected to an EC3 camera. All measurements are given in mm.

The female vulva was removed and treated with 10% KOH prior to examination. After observation and drawings, the vulva was washed in acetic acid (5%) and successively stored in 70% ethanol in a micro-vial in the same tube containing the specimen. All illustrated male structures are from the left side. We follow Coyle and McGarity (1992) for describing the paracymbium and Huber (1993) and Agnarsson et al. (2007) for other parts of the male and female copulatory organs.

Measurements of troglomorphic traits (diameter of anterior median eyes and femur elongation) are issued from Mammola et al. (2022) and verified both on original publications and on original material available in MI, CRBA and MCSNB collections. Femur I elongation is measured as the ratio of the length of the femur I to the body size of females.

2.2.2. Depository

Holotypes are deposited at the Museo Civico di Scienze Naturali “E. Caffi” (Bergamo, Italy) (MCSNB), paratypes and other materials are stored at Marco Isaia’s collection at the Department of Life Science and Systems Biology of the University of Torino (CI). In addition, we examined the holotype of *T. morisii*, stored at Museo di Storia Naturale di Verona (MSNV), and material of *T. idriacus* stored at Centre de Recursos de Biodiversitat Animal (CRBA).

2.2.3. Conservation and biogeography

The description of the conservation status and the basic information for the IUCN Red List assessment follows for the Red List Categories and Criteria of the International Union for Conservation of Nature (IUCN 2001, 2012).

The calculation of the Extent of Occurrence (EOO) and altimetric range of all *Typhlonesticus* species (Table 1) is based on available occurrences found in literature (see table legend), successively elaborated in GIS environment. Speleological cadastral codes of the caves are shown in squared brackets [‘regional code’ and ‘number’], and coordinates of localities are given in decimal degrees (WGS84 datum). We refer to SOUISA (Marazzi 2005) for the geographic classification of the Alps.

The EOO and the altimetric range were both log-transformed to stabilise variance and related to troglomorphic traits (body size, Femur I elongation and diameter of anterior median eyes) via linear models in R environment.

2.2.4. Abbreviations used in text and illustrations

AER = anterior eye row; **ALE** = anterior lateral eyes; **AME** = anterior median eyes; **AOO** = Area of Occupancy; **CI** = Marco Isaia’s collection, University of Torino; **CRBA** = Centre de Recursos de Biodiversitat Animal, Universitat de Barcelona; **dp** = dorsal process of paracymbium; **e** = embolus; **EOO** = Extent of Occurrence; **FE** = femur; **id** = insemination duct; **ma** = median apophysis; **MCSNB** = Museo Civico di Scienze Naturali “E. Caffi” (Bergamo, Italy); **Me** = metatarsus; **MI** = Marco Isaia’s collection at the Department of Life Science and Systems Biology of the University of Torino; **MSNV** = Museo di Storia Naturale di Verona; **Pa** = patella; **PER** = posterior eye row; **PLE** = posterior lateral eyes; **PME** = posterior median eyes; **p** = paracymbium; **p1** = process 1 of the conductor; **p2** = process 2 of the conductor; **s** = spermatheca; **st** = subtegulum; **t** = tegulum; **Ta** = tarsus; **Ti** = tibia; **vp** = ventral process of paracymbium.

Illustrations were prepared by Alessandro Infuso directly on specimens observed under the stereomicroscope.

3. Results

3.1. Molecular data

Specimens, localities and GenBank accession numbers of the sequences used in this study are listed in Table S2. The concatenated matrix used in the analyses consisted of 18 terminals and 3430 aligned characters (cox1 = 930, 16S = 489, H3 = 317, 18S = 820 and 28S = 874).

The best partitioning scheme selected with Partition-Finder under the BIC criterion includes four partitions: cox1 1st and 2nd positions, 16S, 18S and 28S; cox1 3rd positions and H3 1st positions; H3 2nd positions; H3 3rd positions.

3.2. Maximum likelihood analysis

Figure 1 shows the maximum likelihood tree obtained with the combined data matrix. The new species cluster

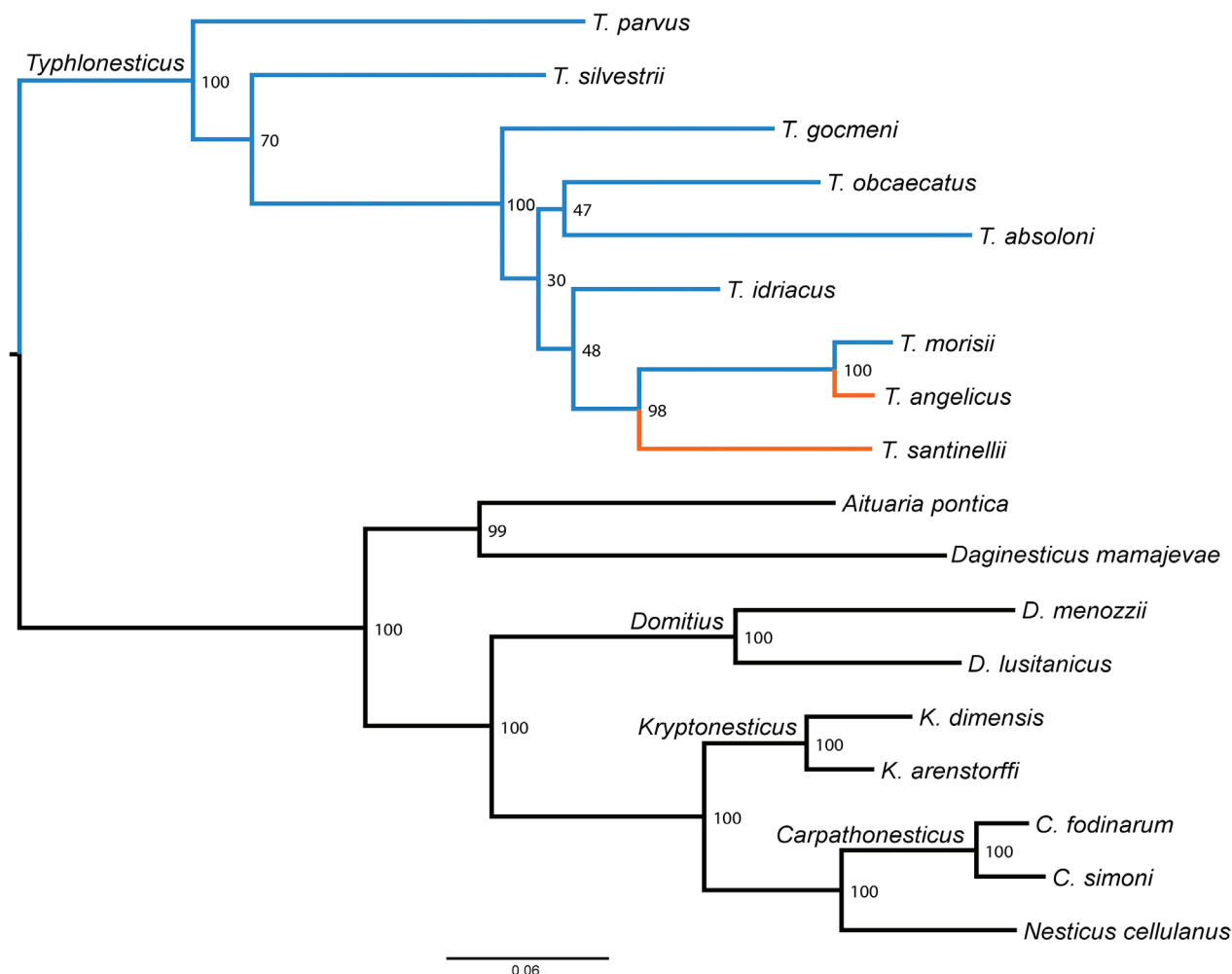


Figure 1. ML tree inferred using the concatenated data matrix of *cox1* and *rrnL* mtDNA, and H3, 18S and 28S nuDNA gene fragments. Numbers next to nodes correspond to bootstrap support values. Scale bar: units in nucleotide substitutions per site.

between the two geographically closest species, *Typhlonesticus morisii* and *T. idriacus*, being *T. angelicus* **sp. nov.** the sister species of *T. morisii* (bootstrap support 100%) and *T. santinellii* **sp. nov.** the sister species of both (with a bootstrap support of 98%). *T. absoloni*, *T. obcaecatus* and *T. idriacus* are poorly supported (low bootstrap supports), while the set of these seven species constitutes a highly supported evolutionary lineage (bootstrap support = 100).

3.3. Taxonomy

Family Nesticidae Simon, 1894

Genus *Typhlonesticus* Kulczyński, 1914

3.3.1. *Typhlonesticus angelicus* Isaia and Ribera, **sp. nov.**

<https://zoobank.org/3B2E78D4-7FC3-4006-932D-364240633BA0>

Figs 2A–E, 5A, C, 7A

Examined material. Holotype: ITALY, Piemonte, Province of Cuneo: Chiusa di Pesio, Grotta Superiore delle Camoscere [Pi 250], 44.2183°N, 7.6605°E (Fig. 7D), 1200 m a.s.l., 3.XII.2018, Isaia M. and Mammola S. leg. 1f (MCSNB) (sub “*Typhlonesticus morisii*” in Isaia et al. 2017: 323). — **Paratypes:** same locality as holotype, 15.VII.1987, Comotti G. and Baldan A. leg. 1f (MCSNB) • 3.XII.2018, Isaia M. and Mammola S. leg. 1 juv. (CI) • **Liguria, Province of Imperia:** Triora, Prospetto di Miniera del Monte Grai, 43.99650°N, 7.67296°E, 1878 m a.s.l., 12.VIII.2016, Beikes S. and Isaia M. leg. 1f (CI) • **Roccaforte Mondovì, Grotta dei Partigiani della Tura** [Pi 286], 44.24081°N, 7.73308°E, 1780 m a.s.l., 18.VIII.2016, Giachino P.M. and Lana E. leg. 1m • **FRANCE, Alpes Maritimes:** Brigue, Bunker Opera 34, Balconi di Marta, 44.01534N, 7.64178°E, 1914 m a.s.l., 12.VIII.2016, Beikes S. and Isaia M. leg. 1m, 2juv. (CI) (all material cited (sub “*Typhlonesticus morisii*” in Isaia et al. 2017: 323)). — **Other material: ITALY, Piemonte, Province of Cuneo:** Roccaforte Mondovì, Grotta dei Partigiani della Tura [Pi 286], 44.24081°N, 7.73308°E, 1780 m a.s.l., 22.V.2016, Chesta M. and Lana E. leg. 1f (CI) • same locality, 7.VI.2016, Chesta M. and Lana E. leg. 1m, 2f, 1 juv. (CI) • same locality, 25.VI.2016, Chesta M. and Lana E. leg. 1f (CI) • same locality, 18.VIII.2016, Giachino P.M. and Lana E. leg. 3m, 1juv. (CI) • Roccaforte Mondovì, Grotticella della Tura [Pi n.c.], in the vicinity of Pi 286, 25.VI.2016, Chesta M. and Lana E. leg. 1f (CI) • same locality, 12.VIII.2016, Chesta M. and Lana E. leg. 2m, 1f, 2 juv. (CI) (all material cited sub “*Typhlonesticus morisii*” in Isaia et al. 2017: 323).

Diagnosis. Males of the new species differ from *Typhlonesticus morisii* by the shape and the arrangement of the paracymbial apophyses, mainly the ventral one, which is straight in *T. angelicus* **sp. nov.** (“vp” in Fig. 2D, E) and distally bent in *T. morisii* (Fig. 4D, E). Subtle differences are also found in the shape of p1 and p2 processes (Figs 2D, 5C) and the shape of the median apophysis (“ma” in Figs 2D, 5C). — Females of *T. angelicus* **sp. nov.** are best diagnosed by the orientation of the insemination ducts (Figs 2A, B, 5A), not twisted and connecting directly to

the spermathecae ventrally rather than dorsally, such as in *T. morisii* (Figs 4A, B, 5H).

Description of the female. Female holotype from Grotta superiore delle Camoscere [Pi 250], 3.XII.2018, Isaia M. and Mammola S. leg. — **Coloration:** Carapace pale yellow. Head region of the same color. Sternum yellow brown, without pattern. Opisthosoma grey-white without pattern. Legs same color as carapace. — **Prosoma:** Carapace 1.70 long, 1.42 wide, cephalic region not differen-

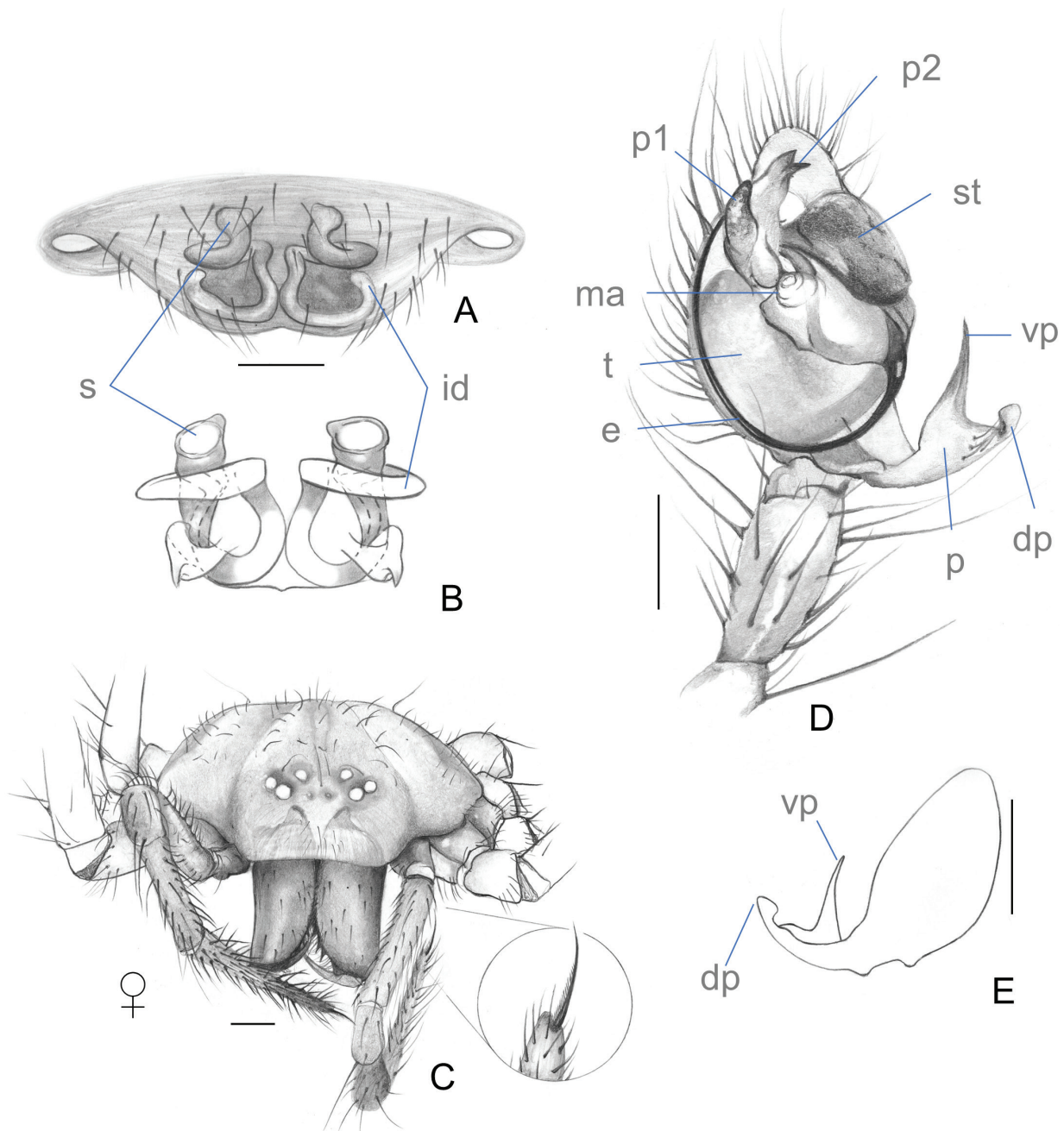


Figure 2. *Typhlonesticus angelicus* **sp. nov.**, holotype female from Chiusa di Pesio, Grotta Superiore delle Camoscere [Pi 250] (Isaia M. and Mammola S. leg., 3.XII.2018) (A, B, C) and paratype male from Grotta dei Partigiani della Tura [Pi 286] (Giachino P.M. and Lana E. leg., 18.VIII.2016) (D, E). Epigyne in ventral view (A), vulva in dorsal view (B), female cephalothorax in frontal view (C), left male pedipalp in ventral view (D) and male cymbium in dorsal view (E) (see section 2.2.3. for abbreviations). Scale bars 0.2 mm.

tiated from the rest of the carapace. Clypeus height under AME 0.302. Labium as long as wide or moderately wider than long. Sternum 0.97 long, 0.86 wide. Eyes reduced and depigmented, no corneal lenses are visible. Both eye rows recurved in dorsal view PER 0.52 wide, AER 0.36. AME reduced to a small spot of pigment. Eye diameter: AME 0.03, ALE 0.05; PME 0.05; PLE 0.05. — **Opisthosoma**: 2.37 long, 1.80 wide. Total length 4.07 (4.25 including spinnerets). Leg formula: I>II>IV>III. Epigynal plate 0.35 long, 0.47 wide. Epigyne convex and prominent, without sclerotized plates (Figs 2A, 5A). The posterior edge is slightly sclerotized. Spermathecae and insemination ducts can be observed through the tegument. Vulva simple (Figs 2B, 5A), consisting of two small spermathecae, insemination and fertilization ducts. Insemination ducts coiled, forming one lap around the fertilization ducts before reaching the spermatheca. Vulval pockets absent (Fig. 2A, B). — **Appendages**: Chelicerae 0.58 long, 0.31 wide, with 3 equally spaced teeth on promargin and 18–20 very small teeth grouped on retromargin. — **Leg measurements**: Leg I: femur 4.13, patella 0.82, tibia 4.01, metatarsus 3.82, tarsus 1.59, total 14.37. Leg II: femur 3.42, patella 0.68, tibia 3.03, metatarsus 2.99, tarsus 1.31, total 11.43. Leg III: femur 2.63, patella 0.59, tibia 2.05, metatarsus 2.17, tarsus 0.94, total 8.39. Leg IV: femur 3.63, patella 0.75, tibia 3.07, metatarsus 2.63, tarsus 1.13, total 11.21. Palp: femur 1.07, patella 0.32, tibia 0.63, tarsus 1.09, total 3.11.

Description of the male paratype. Paratype from Roccaforte Mondovì, Grotta dei Partigiani della Tura [Pi 286], 1780 m a.s.l., 44.24081°N, 7.73308°E, 18.VIII.2016, Giachino P.M. and Lana E. leg. — **Coloration**: Carapace yellow brown. Sternum yellow brown, without pattern. Head region of the same color. Opisthosoma grey-white without pattern. Legs same color as prosoma, all trochanters notched. — **Prosoma**: Carapace 1.66 long, 1.54 wide. Carapace approximately circular in dorsal view. Cephalic region not differentiated from the rest of the carapace. Clypeus height under AME 0.39. Labium as long as wide or moderately wider than long. Sternum 1.07 long, 1.06 wide. Reduced and depigmented eyes. No corneal lenses visible. Both eye rows recurved in dorsal view, PER 0.54 wide, AER 0.31. Eye diameter: AME 0.04, ALE 0.05; PME 0.05; PLE 0.05. — **Opisthosoma**: 2.63 long, 1.50 wide. Total length 4.29 (4.51 including spinnerets). Leg formula: I>II>IV>III. — **Appendages**: Chelicerae: 0.91 long, 0.33 wide, with 3 equally spaced teeth on promargin and 18–20 very small teeth grouped on retromargin. Leg formula: I>II>IV>III — **Male palp** (Fig. 2D, E): Paracymbium short, with a well-developed ventral process consists of a long and flattened lamella, curved towards the apex and tapering and a dorsal one consisting of a short laminar apophysis, ending in a rounded and enlarged lobe directed toward the ventral one (Figs 2D, E, 5C). Conductor complex with two well developed processes (p1 and p2): p1 longer than wide in lateral view (Fig. 5C), tapering in the distal third; p2 is in an apical position and ends with two convergent apical hooks running

as a conductor for the embolus. Embolus filamentous following a semi-circular course towards the apex and bordering the tegulum (Figs 2D, 5C). Large and well-developed median apophysis, ventrally directed, wider at its base and narrower at its medial-final part, cone-shaped with a blunt end (Fig. 2D). — **Leg measurements**: Leg I: femur 4.57, patella 0.79, tibia 4.66, metatarsus 4.42, tarsus 1.57, total 16.01. Leg II: femur 4.48, patella 0.81, tibia 4.52, metatarsus 4.35, tarsus 1.52, total 15.68. Leg III: femur 3.25, patella 0.74, tibia 2.74, metatarsus 2.92, tarsus 1.16, total 10.81. Leg IV: femur 4.42, patella 0.80, tibia 3.97, metatarsus 3.65, tarsus 1.39, total 14.23. Palp: femur 1.16, patella 0.28, tibia 0.44, tarsus 0.75, total 2.63.

Etymology. The species is dedicated to Angelo Morisi (1943–2016) beloved Piedmontese natural scientist, expert in reptiles, amphibians, cave-dwelling invertebrates, freshwater macroinvertebrates, fishes and lichens. Angelo was a kind-hearted, altruist and caring natural scientist, pioneer of the biospeleological research in Piedmont, and first collector of several rare troglonid species that still carry his name, including *Typhlonesticus morisii*, sister species of *T. angelicus* **sp. nov.** The specific epithet is in form of adjective and conjugates the name of Angelo and the features of benevolent immortal beings with a translucent body of light, barely visible to the human eye.

Distribution, sampling notes and ecology. *Typhlonesticus angelicus* **sp. nov.** is restricted to subterranean habitats of the central portion of Alpi del Marguareis, within the section of Alpi Liguri (Fig. 6). Five isolated populations are known so far, covering an area of approximately 100 km² spanning from the upper Maudagna Valley (two nearby populations) and mid-Pesio Valley (one population) in the north to the border of Italy and France in the south (two populations). The population of Balconi di Marta (Brigue), formerly assigned to *T. morisii* and now re-assigned to *T. angelicus* represents the only record of *Typhlonesticus* for France, leaving *T. morisii* as uniquely known from Italy (Vernante). All caves open in Alpine grasslands at 1,800–2,000 m a.s.l., with the exception of the designed type locality Pi 250 – Grotta Superiore delle Camoscere (Pesio Valley) (Fig. 7D) opening at the upper limit of a beech forest, approximately at 1,200 m a.s.l. — Several renowned Italian biospeleologists, including Angelo Morisi himself and Gianni Comotti, the first collector in history of a female specimen of this new species, visited this cave through time leading to the discovery of an extraordinary and highly specialized community of subterranean endemic arthropods, including *Troglohyphantes vignai* Brignoli, 1971 (Araneae: Linyphiidae), *Leptoneta crypticola* Simon, 1907 (Araneae: Leptonetidae), *Holoscotolemon oreophilum* Martens, 1978 (Opiliones: Travuniidae) (Isaia et al. 2011, 2022) and the rare subterranean beetle *Agostinia launoi* (Gestro, 1892) (Carabidae, Trechinae). — Individuals of *T. angelicus* **sp. nov.** were preferably found on cave walls and to a lesser extent on the cave ground, hanging upside down on their criss-cross web or walking on vertical rocks (Fig. 7A),

mostly hidden in rock fissures. Females may be found throughout the year, while males appear to be very rare. All caves inhabited by *T. angelicus* **sp. nov.** are characterised by constant high relative humidity close to saturation. — *Typhlonesticus angelicus* **sp. nov.** prefers the medium alpine montane belt (mean = 1,693 m; n = 4) and inhabits sites characterised by mean annual temperatures from 4.1 to 9.1°C (mean = 5.7°C; range: 5.0; n = 4), colder than *T. morisii* being uniquely found in Sotterranei di Vernante, where the temperature ranges from 8.3 to 9.8°C during the year.

Conservation status and basic information for an IUCN Red List assessment. Range description, Area of Occupancy (AOO) and Extent of Occurrence (EOO). The species is endemic to Alpi del Marguareis over an altimetric range of approximately 700 m (min–max elevation 1,200–1,914 m a.s.l.) (Fig. 6). Five populations are known so far (four if considering the two nearby localities in Roccaforte Mondovì as one), encompassing an estimated AOO of 16 km² and an EOO of 103 km². We infer a decline in both EOO and AOO because of global warming due to the sensibility of troglobionts to increasing global temperature (see Mammola et al. 2019a). Dispersal ability for this species is not known but given the high development of troglomorphic characters and the restricted range, it is assumed to be very low. — **Locations:** In the Red List criteria, “location” refers to a threat-based area and is different from the general notions of locality. In fact, the term ‘location’ defines a geographically or ecologically distinct area in which a single threatening event can rapidly affect all individuals of the taxon present. Global warming is expected to affect all known populations of *T. angelicus* **sp. nov.**, consequently, one single location should be considered for the assessment risk of this species. — **Threats:** The species is potentially exposed due to its extremely narrow geographic distribution range, its low dispersal capacity and its inferred low thermic tolerance related to the high level of troglomorphism. — **Conservation actions:** Considering the ongoing global warming, it is worth considering the extinction risk of *T. angelicus* **sp. nov.** As very little is known about the biology and life history of this species, to date it is not possible to provide any precise management actions. However, the inclusion of this species on the IUCN Red List represents an important starting point for its conservation. As seen for other subterranean systems of conservation concern for red listed and legally protected species, three out of five caves hosting *T. angelicus* **sp. nov.** benefit from being included in protected area or Sites of Conservation importance, namely IT1160056 (Alpi Marittime) and IT1160057 (Alta Valle Pesio and Tanaro). — **Note on the conservation status in France:** *T. morisii* has been cited in “CR” status in the Red List of Spiders in France since the beginning of 2023 (Bounias-Delacour et al., 2023). Its new distribution and its replacement at the French locality of Balconi di Marta by *T. angelicus*, would give the latter the same status in France.

3.3.2. *Typhlonesticus santinellii* Isaia and Ribera, **sp. nov.**

<https://zoobank.org/A5B798A7-3A15-4C06-AEC1-90FE8BF6F26F>

Fig. 3A–E, 5B, D, 7C

Examined material. Holotype: ITALY, Lombardia, Province of Bergamo: Oneta, Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo (Fig. 7G), 45.8833°N, 9.8243°E, 1,208 m a.s.l., 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. 1m (MCSNB). — **Paratypes:** ITALY, Lombardia, Province of Bergamo: Oneta, Miniere di Gorno, Alpe Grem, Cantiere #7, 45.8862°N, 9.8235°E, 1,320 m a.s.l., 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. 1f (CI) • Oneta, Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo (Fig. 7G), 45.8833°N, 9.8243°E, 1208 m a.s.l., 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. 1f (MCSNB) • Monasterolo Castello, Grotta Murdosso [LoBG 7407] (Fig. 7H), 45.7474°N 9.9542°E, 1092 m a.s.l., 12.V.2019, Santinelli R. leg. 1f, 1 m subadult (CI).

Diagnosis. Males of *Typhlonesticus santinellii* **sp. nov.** differ from *T. morisii* and *T. angelicus* **sp. nov.** by the shape of p1 and p2 processes, the shape of the median apophysis (Figs 3D, 5D) and by the shape and arrangement of the paracymbial apophyses, mainly the ventral one (“vp” in Fig. 3D, E), which is shorter and more tapering in *T. santinellii* **sp. nov.** than in *T. angelicus* **sp. nov.** and *T. morisii*. — Females are best diagnosed by the orientation of the insemination ducts, and the shape of the spermathecae (Figs 3A, B, 5B).

Description of the male. Male holotype from Miniere di Gorno, Galleria del Pozzo, 45.8833°N, 9.8243°E, 1208 m a.s.l., 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. — **Coloration:** Carapace yellow-brown. Head region of the same color. Sternum yellow brown, without pattern. Opisthosoma grey-white without pattern. Legs same color as prosoma, all trochanters notched. — **Prosoma:** Carapace 1.42 long, 1.30 wide. Cephalic region not differentiated from the rest of the carapace. Clypeus height 0.32 (under AME). Labium as long as wide or moderately wider than long. Sternum 0.88 long, 0.90 wide. Eyes reduced and lacking pigment, no corneal lenses are visible. Both eye rows recurved in dorsal view (PER 0.43 wide, AER 0.37), Eye diameter: AME 0.01, ALE 0.06; PME 0.05; PLE 0.06. — **Opisthosoma:** 1.84 long, 1.13 wide. Total length 3.26 (3.43 including spinnerets). Leg formula: I>II>IV>III. — **Appendages:** Chelicerae: 0.72 long, 0.30 wide, with three equally spaced teeth on promargin and 18–20 very small teeth grouped on retromargin. **Male palp** (Figs 3D, E, 5D): Paracymbium short. Ventral process consisting of a long and flattened lamella, straight, tapering in the distal part, ending in a thin spine, and a dorsal process scarcely developed consisting of a short laminar apophysis, perpendicularly bent at the apex, ending in a rounded lobe. Conductor complex with two well developed processes (p1 and p2): p1 is longer than wide, pointed,

tapering along its length in lateral view (Figs 3D, 5D); p2 is in an apical position and ending with two almost parallel small hooks, running as a conductor for the embolus (Figs 3D, 5D). Embolus filamentous following a semi-circular course towards the apex and bordering the tegulum (Figs 3D, 5D). Large and well-developed median apophysis, ventrally directed, wider at its base and narrower at its medial-final part, cone-shaped with a blunt end. (Figs 3D, 5D). — **Leg measurements:** Leg I: femur 5.23, patella 0.76, tibia 5.36, metatarsus 5.30, tarsus 1.80, total 18.45. Leg II: femur 3.98, patella 0.68, tibia 3.78, metatarsus 3.69, tarsus 1.39, total 13.52. Leg III: femur 3.96, patella 0.65, tibia 3.32, metatarsus 3.15, tarsus 1.20, total 12.28. Leg IV: femur 3.99, patella 0.66, tibia 3.77, metatarsus 3.64, tarsus 1.35, total 13.41. Palp:

femur 1.02, patella 0.24, tibia 0.31, tarsus 0.84, total 2.41.

Description of the female. Female paratype from Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo, 45.8833°N, 9.8243°E, 1,208 m a.s.l., 14.X.2022, Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg. — **Coloration:** Carapace pale yellow. Head region of the same color. Sternum yellow brown, without pattern. Opisthosoma grey-white without pattern. Legs same color as prosoma. — **Prosoma:** Carapace 1.51 long, 1.36 wide, approximately circular in dorsal view. Cephalic region not differentiated from the rest of the carapace. Clypeus height under AME 0.29, under ALE 0.298. Labium as long as wide or moderately wider than long. Sternum 0.79 long,

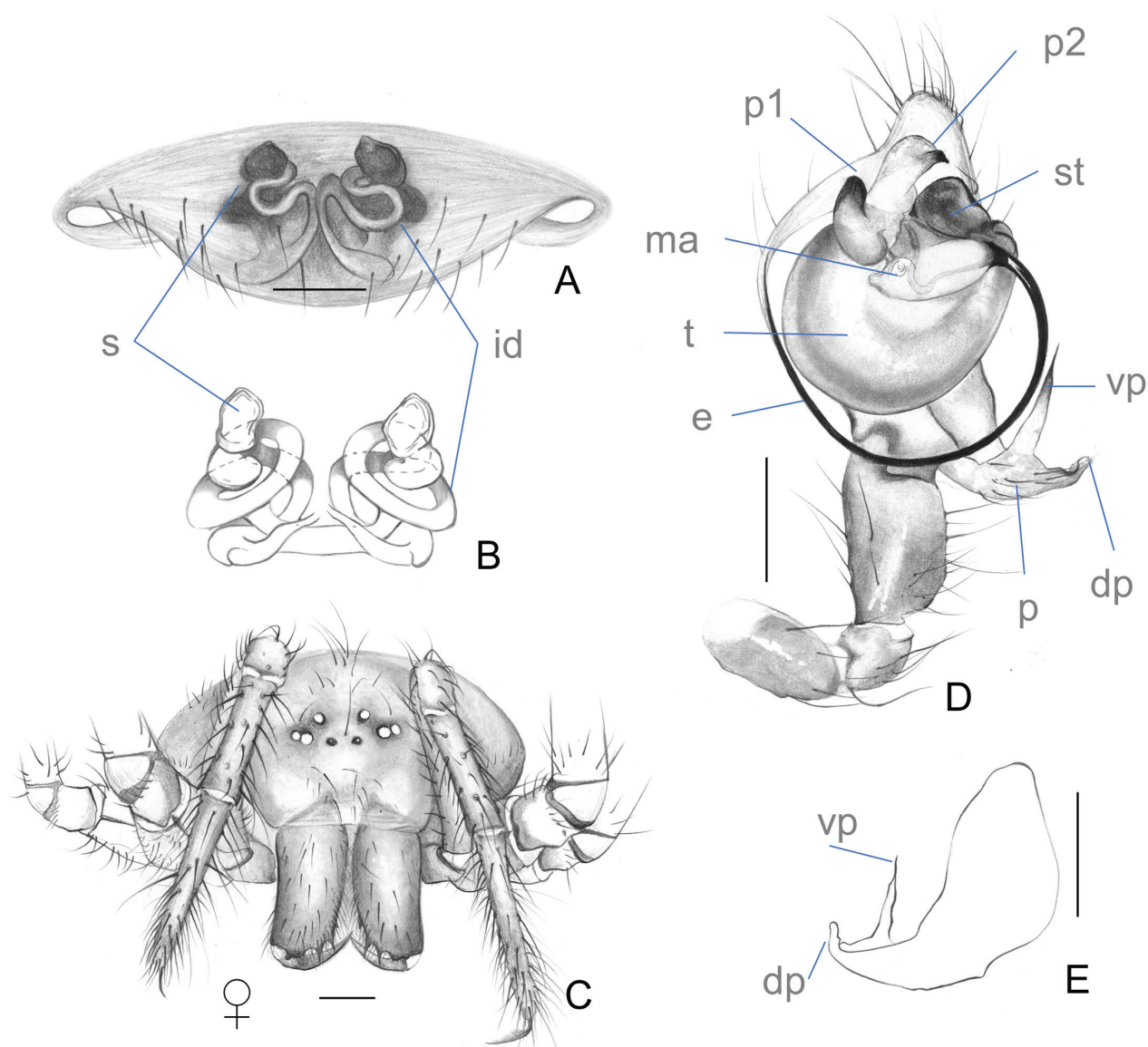


Figure 3. *Typhlonesticus santinellii* sp. nov., paratype female from Monasterolo Castello, Grotta Murdosso [LoBG 7407] (Santinelli R. leg., 12.V.2019) (A, B, C) and holotype male from Miniere di Gorno, Alpe Grem, Galleria del Pozzo (Falgari N., Isaia M., Nicolosi G., Pantini P., Scolari F. leg., 14.X.2022) (D, E). Epigyne in ventral view (A), vulva in dorsal view (B), female cephalothorax in frontal view (C), left male pedipalp in ventral view (D) and male cymbium in dorsal view (E) (see section 2.2.3. for abbreviations). Scale bars 0.2 mm.

0.96 wide. Eyes reduced and depigmented, no corneal lenses are visible. Both eye rows recurved in dorsal view, PER 0.49 wide, AER 0.36. AME reduced to a small spot of pigment. Eye diameter: AME 0.01, ALE 0.05; PME 0.06; PLE 0.06. — **Opisthosoma**: 2.01 long, 1.67 wide. Total length 3.52 (3.65 including spinnerets). Leg formula: I>II>IV>III. Epigynal plate 0.30 long, 0.55 wide, convex and prominent, without sclerotized plates (Figs 3A, 5B). The posterior edge is slightly sclerotized. Spermathecae and insemination ducts can be observed through the tegument. Vulva simple (Figs 3B, 5B), consisting of two small rhombohedral spermathecae, insemination and fertilization ducts. Insemination ducts coiled, forming three laps around the fertilization ducts before reaching the spermathecae (Fig. 3A, B). — **Appendages**: Chelicerae 0.76 long, 0.28 wide with three equally spaced teeth on promargin and 18–20 very small teeth grouped on retromargin. Legs same color as prosoma. — **Leg measurements**: Leg I: femur 4.48, patella 0.79, tibia 4.46, metatarsus 4.12, tarsus 1.59, total 15.44. Leg II: femur 3.52, patella 0.74, tibia 3.11, metatarsus 3.08, tarsus 1.26, total 11.71. Leg III: femur 2.72, patella 0.65, tibia 1.97, metatarsus 2.19, tarsus 0.99, total 8.52. Leg IV: femur 3.73, patella 0.78, tibia 3.02, metatarsus 2.74, tarsus 1.19, total 11.46. Palp: femur 1.09, patella 0.31, tibia 0.60, tarsus 1.14, total 3.14.

Etymology. The species is dedicated to the speleologist Roberto “Robertone” Santinelli, who first collected the female specimen in Murdosso cave, allowing the diagnosis of the new species. Noun in genitive.

Distribution, sampling notes and ecology. *Typhlonesticus santinellii* **sp. nov.** is restricted to subterranean habitats of the central portion of Alpi Orobie, within the section of Alpi e Prealpi Bergamasche (Marazzi 2005) (Fig. 6). Three populations are known so far (two of them very close to each other), covering an area of less than 5 km² in the Val del Riso, across the municipalities of Monasterolo Castello (Murdosso cave) and Oneta (mining complex of Gorno), both in the Province of Bergamo. The Murdosso cave is a wild cave opening in a beech forest in the nearby of Colli di San Fermo. The first female specimen was collected by Roberto Santinelli under big rocky debris, during the unblocking operations of the cave conducted by the local speleological groups “Underland” and “I Tassi”. Despite several attempts, no further specimens were collected at Murdosso cave after the collection of the first female. The two further occurrences refer to the galleries of the abandoned mining complex of Gorno, nowadays “Ecomuseo delle miniere di Gorno”, an ethnological museum dedicated to the cultural heritage of the mining activity in this area. The male and a few other specimens were collected during our biospeleological expedition in the mining complex led by Fabrizio Scolari (Ecomuseo delle miniere di Gorno) in October 2022. The galleries in which the new species was found open in alpine grasslands at 1,200–1,300 m asl. Individuals of *T. santinellii*

sp. nov. were preferably found on cave walls and among rocks near the ground, hanging upside down on their criss-cross web. Investigations at the mining complex of Gorno started following the suggestion of Marco Valle, Director of the Museo Civico di Scienze Naturali di Bergamo who conducted some biological investigations in the mining complex of Gorno in the early 1980s, together with the local biospeleologist Gianni Comotti. Marco Valle noticed that among the arachnological material collected during those explorations there was a remarkable nesticid, that was sent for examination to Konrad Thaler. The material was returned by Thaler to the Museum of Bergamo in 1984, except for one female identified as “*Nesticus* cf. *morisii*”, which was retained for further studies. Despite our search in the Thaler collection and elsewhere, we were not able to locate such material. However, our recent finding of the new species in the mining complex of Gorno confirmed Marco Valle’s and Konrad Thaler’s first impressions. — *Typhlonesticus santinellii* **sp. nov.** was collected in a natural cave and in the mining complex of Gorno at a mean altitude of 1,206 m (n = 3) and inhabits sites with mean annual temperatures from 6.3 to 7.8°C (mean = 7.0°C; range: 1.5; n = 3).

Conservation status and basic information for an IUCN Red List assessment. Range description, Area of Occupancy (AOO) and Extent of Occurrence (EOO). The species is endemic to a small sector of Alpi Orobie covering an altimetric range of approximately 250 m (min–max elevation 1,092–1,320 m) (Fig. 6). Three populations are known so far (two if considering the two nearby populations of the mining complex Gorno as one), encompassing an estimated EOO of 4 km² and an AOO of 8 km². Similarly to *T. angelicus* **sp. nov.**, we infer a decline in both EOO and AOO as a result of global warming. It is assumed that it has a very low dispersal capacity. — **Locations**: Global warming is expected to affect all known populations of *T. santinellii* **sp. nov.**, consequently, one single location should be considered for the assessment risk of this species. — **Threats**: The species is potentially exposed due to its extremely narrow geographic distribution range, its low dispersal capacity and its low thermic tolerance related to the high level of adaptation to subterranean life. — **Conservation actions**: In light of the ongoing global warming, it is worth considering the extinction risk of *T. santinellii* **sp. nov.** As for *T. angelicus* **sp. nov.**, it is not possible to provide any precise management actions, but the inclusion on the IUCN Red List represents an important starting point for its conservation. The subterranean sites of the mining complex of Gorno hosting *T. santinellii* **sp. nov.** benefit from being included in sites of Conservation importance, namely SC IT2060009 Val Nossana – Cima di Grem, managed by the Regional Park of Orobie Bergamasche. The current management of the subterranean site as tourist attractions does not seem to compromise the survival of this species.

3.3.3. *Typhlonesticus morisii* (Brignoli, 1975)

Figs 4A–E, 5F, H, 7B

Examined material. Holotype: ITALY, Piemonte, Province of Cuneo: Vernante, Sotterranei del Forte A di Vernante Opera 11, Tetto

Ruinas [Art. Pi CN] (Fig. 7E, F), 44.2524°N, 7.5276°E, 800 m a.s.l., 14.X.1972, Morisi A. leg. 1m (MSNV) (Brignoli 1975). — **Other material:** same locality as holotype, 15.VI.2009, Isaia M. and Paschetta M. leg. 1 juv. (CI) (Isaia et al. 2011); 26.IV.2004, Lana E. and Arnò C. leg. 1f (CI) (Isaia et al. 2011); 25/03/2022, Isaia M. and Nicolosi G. leg. 4 f (CI).

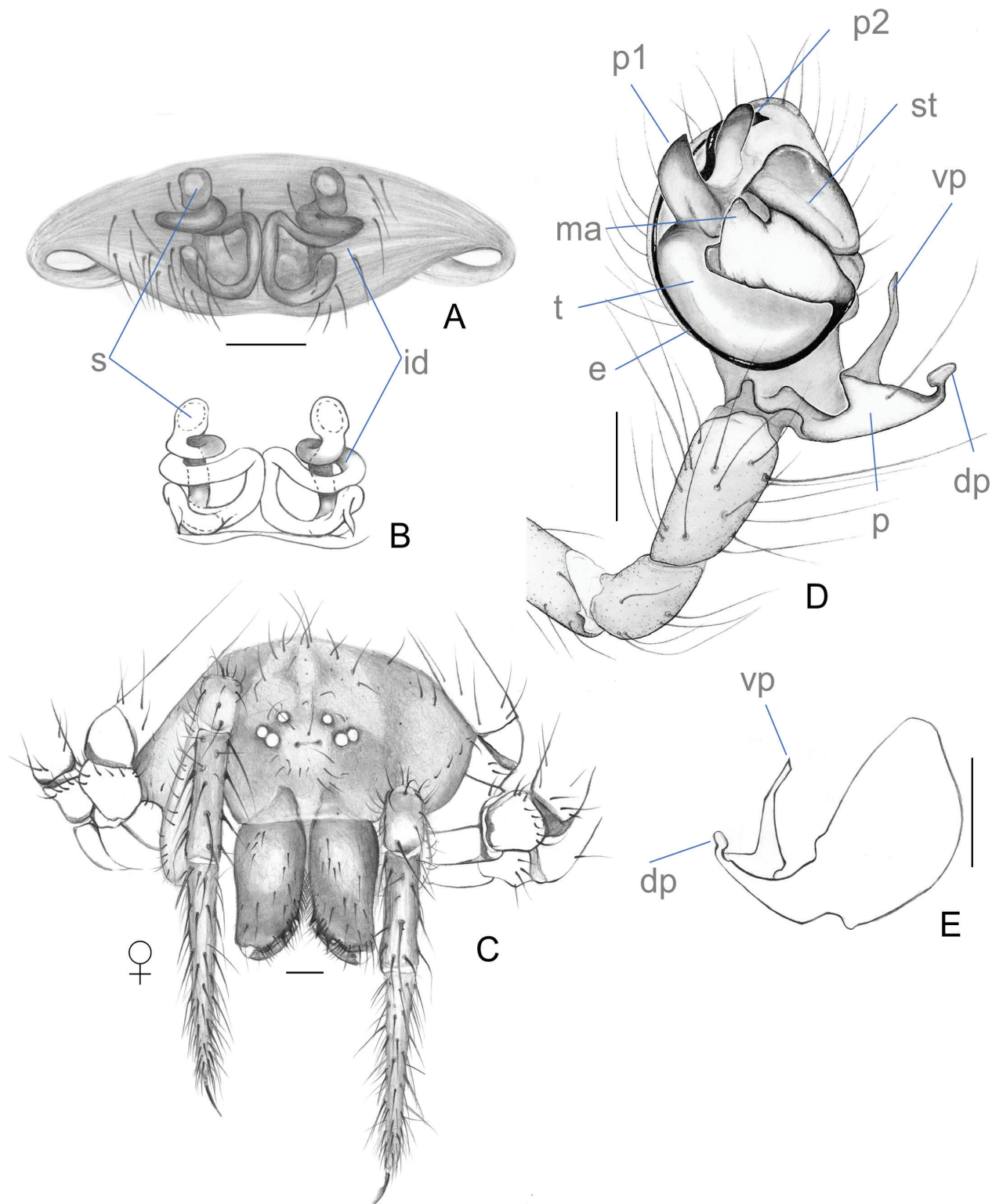


Figure 4. *Typhlonesticus morisii* (Brignoli), female from type locality, Vernante, Sotterranei del Forte A di Vernante Opera 11, Tetto Ruinas [Art. Pi CN] (Isaia M., Nicolosi G. leg., 25.III.2022) (CI) (A, B, C) and holotype male from same locality, Morisi A. leg., 14.X.1972 (D, E). Epigyne in ventral view (A), vulva in dorsal view (B), female cephalothorax in frontal view (C), left male pedipalp in ventral view (D) and male cymbium in dorsal view (E) (see section 2.2.3. for abbreviations). Scale bars 0.2 mm.

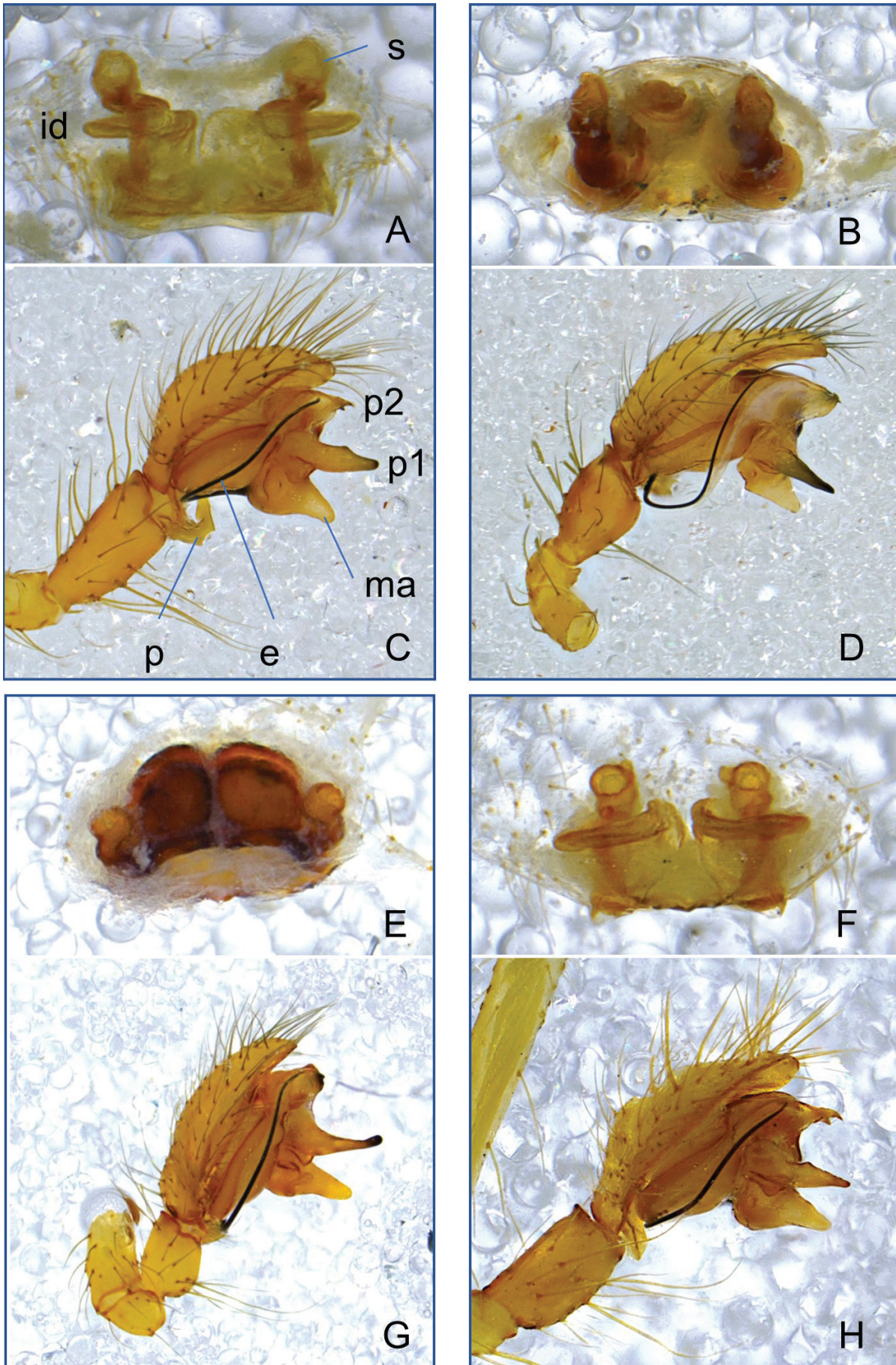


Figure 5. The four Italian species of *Typhlonesticus*: photographs of vulvae (A, B, E, F) and left male pedipalps in prolateral view (C, D, G, H). A, C *Typhlonesticus angelicus* sp. nov.; B, D *Typhlonesticus santinellii* sp. nov.; E, G *Typhlonesticus idriacus* (Roewer); F, H: *Typhlonesticus morisii* (Brignoli).

3.3.4. *Typhlonesticus idriacus* (Roewer, 1931)

Fig. 5E, G

Examined material. ITALY, Friuli Venezia Giulia, Province of Udine: Nimis, Grotta di Pre Oreak, 46,24054°N, 13,2920°E, 285 m a.s.l., 15.IX.2007, Lopez A. leg. 1f (CRBA).

3.4. Biogeography and troglomorphism in *Typhlonesticus*

A comparative analysis of troglomorphic traits and biogeographic features of *Typhlonesticus* spiders is presented in Table 1. *T. absoloni* (Montenegro) stands in terms of highest leg elongation (> 1), eye reduction (AME: 0.001 mm) and biggest body size (5.750 mm). *T. morisii* and *T. obcaecatus* are smaller in size but equally remarkable in terms of leg elongation (> 1) and eye reduction (0.001 mm). On the other end, *T. silvestrii* and *T. idriacus* exhibit the lowest level of troglomorphism, with bigger anterior median eyes (0.060 and 0.053, respectively) and lower leg elongation (0.56 and 0.70 respectively) within

the genus. As for the two new species, they show high values of leg elongation (> 0.90) and eye reduction (0.035 and 0.040).

When relating troglomorphic traits to biogeographic features (Fig. 8), we unravelled a significant positive relationship between the Extent of Occurrence and the diameter of anterior median eyes (Est: 0.0126; Std Err.: 0.0027; P: 0.0026**) and an inverse significant relation with leg elongation (Est: -0.0840 ; Std Err. 0.018; P: 0.0024**). The same trend was recovered when relating altimetric range to the diameter of anterior median eyes (Est: 0.0057; Std Err. 0.0020; P: 0.0275*). No significant relations were recovered when relating leg elongation to altimetric range (Est: -0.0298 ; Std Err. 0.0163; P: 0.1110 ns) or body size to both altimetric range (Est: 0.0379, Std Err. 0.1194; P: 0.7602 ns) and Extent of Occurrence (Est: -0.0160 ; Std Err. 0.2214; P: 0.9442 ns).

Interestingly, *T. absoloni* (Montenegro) deviates from the expected trends, showing higher leg elongation (Fig. 8A, B) and smaller eyes (Fig. 8C, D) than expected for the given range size (30 km²) and altimetric range (200 m). On the on the contrary, *T. santinellii* shows bigger eyes than expected for its range (8 km²).

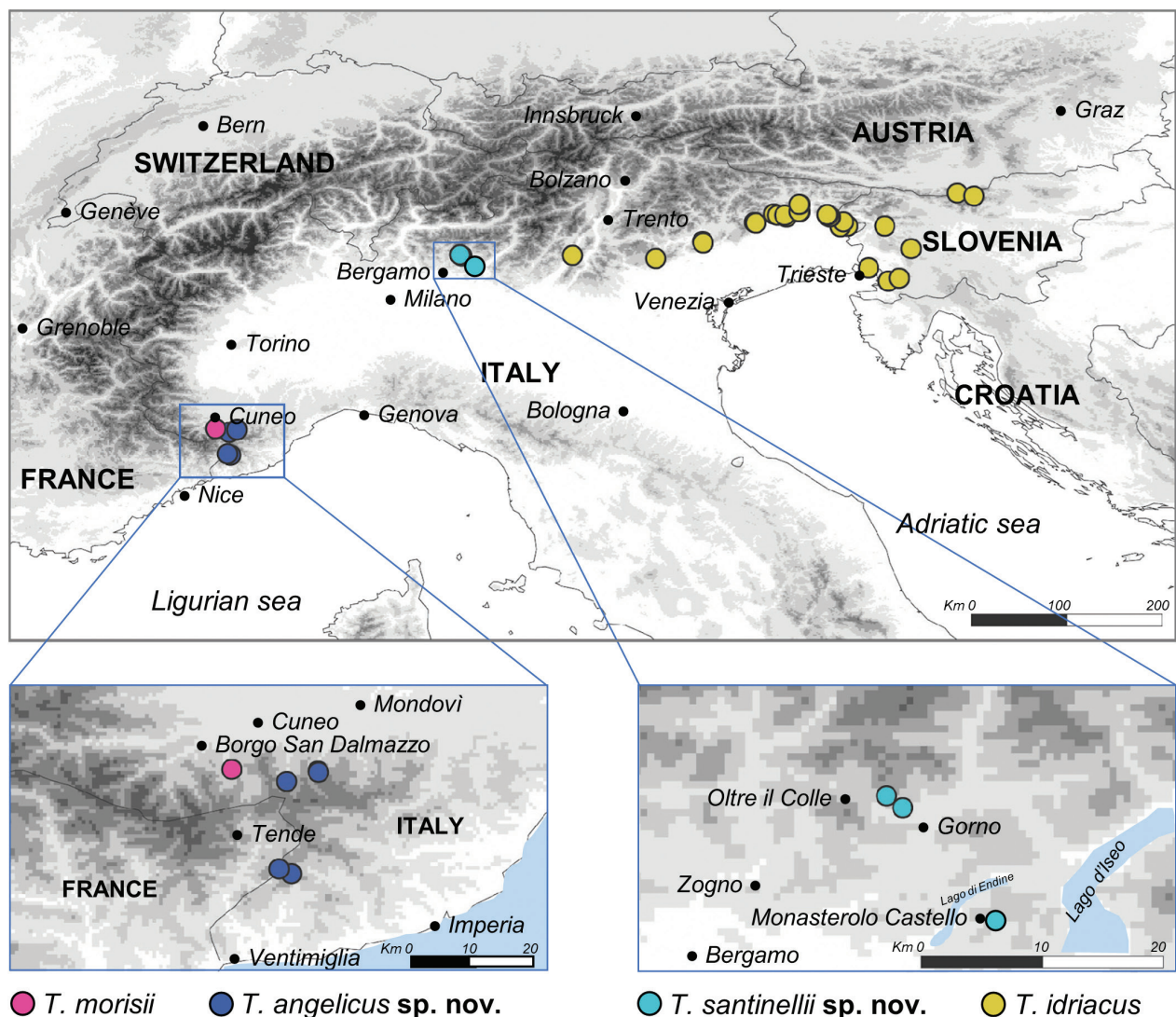


Figure 6. Distribution of *Typhlonesticus* in Italy.



Figure 7. Live specimens of *Typhlonesticus angelicus* sp. nov. (A male), *T. morisii* (Brignoli) (B female) and *T. santinellii* sp. nov. (C female) in their natural habitats. The entrance of Grotta superiore delle Camoscere [Pi 250], type locality of *T. angelicus* sp. nov. (D), the military bunker of Sotterranei di Vernante, type locality of *T. morisii* (Brignoli) (E, F); the walls of “Galleria del Pozzo” within the mining complex of Gorno, type locality of *T. santinellii* sp. nov. (G); the entrance of Murdosso cave [Lo BG 7407], where the first female of *T. santinellii* sp. nov. was collected during the unblocking operations of the cave conducted by the local speleological groups “Underland” and “I Tassi” (H).

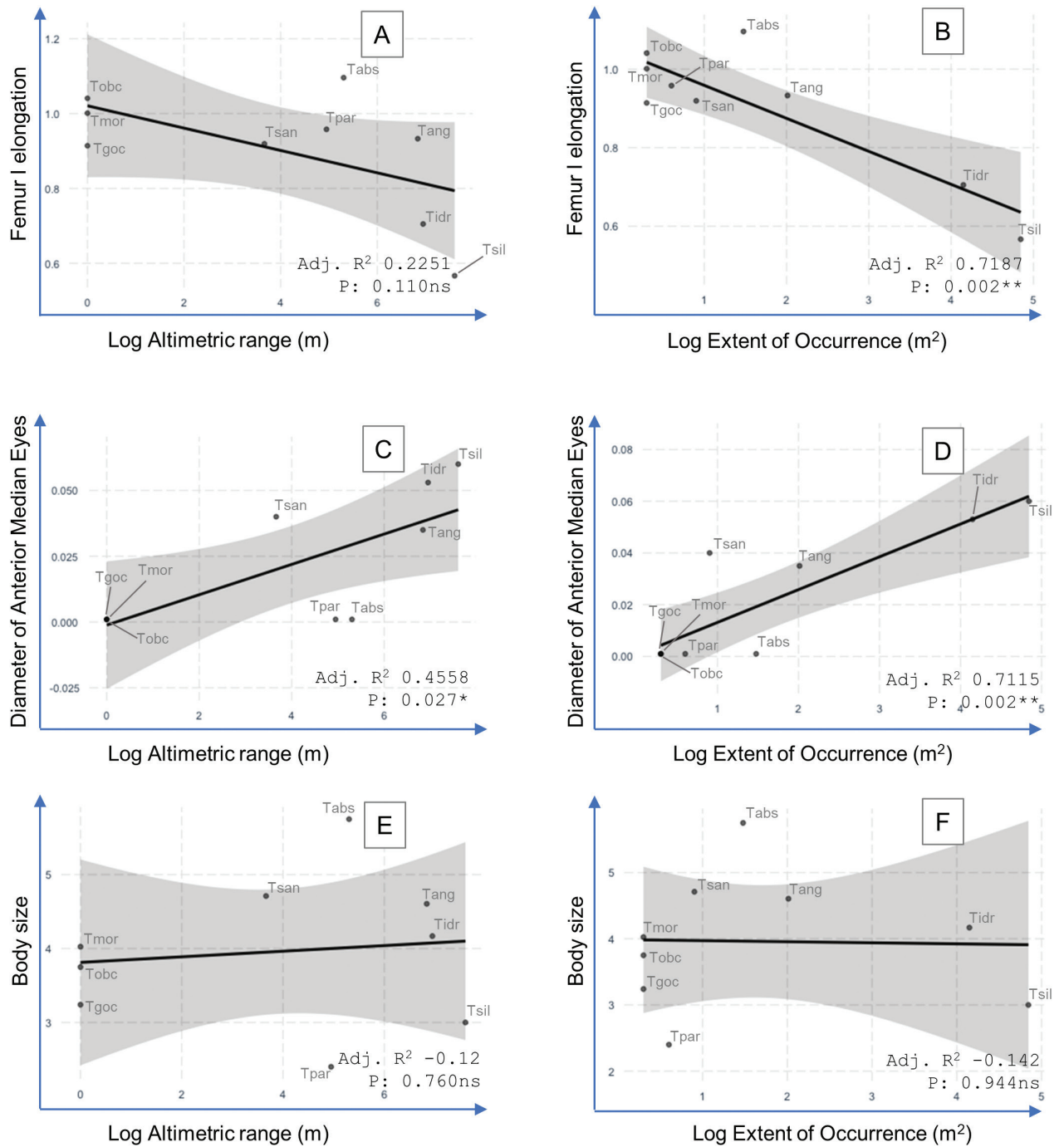


Figure 8. Predicted linear relationship (solid line) and 95% confidence interval (grey shading) between biogeographic features and troglomorphic traits in *Typhlonesticus* (all species), derived from the linear mixed model. Regression statistics for each regression are reported lower right. Femur I elongation is expressed as the ratio of the length of the femur I to the body size of females, the diameter of anterior median eyes is in mm. Extent of occurrence and altimetric range are Log transformed. Species abbreviations: Tobc = *T. obcaecatus*; Tmor = *T. morisii*; Tgoc = *T. gocmeni*; Tsan = *T. santinellii*; Tpar = *T. parvus*; Tabs = *T. absoloni*; Tang = *T. angelicus*; Tidr = *T. idriacus*; Tsil = *T. silvestrii*.

Table 1. Troglomorphic traits and biogeographic features of *Typhlonesticus* spiders. Body size, femur I elongation and diameter of anterior median eyes are issued from Mammola et al. (2022) and verified on original publications and/or on original material. Measures of the holotypes are taken as reference. Leg elongation is measured as the ratio of the length of the femur I to the body size of females. The calculation of the Extent Of Occurrence (EOO, km²) is based on occurrences found in literature (see corresponding reference). * Values of EOO and altimetric range are approximate values, based on non-exact occurrences.

		Troglomorphic traits			Biogeographic features			References
		Body size	Fem I elongation	Diameter of anterior median eyes	EOO	Altimetric range	Number of occurrences	
<i>T. absoloni</i> (Kratohvil, 1933)*	Montenegro	5,750	1,096	0,001	30	200	5	Kulczyński (1914, 1933, 1934, 1939); Deeleman-Reinhold (1974)
<i>T. angelicus</i> sp. nov.	SW-Alps (Italy and France)	4,605	0,933	0,035	103	931	4	This work
<i>T. gocmeni</i> Ribera, Elverici, Kunt & Özkütük, 2014	Turkey	3,240	0,914	0,001	2	0	1	Ribera et al. 2014
<i>T. idriacus</i> (Roewer, 1931)	E-Alps (Italy, Slovenia, Austria)	4,168	0,705	0,053	14078	1040	36	Thaler (1981); Dresco (1966); Roewer (1931); Gasparo (1996, 1997); Gasparo et al. (2001); Paoletti (1978); Brignoli (1972); Kostanjšek (2010); Kranjc, Novak (1977)
<i>T. morisii</i> (Brignoli, 1975)	SW-Alps	4,025	1,001	0,001	2	0	1	Isaia et al. (2011)
<i>T. obcaecatus</i> (Simon, 1907)	Spain	3,750	1,041	0,001	2	0	1	Ribera (1979)
<i>T. parvus</i> Kulczyński, 1914	Bosnia and Herzegovina	2,400	0,958	0,001	4	140	3	Kratohvil (1933, 1934); Brignoli (1971)
<i>T. santinellii</i> sp. nov.	Orobic Alps (Italy)	4,710	0,919	0,040	8	38	3	This work
<i>T. silvestrii</i> (Fage, 1929)*	E-USA	3,000	0,567	0,060	70000	2000	38	Gertsch (1984)

4. Discussion

The new species are both diagnosed by morphological details of the epigyne and the male copulatory organs. In particular, the arrangement of spermathecae and the paracymbium apophysis proved to be diagnostic, with negligible overlap among species. As for *T. santinellii* sp. nov., the comparative examination of the epigyne of the female from Murdosso cave (Central Alps) with material of *Typhlonesticus* allowed a first preliminary identification of a putative new species, which was later corroborated by molecular evidence. At the same time, a careful morphological re-examination of non-topotypic material in CI and MCSNB collections previously identified as *T. morisii* (see Isaia et al. 2017: 323) and the corresponding phylogeny allowed the delimitation of *T. angelicus* sp. nov., leaving *T. morisii* uniquely reported at the type locality.

According to both the molecular and the morphological approach, *T. angelicus* sp. nov. is close to *T. morisii*, and to a lesser degree to *T. santinellii* sp. nov. and *T. idriacus*. The four Alpine species are distinctly grouped in the Alpine cluster, attesting their reciprocal affinity.

With the inclusion of *T. angelicus* sp. nov. and *T. santinellii* sp. nov., the evolutionary lineage of *Typhlonesticus* now includes nine species, eight of them distributed in the northern mountain ranges of the Mediterranean Basin, from Turkey to the Pyrenees, plus *T. silvestrii* from

western United States. According to Ribera and Dimitrov (2023) the genus *Typhlonesticus* originated 91.9 Mya (71.1–111.9) and constitutes the oldest lineage of European Nesticidae. With the exception of the two more basal species, *T. parvus* and *T. silvestrii*, the rest of the species originated during the Oligocene, approximately 22.4 Mya (15.4–30). At that period of time the climate in Europe gradually changed increasing seasonality and aridity (Bruch et al. 2011; Eronen et al. 2009) and the Aegean Sea was not yet open, enabling connections through mountain ranges in southern Europe, from Anatolia to the Iberian Peninsula (Ribera and Dimitrov 2023). In this scenario, the mountain ranges in the northern Mediterranean Basin acted as climatic refuges for *Typhlonesticus*. The two new species cluster with *T. morisii* and *T. idriacus*, forming the Alpine group of this genus.

Despite never being found in syntopy, all *Typhlonesticus* species are consistently found in the same habitat, i.e. in the dark zone of natural caves or artificial subterranean habitats, such as mines and bunkers. An exception to this pattern is provided by the American species *T. silvestrii*, recently transferred to the genus by Ribera and Dimitrov (2023), the only *Typhlonesticus* species recorded in both hypogean and epigean habitats.

The ability of *Typhlonesticus* spiders to maintain permanent subterranean populations (a “troglobiont” sensu Trajano and Carvalho 2017) is reflected in their high level of morphological adaptation to subterranean life (i.e. tro-

glomorphic traits; Christiansen 2012). Our comparative analysis across the genus reveals a statistically significant relationship between troglomorphic characters (leg elongation and eye regression) and range size. Accordingly, species exhibiting higher level of troglomorphy have smaller distribution ranges and, presumably, minor dispersal ability. The trend relating geographical features and leg elongation is consistent across the genus representatives, except for *T. absoloni* (Montenegro) (Fig. 8A, B), which also deviates in respect to eye regression (Fig. 8C, D). Tentatively, this deviation would hint at the existence of overlooked diversity in this species, just as unravelled in this work for *T. morisii* and *T. angelicus* **sp. nov.** A similar, but opposite deviation is also apparent in *T. santinellii* **sp. nov.**, showing bigger eyes than expected for its range. Such deviating trend would support the occurrence of new records of this species outside of the currently known range.

Traits often associated with subterranean life in spiders are particularly notable in *Typhlonesticus*, being fully depigmented, showing non-functional eyes and greater leg elongation. If, from one side, the adaptive meaning of the lack of pigment and eye reduction is particularly consistent with a dark environment, the functional meaning of leg elongation is less straightforward (see Gertsch 1973; Mammola and Isaia 2017; Liu et al. 2017; Mammola et al. 2018b). Yet, all functional hypotheses remain untested experimentally (Isaia et al. 2022, 2023).

The small distribution and altimetric ranges observed in *Typhlonesticus* plausibly parallel a low thermal tolerance in these species, which is expected to align with the general pattern observed in Mammola et al. (2019b) for *Troglohyphantes* spiders and for other subterranean arthropods (e.g. Pallarés et al. 2019, 2020, 2021; Raschmanová et al. 2018; Jones et al. 2021; Colado et al. 2022). Accordingly, specialised subterranean species exhibit lower thermal tolerances in respect to related surface species, a condition that translates into an extremely poor dispersal ability and high genetic structuring of the populations, making these species particularly vulnerable to the ongoing global warming.

5. Conclusions

Combining morphological and genetic evidence, we revealed the existence of two new species of *Typhlonesticus*, the oldest evolutionary lineage of Nesticid spiders in Europe. The new species are characterised by a high level of adaptation to the subterranean environment, confirming the extraordinary richness of subterranean diversity in the Alps. Using a trait-based approach, we inferred how highly troglomorphic *Typhlonesticus* are particularly vulnerable to environmental changes, and in particular we interpreted their isolation and their small distribution ranges as critical conditions amplifying their extinction risk, especially from a global warming perspective. We particularly address this issue by recommending further

studies focusing on the thermal tolerance of these species, aiming at understanding their possible response to increasing global temperatures.

6. Acknowledgements

Special thanks are due to Roberto Santinelli and Nicolò Falgari for leading the expeditions to Murdosso cave. We warmly thank Fabrizio Scolarini (Ecomuseo di Gorno) and Paolo Pantini (Museo Civico di Scienze Naturali di Bergamo) for leading the expedition to the mining complex of Gorno in October 2022. Thanks to Sanne Beikes and Stefano Mammola for field assistance. Thanks to Martina Pavlek for providing occurrence data on the Balkan species of *Typhlonesticus*. We also thank Alba Enguidanos for technical support and sequencing.

This paper is dedicated to the memory of Angelo Morisi (1943–2016), esteemed zoologist, pioneer in biosepological research on Piedmont and good friend of Marco Isaia. We are grateful for the major contribution he gave to the knowledge of the Piedmontese fauna and for being a constant source of inspiration, especially for the young zoologists.

7. References

- Agnarsson I, Coddington JA, Knoflach B (2007) Morphology and evolution of cobweb spider male genitalia (Araneae, Theridiidae). *The Journal of Arachnology* 35: 334–395. <https://doi.org/10.1636/SH-06-36.1>
- Arnò C, Lana E (2005) Ragni cavernicoli del Piemonte e Val d'Aosta. Associazione Gruppi Speleologici Piemontesi ONLUS (AGSP).
- Bounias-Delacour A, Canard A, Courtial C, Danflous S, Déjean S, Guerbaa K, Iorio E, Jacquet C, Lecigne S, Montagne D, Montardi Y, Villepoux O, Baraud L, Jussset A, Kirchner F, Régnier C, Véron S, Cadiou D, Gigot G (2023) La liste rouge des espèces menacées en France. *Araignées de France métropolitaine*, 20 pp.
- Brignoli PM (1971) Contributo alla conoscenza dei ragni cavernicoli della Jugoslavia. *Fragmenta Entomologica* 7: 103–119.
- Brignoli PM (1972) Catalogo dei ragni cavernicoli italiani. *Quaderni di speleologia. Circolo Speleologico Romano* 1: 5–211.
- Brignoli PM (1975) Ragni d'Italia. XXV. Su alcuni ragni cavernicoli dell'Italia settentrionale (Araneae). *Notiziario del Circolo Speleologico Romano* 20: 1–35.
- Bruch AA, Utescher T, Mosbrugger V (2011) Precipitation patterns in the miocene of central Europe and the development of continentality. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 304(3): 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.10.002>
- Christiansen K (2012) Morphological adaptations. In: White WB, Culver DC (Eds), *Encyclopedia of Caves*. Academic Press, Waltham, 517–528. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383832-2.00075-X>
- Colado R, Pallarés S, Fresneda J, Mammola S, Rizzo V, Sánchez-Fernández D (2022) Climatic stability, not average habitat temperature, determines thermal tolerance of subterranean beetles. *Ecology* 103(4): e3629. <https://doi.org/10.1002/ecy.3629>
- Coyle FA, McGarity AC (1992) Two new species of *Nesticus* spiders from the southern Appalachians (Araneae, Nesticidae). *Journal of Arachnology* 19: 161–168.
- Deeleman-Reinhold CL (1974) The cave spider fauna of Montenegro (Araneae). *Glasnik Republickog Zavoda za Zastitu Prirode i Prirodnjackog Muzeja Titogradu* 6: 9–33.

- Dresco E (1966) Étude de quelques espèces d'araignées du genre *Nesticus* (fam. Nesticidae). *Annales de Spéléologie* 21: 795–813.
- Eronen JT, Ataabadi MM, Micheels A, Karne A, Bernor RL, Fortelius M (2009) Distribution history and climatic controls of the Late Miocene Pliocene chronofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(29): 11867–11871. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902598106>
- Gasparo F (1996) Sulla presenza del genere *Stalita* Schiödte (Araneae, Dysderidae) in Friuli (Italia nordorientale). *Atti e Memorie della Commissione Grotte “Eugenio Boegan”* 33: 47–53.
- Gasparo F (1997) *Miscellanea biospeologica. Parte I: Friuli. Atti e Memorie della Commissione Grotte “E. Boegan”* 34: 17–48.
- Gasparo F, Governatori G, Stoch F (2001) Osservazioni sulla fauna delle grotte e delle acque carsiche sotterranee delle Prealpi Carniche Orientali. In: Muscio G. (a cura di) *Il fenomeno carsico nelle Prealpi Carniche Orientali (Friuli). Memorie dell’Istituto Italiano di Speleologia s. 2, 12: 75–88.*
- Gertsch WJ (1973) The spider family Leptonetidae in North America. *Journal of Arachnology* 145–203.
- Gertsch WJ (1984) The spider family Nesticidae (Araneae) in North America, Central America, and the West Indies. *Bulletin of the Texas Memorial Museum* 31: 1–91.
- Huber BA (1993) Genital mechanics and sexual selection in the spider *Nesticus cellulanus* (Araneae: Nesticidae). *Canadian Journal of Zoology* 71(12): 2437–2447. <https://doi.org/10.1139/z93-340>
- International Union for Conservation of Nature (2001). *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. ii + 30pp.*
- International Union for Conservation of Nature (2012) *Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional and National Levels: Version 4.0. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Available at www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria.*
- Isaia M, Arnedo MA, Mammola S (2022) A multi-layered approach uncovers overlooked taxonomic and physiological diversity in Alpine subterranean spiders (Araneae: Linyphiidae: *Troglohyphantes*). *Invertebrate Systematics* 36(4): 354–371. <https://doi.org/10.1071/IS21054>
- Isaia M, Mammola S, Arnedo MA (2023) A relict subterranean spider (Araneae: Linyphiidae: *Troglohyphantes*) reveals a unique component of the biogeography of Corsica. *Insect Systematics and Diversity* 7(3): 1–16. <https://doi.org/10.1093/isd/ixad008>
- Isaia M, Mammola S, Mazzuca P, Arnedo MA, Pantini P (2017) Advances in the systematics of the spider genus *Troglohyphantes* (Araneae, Linyphiidae). *Systematics and Biodiversity* 15(4): 307–326. <https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1254304>
- Isaia M, Pantini P, Beikes S, Badino G (2007) *Catalogo ragionato dei ragni (Arachnida, Araneae) del Piemonte e della Lombardia. Memorie dell’Associazione Naturalistica Piemontese* 9: 1–161.
- Isaia M, Paschetta M, Lana E, Pantini P, Schönhofer AL, Christian E, Badino G (2011) *Subterranean Arachnids of the Western Italian Alps (Arachnida: Araneae, Opiliones, Palpigradi, Pseudoscorpiones). Monografie XLVII, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, 325 pp.*
- Jones KK, Humphreys WF, Saccò M, Bertozzi T, Austin AD, Cooper SJ (2021) The critical thermal maximum of diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae): a comparison of subterranean and surface-dwelling species. *Current Research in Insect Science* 1: 100019. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2021.100019>
- Katoh K, Toh H (2008) Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics* 9: 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-212>
- Kranjc A, Novak T (1977) Golarjev ali Jamniški pekel pod Olševo. *Naše Jame* 19: 29–36.
- Kratochvíl J (1933) *Evropské druhy celedi Nesticidae Dahl. Práce Moravské Přírodovědecké Společnosti* 8(10): 1–69.
- Kratochvíl J (1934) *Pregled pecinskih paukova u Jugoslaviji. Prirodoslovne Razprave* 2: 165–226.
- Kratochvíl J (1939) À propos des deux araignées cavernicoles de Yougoslavie. *Věstník Československé Zoologické Společnosti* 6–7: 279–289.
- Kostanjšek R (2010) A contribution to the Slovenian spider fauna – I. *Natura Sloveniae* 12: 23–33.
- Kulczyński W (1914) *Araneorum species novae minusve cognitae, in montibus Kras dictis a Dre C. Absolon aliisque collectae. Bulletin International de l’Academie Des Sciences de Cracovie* 353–387.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S (2012) Partition Finder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Lehtinen PT, Saaristo MI (1980) Spiders of the Oriental-Australian region. II. Nesticidae. *Annales Zoologici Fennici* 17: 47–66.
- Liu W, Golovatch S, Wesener T, Tian M (2017) Convergent evolution of unique morphological adaptations to a subterranean environment in cave millipedes (Diplopoda). *PLoS ONE* 12: e0170717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170717>
- Mammola S, Arnedo MA, Pantini P, Piano E, Chiappetta N, Isaia M (2018b) Ecological speciation in darkness? Spatial niche partitioning in sibling subterranean spiders (Araneae: Linyphiidae: *Troglohyphantes*). *Invertebrate Systematics* 32(5): 1069–1082. <https://doi.org/10.1071/IS17090>
- Mammola S, Cardoso P, Ribera C, Pavlek M, Isaia M (2018a) A synthesis on cave-dwelling spiders in Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 56(3): 301–316. <https://doi.org/10.1111/jzs.12201>
- Mammola S, Isaia M (2017) Spiders in caves. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 284. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0193>
- Mammola S, Pavlek M, Huber BA, Isaia M, Ballarin F, Tolve M, Čupić I, Hesselberg T, Lunghi E, Mouron S, Graco-Roza C, Cardoso P (2022) A trait database and updated checklist for European subterranean spiders. *Scientific Data* 9(236). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01316-3>.
- Mammola S, Piano E, Cardoso P, Vernon P, Domínguez-Villar D, Culver DC, Pipan T, Isaia M (2019a) Climate change going deep: The effects of global climatic alterations on cave ecosystems. *The Anthropocene Review* 6(1–2): 98–116. <https://doi.org/10.1177/2053019619851594>
- Mammola S, Piano E, Malard F, Vernon P, Isaia M (2019b) Extending Janzen’s hypothesis to temperate regions: a test using subterranean ecosystems. *Functional Ecology* 33(9): 1638–1650. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13382>
- Marazzi S (2005) *Atlante Orografico delle Alpi. Priuli and Verlucca, SOIUSA, Pavone Canavese.*
- Pallarés S, Colado R, Botella-Cruz M, Montes A, Balart-García P, Bilton DT, Millán A, Ribera I, Sánchez-Fernández D (2021) Loss of heat acclimation capacity could leave subterranean specialists high-

- ly sensitive to climate change. *Animal Conservation* 24(3): 482–490. <https://doi.org/10.1111/acv.12654>
- Pallarés S, Colado R, Pérez-Fernández T, Wesener T, Ribera I, Sánchez-Fernández D (2019) Heat tolerance and acclimation capacity in subterranean arthropods living under common and stable thermal conditions. *Ecology and Evolution* 9: 13731–13739. <https://doi.org/10.1002/ece3.5782>
- Pallarés S, Sanchez-Hernandez JC, Colado R, Balart-García P, Comas J, Sánchez-Fernández D (2020) Beyond survival experiments: using biomarkers of oxidative stress and neurotoxicity to assess vulnerability of subterranean fauna to climate change. *Conservation Physiology* 8(1): coaa067. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa067>
- Pantini P, Isaia M (2019) Araneae.it: the online catalog of Italian spiders, with addenda on other arachnid orders occurring in Italy (Arachnida: Araneae, Opiliones, Palpigradi, Pseudoscorpionida, Scorpiones, Solifugae). *Fragmenta Entomologica* 51(2): 127–152. Online at www.araneae.it [accessed on 01 March 2023]. <https://doi.org/10.4081/fe.2019.374>
- Paoletti MG (1978) Cenni sulla fauna ipogea delle prealpi bellunesi e colli subalpini. *Le Grotte d'Italia* 7(4): 45–198
- Raschmanová N, Šustr V, Kováč L, Parimuchová A, Devetter M (2018) Testing the climatic variability hypothesis in edaphic and subterranean Collembola (Hexapoda). *Journal of Thermal Biology* 78: 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.004>
- Ribera C (1979) Distribution des Nesticidae cavernicoles de la Péninsule Ibérique. *Revue Arachnologique* 2: 291–300.
- Ribera C, Dimitrov D (2023) A molecular phylogeny of the European nesticid spiders (Nesticidae, Araneae): Implications for their systematics and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 180: 107685. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107685>
- Ribera C, Elverici M, Kunt KB, Özkütük RS (2014) *Typhlonesticus gocmeni* sp. n., a new cave-dwelling blind spider species from the Aegean region of Turkey (Araneae, Nesticidae). *ZooKeys* 419: 87. <https://doi.org/10.3897/zookeys.419.5739>
- Roewer CF (1931) Arachnoideen aus südostalpinen Höhlen gesammelt von Herrn Karl Strasser in den Jahren 1929 und 1930. *Mitteilungen über Höhlen- und Karstforschung* 1931: 1–17.
- Silvestro D, Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12: 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Thaler K (1981) Über *Nesticus idriacus* Roewer 1931 (Arachnida: Araneae: Nesticidae). *Senckenbergiana Biologica* 61: 271–276.
- Trajano E, Carvalho MR (2017) Towards a biologically meaningful classification of subterranean organisms: a critical analysis of the Schiffner-Racovitza system from a historical perspective, difficulties of its application and implications for conservation. *Subterranean Biology* 22: 1–26. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.22.9759>
- World Spider Catalog (2023) World Spider Catalog. Version 24. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch> [accessed on 01 March 2023]. <https://doi.org/10.24436/2>

Supplementary Material 1

Tables S1, S2

Authors: Isaia M, Nicolosi G, Infuso A, Ribera C (2023)

Data type: .pdf

Explanation note: **Table S1.** Primers used for PCR amplification and sequencing. — **Table S2.** Specimens, localities and sequences with corresponding GenBank accession numbers analyzed in the present study (sequences with * are new for this study).

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/asp.81.e106948.suppl1>